



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA**

CLÁUDIO URBANO SANTOS DE CASTRO

**AValiação da Eficiência de Biorremediadores à Base de
Microrganismos Eficientes na Redução de Compostos
Nitrogenados e Fosfatados em Meio Líquido**

São Luís, MA
2024

CLÁUDIO URBANO SANTOS DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIORREMEDIADORES À BASE DE
MICRORGANISMOS EFICIENTES NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS
NITROGENADOS E FOSFATADOS EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia – PPGOceano, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Oceanografia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos

São Luís, MA
2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Santos de Castro, Cláudio Urbano.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIORREMEIADORES À BASE DE
MICROORGANISMOS EFICIENTES NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS
NITROGENADOS E FOSFATADOS EM MEIO LÍQUIDO / Cláudio Urbano
Santos de Castro. - 2024.
65 f.

Orientador(a): Ricardo Luvizotto Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Oceanografia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São
Luís-ma, 2024.

1. Aquicultura. 2. Biorremediação. 3. Biotecnologia
Aquícola. 4. Eutrofização. 5. Qualidade de Água. I.
Santos, Ricardo Luvizotto. II. Título.

CLÁUDIO URBANO SANTOS DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIORREMEDIADORES À BASE DE
MICRORGANISMOS EFICIENTES NA REDUÇÃO DE COMPOSTOS
NITROGENADOS E FOSFATADOS EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia – PPGOceano, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovado em: 28 de junho de 2024

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof^a. Dr^a. Alana Gandra Lima de Moura
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

São Luís – MA
2024

DEDICATÓRIA

À Sara, minha companheira incansável, cuja paciência, amor e apoio incondicional me proporcionaram a força necessária para enfrentar os desafios ao longo desta jornada acadêmica. Sua compreensão nos momentos de ausência e seu incentivo constante foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Mariana e Susana, minhas filhas, cujo sorriso e alegria de viver me inspiram diariamente. Vocês são a luz que ilumina meus dias e a motivação para buscar sempre o melhor. Que este trabalho seja um exemplo para vocês de que, com dedicação e esforço, todos os sonhos são possíveis.

A vocês, minha eterna gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Jesus, o Cristo, cuja infinita graça tem sido meu alicerce. Sua presença me concedeu a força, a sabedoria e a coragem necessárias para enfrentar e superar cada desafio ao longo desta jornada acadêmica. Sem Sua orientação divina, esta conquista não teria sido possível.

Agradeço sinceramente a todos que contribuíram para a realização desta dissertação.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos, pela orientação dedicada, paciência e valiosas sugestões ao longo deste trabalho. Agradeço também aos membros da banca examinadora, Prof., Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol e Profa. Dra. Alana Gandra Lima de Moura, pelos comentários construtivos e contribuições que enriqueceram este estudo. Aos Prof. Dr. Marco Valério Jansen Cutrim, Prof. Dr. Audalio Rebelo Torres Júnior e Profa. Dra. Mariana Basso Jorge, meu muito obrigado pelas valiosas contribuições nas etapas que precederam a defesa.

Agradeço à minha família pelo amor incondicional, apoio constante e compreensão durante os momentos de ausência dedicados a esta pesquisa. Em especial, dedico este trabalho à minha esposa Sara Soeiro Brito de Castro e as minhas filhas Mariana Brito de Castro e Susana Brito de Castro, que foram uma fonte constante de inspiração e motivação.

Sou grato aos meus colegas de laboratório e amigos que compartilharam suas ideias e experiências ao longo deste caminho acadêmico: Mateus Marques, Arcediogo Júnior.

Agradeço também à FAPEMA que possibilitou o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada acadêmica, mesmo que não mencionados aqui diretamente. Vocês foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

A todos, meu sincero obrigado.

RESUMO

A aquicultura é a atividade de produção de alimentos de mais rápido crescimento mundial, impulsionada pelo aumento da população, por fatores econômicos e pela demanda por alternativas à produção pecuária. Há grande expectativa de que o Brasil se torne um dos principais produtores de alimentos aquáticos do mundo e os desafios ambientais e processuais da atividade devem ser superados para que se alcance esse potencial aquícola nacional. Estratégias de mitigação e controle de compostos indesejáveis, como a biorremediação com microrganismos, estão ganhando atenção no manejo aquícola e melhorando a viabilidade técnica e financeira dos empreendimentos. No entanto, o uso desses microrganismos apresenta limitações importantes que precisam ser consideradas, sobretudo quanto a definição dos consórcios microbianos mais eficientes e protocolos para seu uso. A pesquisa aqui proposta visou avaliar a ação de biorremediadores microbianos multiespecíficos (fermentado de Microrganismos Eficientes Endógenos – MEE, prospectados em mata ripária, Bactérias Púrpura Não-Sulfurosas – BPNS, e um formulado comercial – Stability®) os quais foram aplicados em meio líquido artificialmente eutrofizado. Foram determinados parâmetros físico-químicos (temperatura, OD, pH e condutividade elétrica) e químicos (alcalinidade, dureza, amônia, nitrito, nitrato, fosfato, fósforo, pentóxido de fósforo e dióxido de carbono) antes e após a adição dos biorremediadores nos tempos 6, 12 e 24 h pós tratamento. Os resultados indicaram que o tratamento com BPNS foi o mais eficaz na redução da amônia (90% - 24h) e fosfato (64% - 24h). O tratamento com ME também reduziu os níveis de fósforo fosfato (41% - 24h) mas, no entanto, apesar do consumo de amônia observado até 12 h de ensaio (60%), houve um aumento expressivo na concentração de amônia às 24 h (188%). Considerando a dinâmica observada nos parâmetros de qualidade de água, principalmente a relacionada ao sistema tampão (alcalinidade, dureza e pH), além da redução de amônia e fósforo, a aplicação simultânea dos biorremediadores BPNS e MEE pode gerar efeitos positivos recomendando-se, portanto, a avaliação do efeito combinado desses consórcios microbianos em estudos futuros. Além disso, a identificação dos grupos microbianos constituintes é fundamental para a avaliação de risco considerando a aplicação aquícola.

Palavras-chave: Aquicultura, Biorremediação, Biotecnologia Aquícola, Eutrofização, Qualidade da Água.

ABSTRACT

Aquaculture is the fastest-growing food production activity worldwide, driven mainly by population growth, economic profits, and demand for alternatives to terrestrial livestock production. There is great expectation that Brazil will become one of the world's leading producers of aquatic foods, and the environmental and procedural challenges of the activity must be overcome to achieve this national aquaculture potential. Mitigation and control strategies for undesirable compounds, such as bioremediation with microorganisms, are gaining attention in aquaculture management and improving the technical and financial viability. However, the use of these microorganisms has significant limitations that need to be considered, particularly regarding the definition of the most efficient microbial consortia and protocols for their use. The research proposed here aimed to evaluate the action of multispecific microbial bioremediators (fermented Endogenic Efficient Microorganisms – EEM, prospectively obtained from the riparian forest, Non-Sulfur Purple Bacteria - BPNS, and a commercial formulation - Stability®) which were applied in artificially eutrophicated liquid media. Physicochemical parameters (temperature, OD, pH, and electrical conductivity) and chemical parameters (alkalinity, hardness, ammonia, nitrite, nitrate, total phosphorus, phosphate, phosphorus pentoxide, and carbon dioxide) were determined before and after the addition of bioremediators at 6, 12, and 24 hours post-treatment. The results indicated that the treatment with BPNS was the most effective in reducing ammonia (90% - 24h), and phosphate (64% - 24h). The treatment with EEM also reduced levels of phosphate (41% - 24h), however, despite the observed ammonia consumption up to 12 hours of testing (60%), there was a significant increase in ammonia concentration at 24 hours (188%). Considering the dynamics observed in water quality parameters, especially those related to the buffer system (alkalinity, hardness, and pH), in addition to the reduction of ammonia and phosphorus, the simultaneous application of these bioremediators (EEM and BPNS) may promote synergistic effects, therefore recommending the evaluation of the combined effect of these microbial consortia in future studies. Furthermore, identifying microbial groups is essential for risk assessment when considering aquaculture applications.

Keywords: Aquaculture, Bioremediation, Aquaculture Biotechnology, Eutrophication, Water Quality.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Linha do tempo das pesquisas biotecnológicas desenvolvidas para a aquicultura continental (1990 a 2021). Em azul, tecnologias que requerem maior investimento em infraestrutura e equipamentos. Em verde, tecnologias de base ecológica (Adaptado de Zhou et al., 2023). RAS: Sistema de Recirculação; IMTA: Aquicultura Multitrófica Integrada.17
- Figura 2. Microfotografia dos Microrganismos Eficientes Endógenos (MEE) prospectados no Campus da UFMA, coradas com Fucsina Básica, observadas sob microscópio óptico. Aumento de 40x (a) e 100x (b).26
- Figura 3. Microfotografia das Bactérias Púrpuras Não-Sulfurosas (BPNS) adquiridas da Aquário Sobrinhos (Vila Velha, ES), coradas com Fucsina Básica, observadas sob microscópio óptico. Aumento de 40x (a) e 100x (b).27
- Figura 4. Valores de oxigênio dissolvido (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes (GLM, $p < 0,05$) em relação ao tempo ‘zero’.30
- Figura 5. Valores de pH (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$). ...31
- Figura 6. Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$). ...32
- Figura 7. Valores de alcalinidade (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$) ...33
- Figura 8. Valores de dureza (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$). ...34
- Figura 9. Valores de amônia (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$). ...35
- Figura 10. Valores de nitrito (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$). ...36

Figura 11. Valores de pentóxido de fósforo (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p<0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p<0,05$).	37
Figura 12. Valores de fosfato (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p<0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p<0,05$). ..	37
Figura 13. Valores de fósforo (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p<0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p<0,05$). ..	38
Figura 14. Valores estimados de dióxido de carbono (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p<0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p<0,05$).	38
Figura 15. Relação pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico com dados normalizados no grupo controle (branco).	39
Figura 16. Relação pH, alcalinidade, dureza, gás carbônico com dados normalizados no tratamento STBY.	39
Figura 17. Relação pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico com dados normalizados no tratamento MEE.	40
Figura 18. Relação pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico com dados normalizados, no tratamento BPNS.	40
Figura 19. Linhas de tendência com dados normalizados agrupados por variável analisada (pH, alcalinidade, dureza e dióxido de carbono) nos diferentes tratamentos.	41
Figura 20. Variação de NH_3 e NO_2^- com dados normalizados nos diferentes tratamentos.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de consumo (%) de amônia e fósforo (fósforo / fosfato) nos intervalos de tempo das análises nos diferentes tratamentos e o acumulado em 24 h.	43
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Biotecnologia Aquícola.....	16
2.2 Microrganismos Eficientes	21
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVO GERAL	25
4.1 Objetivos Específicos.....	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1. Biorremediadores.....	26
5.2. Planejamento Experimental	27
5.3. Análises dos Parâmetros Físico-químicos da Água.....	28
5.4. Tratamento Estatístico	29
6. RESULTADOS	30
6.1. Temperatura.....	30
6.2. Oxigênio Dissolvido	30
6.3. pH	31
6.4. Condutividade Elétrica	31
6.5. Alcalinidade.....	32
6.6. Dureza.....	33
6.7. Amônia	34
6.8. Nitrito.....	35
6.9. Nitrato	35
6.10. Pentóxido de Fósforo.....	36
6.11. Fosfato e Fósforo	37
6.12. Dióxido de Carbono.....	38
6.13. Relação pH - alcalinidade - dureza - CO ₂ com dados normalizados nos diferentes tratamentos.....	39
6.14. Linhas de tendência com dados normalizados agrupados por variável analisada (pH, alcalinidade, dureza e dióxido de carbono) nos diferentes tratamentos.	41
6.15. Variação de NH ₃ e NO ₂ ⁻ , com dados normalizados, nos diferentes tratamentos.....	41
6.16. Linhas de tendência com dados normalizados agrupados de fósforo nos diferentes tratamentos.	42
6.17. Taxa de consumo (%) de amônia e fósforo nos intervalos de tempo das análises nos diferentes tratamentos e o acumulado em 24 h.	42
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	51
9. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é a atividade de produção de alimentos que mais cresce no mundo, impulsionada pelo crescimento populacional, pelos benefícios econômicos e pela crescente busca dos consumidores por uma proteína alternativa à carne (Sarker, 2023). Reconhecida como uma das formas mais eficientes e sustentáveis de produção de proteínas do ponto de vista ambiental (DMS, 2023), a aquicultura superou a pesca extrativa em 2016, fornecendo 52% do total de pescado destinado ao consumo humano, marcando um ponto de virada na indústria pesqueira (FAO, 2024).

Esse crescimento também vem ocorrendo no Brasil nas últimas décadas, sendo que a produção de peixes em 2023 foi de aproximadamente 887 mil toneladas, um crescimento de 3,1% em relação ao ano anterior (PeixeBR, 2024). Considerando a crescente demanda por proteína animal, o grande potencial aquícola no território nacional e um cenário político favorável à atividade (Valenti et al., 2021), espera-se que esse crescimento se mantenha nos próximos anos. A Agência Nacional de Águas (ANA, 2020) estimou que o Brasil teria condições de produzir cerca de dois milhões de toneladas anuais de pescado considerando somente as águas interiores. De fato, há uma expectativa de que o Brasil se torne um dos principais produtores de alimentos aquáticos do mundo (Bueno et al., 2021; Valenti et al., 2021).

Apesar dos aspectos positivos como a eficiência na produção de proteína em relação aos animais terrestres e a geração de emprego, renda e de segurança alimentar (Olaganathan e Kar-Mun, 2017; Edwards, 2000; Dey e Ahmed, 2005; NOAA, 2020; FAO, 2022), a aquicultura permanece associada a diversos impactos ambientais negativos, incluindo a destruição de habitats, deterioração da qualidade das águas adjacentes, eutrofização, introdução de patógenos e de espécies invasoras, utilização de proteína de origem animal para a produção de ração, entre outros (Boyd e Tucker, 1998; Naylor et al., 2000; 2021; Boyd et al., 2022). Esforços no sentido de aproximar a atividade aos preceitos da sustentabilidade são necessários e desafiadores.

A aquicultura continental pode ser definida como o cultivo de organismos aquáticos dulcícolas sob condições controladas onde o principal objetivo é produzir com a maior eficiência possível numa relação custo/benefício favorável. Isso implica em cultivos com maior densidade de estocagem, alimentos com alta qualidade e uma ativa

gestão financeira e processual, elementos que ainda precisam ser melhorados no Brasil, para que se concretize esse potencial aquícola nacional.

Com relação à qualidade da água dos viveiros e dos efluentes gerados, estratégias de mitigação como a biorremediação vem ganhando vez e investimento no setor, com o desenvolvimento de produtos específicos para a redução da carga poluidora dos sistemas aquícolas. Esses processos biotecnológicos em que organismos vivos, principalmente plantas e/ou microrganismos são utilizados para remover, degradar ou reduzir as concentrações de poluentes no meio, vêm contribuindo sobremaneira na viabilidade técnico-financeiro de empreendimentos com diferentes capacidades produtivas (Lawton et al., 2013; Martínez-Porchas et al., 2014; Lananan et al., 2014; Ape et al., 2019; Jasmin et al., 2020). Entretanto e apesar dos benefícios inegáveis, a biorremediação utilizando microrganismos apresenta algumas limitações que devem ser consideradas (Ebeling et al., 2006; Martínez-Porchas et al., 2014; Azubuike et al., 2016; Dangi et al., 2019; Kumar et al., 2021; Nyika e Dinka, 2022). A prospecção de sistemas microbiológicos úteis ao processo produtivo e a maneira como devem ser utilizados nas práticas de manejo certamente seguirão como temas centrais nos estudos em biotecnologia aquícola nos próximos anos.

Os avanços da aquicultura ESG (*Environment Social Governance* - Governança Ambiental, Social e Corporativa) e da Aquicultura 4.0, cujo objetivo é melhorar a produtividade sem comprometer a saúde dos ecossistemas, incluem a maior instrumentação, inclusão de processos avançados de informação e comunicação, sistemas de apoio à tomada de decisão, processamento de imagens, sistemas de informação geográfica e a adoção de métodos biotecnológicos inovadores, como a impressão 3D de alimentos, modificação genética, novas vacinas e uso de simbióticos (El-Gayar, 1997; Lee 2000; Bueno et al., 2021; Vo et al., 2021; Zhao et al., 2021). Além disso, as recentes (bio)tecnologias aquícolas, como uso dos microrganismos eficientes, a tecnologia bioflocos, a aquamimética e uso de insetos como fonte proteica para ração, vêm contribuindo para a produção sustentável com menor impacto ambiental e devem ser incentivadas, aproximando a atividade dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU (Manan et al., 2023).

O futuro da humanidade depende da nossa capacidade de produzir alimento de qualidade e em quantidade suficiente, e há forte indícios de que a produção pecuária industrial, a qual sustenta altos níveis de consumo de carne, seja insustentável por estar relacionada a perda generalizada de biodiversidade e à degradação dos ecossistemas (Beal

et al., 2023; Gordon et al., 2023), sendo que a aquicultura representa uma real possibilidade de se alcançar uma produção de proteína mais sustentada (Gómez et al., 2019; Aragão et al., 2022; Sarker, 2023). Encontrar alternativas que proporcionem num horizonte de curto prazo alternativas sustentáveis para o manejo aquícola, tem sido o motor que impulsiona o presente trabalho. Nesse sentido, a pesquisa aqui proposta com o uso de biorremediadores constituídos por culturas microbianas multiespecíficas representa uma perspectiva real de mudar esse quadro, à medida que consistirá em validar cientificamente procedimentos aplicados empiricamente em algumas propriedades rurais no Maranhão (pela AquaX – Tecnologia e Gestão em Aquicultura Ltda.-ME), embora exitosas, sem o necessário rigor científico na sua descrição e validação.

Neste trabalho, serão apresentados os resultados de ensaios laboratoriais utilizando meio líquido eutrofizado simulando uma condição de excesso de compostos nitrogenados e fosfatados, condição que, infelizmente, tem sido verificada nos empreendimentos no Maranhão. Diferentes consórcios microbianos aqui denominados de biorremediadores, foram adicionados ao meio, processo denominado bioaugmentação, sendo que a dinâmica da alteração de diferentes parâmetros químicos e físico-químicos foi determinada dentro de 24 h de estudo. Esse curto intervalo de avaliação considerou a rotina de manejo dos produtores, ou seja, um tratamento (que deve ser) diário. Vale ressaltar que parte desses procedimentos vem sendo aplicados há alguns anos pela AquaX e essas experiências práticas, consideradas como “ensaios preliminares”, permitiram um delineamento experimental mais assertivo. Apesar disso, como todo trabalho científico, os avanços aqui alcançados ainda são incipientes e um longo caminho ainda deve ser percorrido para que haja uma definição/estabelecimento de um protocolo de uso seguro e eficiente de biorremediadores aquícolas adequados para as condições locais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biotecnologia Aquícola

Tradicionalmente, a aquicultura em tanques escavados nos sistemas extensivo e semi-intensivo têm usado processos baseados em microalgas fotoautotróficas para controlar o acúmulo de nitrogênio e fósforo nos tanques, nutrientes oriundos da adubação, ração não consumida e excretas dos espécimes cultivados (Brune et al., 2004). Entretanto, a capacidade de suporte do ambiente é limitada e conseqüentemente, a biomassa máxima segura de cultivo no sistema extensivo, por exemplo, é de apenas 0,6 kg/m³. Essa capacidade é baseada na integração do modelo bioenergético nutricional “*FishPrFEQ*” de Cho e Bureau (1998) com o modelo hidrodinâmico de Dillon e Rigler (1974).

Apesar do baixo investimento necessários para esses sistemas de cultivo, considerando tanto despesas/investimentos em bens de capital (CAPEX), quanto despesas operacionais e de organização (OPEX), a baixa produtividade por área os torna inviáveis do ponto de vista econômico. Por outro lado, o modelo de aquicultura intensiva contribui para uma elevada produção em atendimento à crescente demanda, embora com frequência, possa negligenciar o equilíbrio ecológico dos recursos aquáticos adjacentes (Zhou et al., 2023). Historicamente, os cultivos intensivos utilizaram altas taxas de renovação para garantir a qualidade da água, liberando, via efluentes, cargas de nutrientes e matéria orgânica em demasia, os quais podem contribuir para a eutrofização de ambientes aquáticos de duas maneiras: 1) pela adição de matéria orgânica e/ou 2) pelo estímulo à produção primária pela adição de nutrientes inorgânicos dissolvidos (Thoman et al. 2001; Boyd et al., 2007; Quiñones et al., 2019; Zhou et al., 2023).

O aumento das densidades de cultivo e conseqüente aumento da produtividade é diretamente proporcional à tecnificação da atividade e decorre de um maior investimento de capital financeiro e intelectual (Anyadike et al., 2016). Nesse sentido, diversas técnicas aquícolas têm sido desenvolvidas visando a melhoria da eficiência e melhor controle dos impactos negativos associados. Zhou et al. (2023), em uma revisão recente, apresentaram uma linha do tempo indicando as principais pesquisas de tecnologias de base ecológica desenvolvidas para a aquicultura de água doce (Figura 1).

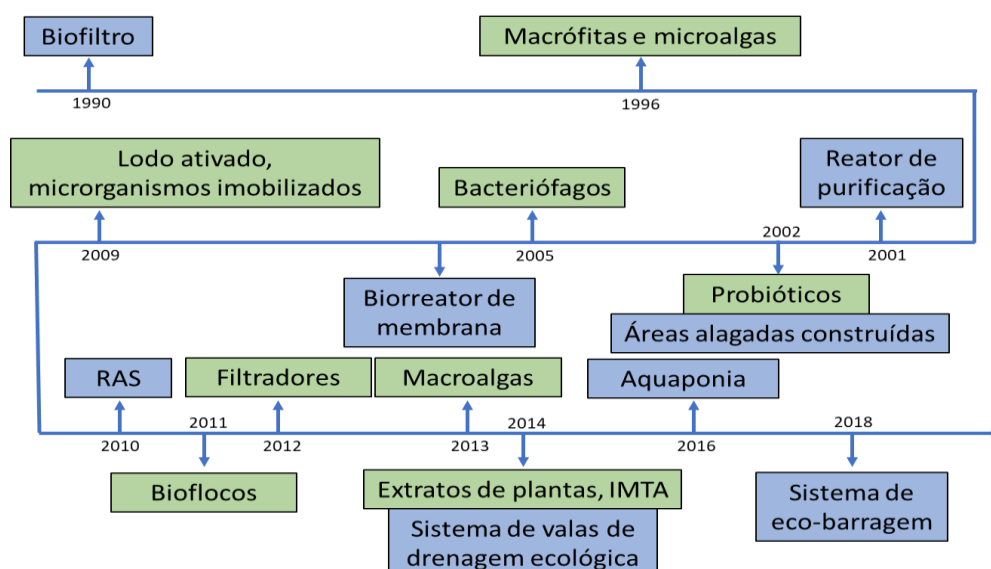


Figura 1 Linha do tempo das pesquisas biotecnológicas desenvolvidas para a aquicultura continental (1990 a 2021). Em azul, tecnologias que requerem maior investimento em infraestrutura e equipamentos. Em verde, tecnologias de base ecológica (Adaptado de Zhou et al., 2023). RAS: Sistema de Recirculação; IMTA: Aquicultura Multitrófica Integrada.

Uma das estratégias biotecnológicas para cultivo em sistemas intensivo e/ou superintensivo com biomassa final superior a 20 kg/m³ é o RAS (*Recirculating Aquaculture System*), cujo reuso e controle da qualidade de água se dá com auxílio de sistemas de filtragem compostos por diferentes filtros, entre eles biorreatores ou biofiltros. Nestes filtros utilizam-se biofilmes em diferentes mídias contendo bactérias autotróficas quimiossintetizantes, bactérias oxidantes de amônia (AOB - *Ammonia-Oxidizing Bacteria*) e bactérias oxidantes de nitrito (NOB - *Nitrite-Oxidizing Bacteria*) para a nitrificação do nitrogênio amoniacal em nitrito e nitrato (Timmons et al., 2002). Além desses microrganismos formadores de biofilme, a adição de microrganismos em suspensão tem resultado na melhora da qualidade da água e na performance geral de diferentes cultivos RAS (Astari et al., 2022; El-Kady et al., 2022; Qiu, et al., 2023).

Apesar da elevada eficiência e benefícios inegáveis como a possibilidade dos cultivos poderem se desenvolverem em regiões distantes dos mananciais de água, o sistema RAS apresenta algumas desvantagens como elevados custos CAPEX e OPEX, dependência de fonte de energia elétrica ininterrupta, complexidade e exigência de pessoal qualificado, controle de patógenos, de entre outros (Timmons et al., 2002; Badiola et al., 2018; Holan et al., 2020; Ahmed e Turchini 2021). Além disso, em alguma medida, há a necessidade de reposição ou renovação parcial de água diária em torno de 10% (Twarowska et al., 1997).

Na busca por sistemas de cultivo com “troca de água zero”, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas visando melhorar a pegada hídrica dos sistemas de reuso, com destaque para os estudos utilizando a tecnologia bioflocos (BFT – *Biofloc Technology*). A tecnologia BFT baseia-se na produção de flocos microbianos em suspensão utilizando aeração constante e adição de carbono orgânico, estimulando-se o crescimento de bactérias heterotróficas que convertem o nitrogênio amoniacal em proteína microbiana (Avnimelech e Weber 1986; Avnimelech 1999). Os princípios para a utilização de sistemas ZEAH (*Zero Exchange, Aerobic, Heterotrophic* – Zero Troca, Aeróbico, Heterotrófico) foram desenvolvidos concomitantemente em Israel com cultivo de tilápias (Avnimelech et al., 1989, 1994) e nos Estados Unidos da América com cultivo do camarão cinza *Litopenaeus vannamei* (Hopkins et al., 1993, Chamberlain e Hopkins, 1994). Entre as principais vantagens deste sistema estão a facilidade na implementação de estratégias de biosegurança (Moss, 1999), a possibilidade de redução nos níveis de proteína da dieta (Burford et al., 2004, Ballester et al. 2010) e a redução ou eliminação dos impactos ambientais provocados pelos efluentes (Browdy et al., 2001). Todavia, apesar das vantagens proporcionadas pelo sistema ZEAH, é necessária uma alta densidade de estocagem para garantir a viabilidade econômica (van Wik, 2001; Weirich, 2002) elevando os riscos e os custos da produção, além da necessidade de um corpo técnico especializado.

Outra estratégia de base biotecnológica que vem ganhando atenção é a Aquicultura Multitrófica Integrada (IMTA - *Integrated MultiTrophic Aquaculture*) que compreende o cultivo de espécies diferentes de forma consorciada para melhorar a eficiência, reduzir o desperdício e fornecer serviços ecossistêmicos, como a biorremediação. Diferente dos policultivos convencionais, onde várias espécies podem ser produzidas em conjunto, mas todas pertencem ao mesmo nível trófico; no sistema IMTA, as espécies de nível trófico inferior (geralmente plantas e/ou invertebrados) utilizam resíduos orgânicos e inorgânicos como fezes e alimentos não consumidos das espécies tróficas superiores, atuando como biorremediadores (Chopin et al., 2012; Chopin, 2013). Segundo a FAO (2022):

“...uma prática na qual os subprodutos de uma espécie são reciclados para se tornarem insumos para outra”

O equilíbrio entre as diferentes espécies que compõem a IMTA e consequente baixa resiliência do sistema parece ser o grande desafio a ser superado. Khanjani et al.

(2022) apontam alguns problemas como surtos de doenças, probabilidade de colapso devido à dependência de *inputs* de vários níveis tróficos, indefinição dos consórcios (proporção entre espécies) podendo levar uma produção ineficiente e risco de superpopulação e superlotação de organismos durante as diferentes fases do cultivo.

Considerando os exemplos citados anteriormente e independentemente da tecnologia adotada, os cultivos precisam lidar com o acúmulo de compostos indesejáveis que afetam a produtividade. O acúmulo de compostos nitrogenados em sistemas aquícolas a partir do incremento da ração é o segundo fator limitante para se aumentar a produtividade dos cultivos, atrás apenas do oxigênio dissolvido (Ebeling et al., 2006). Além dos compostos nitrogenados, o fósforo é outro macronutriente importante para os sistemas aquícolas, cujos níveis podem aumentar significativamente durante a produção (McDaniel et al., 2005; Zhang e Fang, 2006; Yogev et al., 2020). Além de limitar a produtividade, esses nutrientes podem alterar o estado trófico do corpo hídrico receptor, intensificando os problemas ambientais relacionados à atividade (Talbot e Hole, 1994; Montagnolli et al., 2004; Chislock et al., 2013; Herath e Satoh, 2015; Dauda et al., 2019).

Sabe-se que aproximadamente 36% da ração ingerida é excretada (Brune et al., 2003) e 75% do nitrogênio é lançado via efluente (Piedrahita, 2003; Gutierrez-Wing e Malone, 2006). Estimativas indicaram que a taxa de excreção de nutrientes por peixes mantidos com dieta contendo 35-40% de proteína e com conversão alimentar de 1:1,5 é de aproximadamente 25 g de nitrogênio por quilo de biomassa produzida (Cochava et al., 1990). Em termos de biomassa, pode-se comparar 3 toneladas de tilápia a um grupo de 50 pessoas (Helfman et al., 1997) que, com base na geração de resíduos, equivaleria a uma comunidade de cerca de 240 habitantes (Aziz e Tebbutt, 1980). Pode-se, portanto, concluir que a biomassa de peixes vivos pode gerar cerca de 5 vezes mais resíduos do que a biomassa humana. Isso se dá pelo fato do sistema digestivo dos organismos aquáticos ser pouco eficiente, e uma fração considerável de alimento não digerido é excretada para o meio (Amirkolaie, 2005).

O hábito alimentar dos peixes reflete-se na anatomia digestiva, sendo que o comprimento do intestino dos peixes é curto e a relação entre o comprimento do intestino e o comprimento do corpo é pequena (Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000). Por exemplo, o intestino da carpa é 2,0 a 2,5 vezes maior que o corpo, enquanto o intestino humano é cerca de 3 a 4 vezes mais longo que o corpo e o de bovinos e ovinos é, respectivamente, 20 e 30 vezes maior. Consequentemente nos peixes, o quimo permanece no intestino

apenas por um curto período e por esta razão, a ração para organismos aquáticos deve ter alta digestibilidade. Além disso, os organismos aquáticos usam proteínas para a produção de energia, ao contrário dos animais terrestres que usam principalmente carboidratos e lipídios (Hepher, 1988). A necessidade de proteína dos organismos aquáticos, portanto, é cerca de duas a três vezes maior do que a dos mamíferos, sendo a amônia o principal produto final do metabolismo das proteínas (Wright, 1995; Walsh, 2001). Todos esses fatores contribuem para os elevados resíduos de nitrogênio na água de sistemas aquícolas.

As três vias de conversão de nitrogênio tradicionalmente usadas para a remoção da amônia em sistemas aquícolas são: remoção fotoautotrófica por algas, conversão bacteriana autotrófica de amônia em nitrito e nitrato e conversão bacteriana heterotrófica de amônia diretamente em biomassa microbiana. (Baumgarten et al, 2001; Ebeling et al., 2006). Na água, a amônia (NH_3) e o amônio (NH_4^+) estão em equilíbrio dependendo do pH e da temperatura (Timmons et al., 2002), sendo que a soma das duas formas é chamada de Nitrogênio Amoniacal Total (NAT ou TAN, do acrônimo em inglês de *Total Ammonia Nitrogen*). Embora NH_3 e NH_4^+ possam ser tóxicos para peixes, a forma não ionizada é a mais tóxica pelo fato de ser mais lipossolúvel e, conseqüentemente, atravessar mais facilmente as membranas biológicas do que os íons NH_4^+ (carregados e hidratados) (Körner et al., 2001). Por essa razão, a rápida e eficiente remoção da amônia do meio é fundamental para se manter a produtividade aquícola, minimizando o estresse químico.

A ciclagem biogeoquímica do nitrogênio e fósforo em ambientes aquáticos naturais é um processo complexo envolvendo os compartimentos orgânico e inorgânico, assim como as formas dissolvida e particulada desses compostos (Carmouze, 1994). Diversos autores investigaram o efeito da relação C:N no desenvolvimento dos agregados microbianos e absorção de nitrogênio e fósforo nos sistemas ZEAH, onde o nitrogênio é removido de sua forma dissolvida ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, NO_2^- e NO_3^-) por quatro vias: nitrificação, desnitrificação, volatilização da amônia gasosa (NH_3) e assimilação por organismos fotoautotróficos e por bactérias heterotróficas (químio-organotróficas) (Avnimelech, 1999; Burford et al. 2003; Avnimelech 2006; Ebeling et al., 2006; Liu et al., 2021; Kumar et al., 2021; Zablon et al., 2022; Khanjani et al., 2024). Nos sistemas ZEAH a razão C:N é aumentada, através da adição de carbono orgânico, para favorecer a assimilação de nitrogênio (principalmente na forma de amônio) pelas bactérias heterotróficas e promover a formação do floco microbiano que além de controlar os níveis das formas nitrogenadas tóxicas, contribuem com a nutrição e controle de patógenos (Burford et al. 2004; Tacon et al. 2002; Ahmad et al., 2017; Nisar et al., 2022; Zafar et al., 2022; Khanjani et al.,

2024). O entendimento do papel dessas bactérias benéficas nos sistemas aquícolas vem proporcionando diversas oportunidades e aplicações, sobretudo no desenvolvimento de culturas e sistemas microbianos específicos para a manutenção da qualidade de água.

Segundo Chang et al. (2019), existem três tipos de bactérias benéficas usadas na aquicultura: 1) bactérias que podem manter a qualidade da água, como as bactérias nitrificantes, 2) bactérias para bioaumento envolvidas na remoção de compostos orgânicos e 3) probióticos (intestinais) para os animais cultivados. A investigação sobre a comunidade microbiana e as formas de manipulá-la é essencial para otimizar os sistemas de cultivo aquícolas, com vistas ao aumento da produtividade e controle de enfermidades, contribuindo para a sustentabilidade do setor e o pleno estabelecimento da Aquicultura ESG.

2.2 Microrganismos Eficientes

A utilização de Microrganismos Eficientes (ME), proposta pelo professor Dr. Teruo Higa em meados da década de 1980, consiste na utilização da microbiota presente em ambientes conservados os quais participam na ciclagem de nutrientes, disponibilizando-os para as plantas a partir da matéria orgânica do solo (Higa e Parr, 1994). Esses microrganismos são decompositores facultativos, fotossintetizantes, entre outros, que podem promover o crescimento e desenvolvimento vegetal. Apesar de conhecida há muito tempo, essa técnica ganhou atenção nos últimos anos, com o início da produção agroecológica. Santos et al. (2020), por exemplo, confirmam que esses microrganismos contribuem para maior produção, melhor proteção fitossanitária, além do fato da sua utilização ser uma técnica de baixo custo, otimizando os lucros da produção, principalmente as de cunho familiar.

Microrganismos são seres que exercem uma função primordial, desde a captação de energia solar, até suas transformações no solo e na água. Podem ser separados em dois grandes grupos. Os microrganismos degenerativos que produzem em seu metabolismo primário a amônia (NH_3) e sulfeto de hidrogênio (H_2S), cuja ação é prejudicial às plantas com aumento da rigidez dos solos impedindo seu crescimento e favorecendo o surgimento de doenças e pragas. Além desses, temos os microrganismos regenerativos que produzem substâncias orgânicas úteis às plantas via metabolismo secundário, os quais podem produzir hormônios e vitaminas, melhorando as propriedades biológicas, físicas e químicas do solo. Nesse grupo estão os ME encontrados naturalmente em solos férteis e em algumas plantas (Higa e Parr, 1994).

Quatro grupos de microrganismos compõem o grupo dos ME: leveduras, actinomicetos, bactérias produtoras de ácido lático e bactérias fotossintetizantes. As leveduras utilizam substâncias liberadas pelas raízes das plantas, sintetizam vitaminas e ativam outros microrganismos eficazes do solo. Actinomicetos controlam fungos e bactérias patogênicas e aumentam a resistência das plantas. Bactérias produtoras do ácido lático controlam alguns microrganismos nocivos, como o *Fusarium*, porém não liberam nutrientes às plantas devido à fermentação da matéria orgânica. Já as bactérias fotossintetizantes utilizam substâncias excretadas pelas raízes das plantas para a síntese de vitaminas, nutrientes, aminoácidos, ácidos nucleicos, substâncias bioativas e açúcares, que beneficiam o crescimento das plantas (Andrade et al., 2011).

Os microrganismos decompositores geralmente apresentam uma coloração característica podendo ser rosa, azul, amarelo e alaranjado, os quais retiram da matéria orgânica os seus nutrientes resultando em compostos menores que são liberados no ambiente. Esses compostos são nutrientes e vitaminas que servem para a própria comunidade microbiana, além de animais e plantas do meio. Também liberam alguns compostos que aumentam a resistência das plantas aos insetos e algumas doenças. A decomposição da matéria orgânica no solo faz proliferar alguns grupos de microrganismos que estruturam-no evitando a compactação, aumentando a porosidade e a infiltração de água, bem como a profundidade de enraizamento. Outros benefícios são a redução da erosão e da frequência de irrigação (Begon et al., 2007).

A utilização de ME em meios líquidos para a biorremediação tem se mostrado promissora considerando serem facilmente obtidos e não prejudiciais ou patogênicos (Lananan et al., 2014; Massa et al., 2017; Leong et al. 2019; Dong et al., 2020, Rempel et al., 2021). Dentre os microrganismos promissores para as aplicações aquícolas, as bactérias púrpuras não-sulfurosas (BPNS) vêm ganhando destaque pela eficiência na remoção de compostos indesejáveis como nitrogenados e fosfatados e controle de patógenos (Klamt et al., 2008; Chandrasekaran e Kumar, 2011; Shapawi et al., 2012; Dong, et al., 2020; Monroy e Buitrón, 2020; Alloul et al., 2021).

Em linhas gerais, apesar de alguns trabalhos terem observado que a adição de ME em sistemas aquaculturais melhora a qualidade da água e o crescimento e a resistência às doenças, por outro lado, esses resultados variam de acordo com o sistema de cultivo, a disponibilidade de nutrientes e oxigênio e da composição da microflora (Al Azad, e Ransangan, 2016; Zheng et al., 2017; 2019; Zhang et al., 2022; Miyasaka et al., 2023).

Apesar dessas limitações, diversos produtos vêm sendo lançados no mercado para diversas aplicações. Comercialmente, o termo empregado no Brasil pela indústria do setor de insumos aquícolas para esses produtos microbianos é “probiótico”. Segundo a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Hill et al., 2014). Estes microrganismos principalmente bactérias e leveduras, estão naturalmente presentes em alimentos fermentados, e podem ser adicionados a outros produtos alimentares. Isso, a princípio, limitaria o uso do termo aos microrganismos adicionados na ração, mas tem sido empregado também para os condicionadores de água.

Outros aditivos que vêm ganhando espaço no mercado são os prebióticos, definidos como substratos utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefício à saúde. Esta definição expande o conceito de prebióticos para outras substâncias além dos carboidratos, incluindo aplicações em outros locais do corpo que não o trato gastrointestinal e diversas categorias além de alimentos (Gibson et al., 2017). A combinação de prebióticos e probióticos recebe a denominação de simbióticos, produtos comerciais que contêm substratos prebióticos (açúcares) e organismos probióticos (microrganismos eficientes).

O mercado mundial de probióticos na produção animal deve atingir US\$ 7,1 bilhões até 2028, com um crescimento anual cumulado de 9,1%, considerando que a procura desses produtos biotecnológicos será impulsionada pelo aumento do uso nos mercados emergentes como da Ásia-Pacífico e da América do Sul (Market and Markets, 2024).

Considerando que cada vez mais os manejos aquícolas serão dependentes do uso de sistemas microbiológicos, alternativas de baixo custo com foco nos produtores familiares, sobretudo em regiões pouco desenvolvidas e com acesso restrito às novas (bio)tecnologias, devem ser incentivadas.

3. JUSTIFICATIVA

A utilização de técnicas de biorremediação com a utilização de processos de bioaumentação através do uso de microrganismos eficientes na aquicultura pode reduzir os custos de produção, por ser uma técnica simples e de baixo custo, que pode ser feita pelo próprio aquicultor. Nesse sentido, a pesquisa aqui proposta com o uso de microrganismos eficientes endógenos (MEE) representa uma perspectiva real de inovação biotecnológica, à medida que consistirá em validar cientificamente experimentos desenvolvidos em alguns empreendimentos no Maranhão pela AquaX Ltda., embora sem o necessário rigor científico.

Conhecer a cinética e a dinâmica da atenuação da carga poluidora, bem como as limitações do uso de sistemas baseados em consórcios microbianos para a biorremediação de sistemas/efluentes aquícolas é interesse tanto para a academia como para o setor produtivo local. Esse conhecimento torna-se ainda mais importante considerando as novas tecnologias da Aquicultura 4.0 que incluem sistemas de controle computadorizados, sistemas de inteligência artificial, *machine learning*, entre outras, que dependem primordialmente das informações geradas em ensaios experimentais (Yang et al., 2021; Dilmi e Ladjal, 2021; Zambrano et al., 2021; Zhao et al., 2021).

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de biorremediadores na concentração de compostos nitrogenados e fosfatados em meio líquido.

4.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de remoção de amônia, nitrito, nitrato, fósforo, óxido de fósforo e fosfato em função do tempo.
- Comparar o efeito da mudança de inóculo de MEE, BPNS e produto comercial na eficiência de remoção
- Monitorar parâmetros de qualidade de água durante as 24 h de ensaio

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Biorremediadores

Para a captura dos microrganismos eficientes endógenos - MEE, foram preparadas porções de 50-100 g de arroz cozido as quais foram ensacadas em tela de *nylon* de malha 1,0 mm, e distribuídas em diferentes pontos de mata ripária no Campus Dom Delgado da UFMA em São Luís, MA. Após 15 dias, essas “armadilhas” foram coletadas e as colônias de microrganismos localizadas na superfície do arroz foram selecionadas de acordo com a cor, segundo Merici et al. (2017) e Sousa et al. (2020). As colônias de coloração rosa, azul, amarelo e laranja foram consideradas como inóculos de microrganismos potencialmente eficientes e os de coloração escura (cinza, marrom e preto), potencialmente patogênicas, foram descartadas. Em seguida, essas pequenas porções de arroz contendo as colônias coloridas foram distribuídas em garrafas PET de 2 litros (n = 7) contendo solução aquosa de melaço de cana 5% (m/v) em água de abastecimento desclorada. As garrafas foram fechadas e armazenadas em temperatura ambiente entre 10 e 20 dias, com abertura diária das tampas para retirada do excesso de gás formado pelo processo fermentativo.

Além dos MEE (Figura 2) bioprospectados no Campus da UFMA, foram utilizados dois produtos que estão no mercado nacional. Um meio líquido contendo inóculo de bactérias BPNS (Aquário Sobrinho, Vila Velha, ES - Figura 3) e prebióticos (glutamato monossódico, ovo, óleo de peixe e água de tanque de piscicultura), e um formulado comercial Stability® (Seachem, USA) contendo uma mistura de bactérias fixadoras aeróbicas, anaeróbicas e facultativas não sulfurosas (Seachem, 2011).

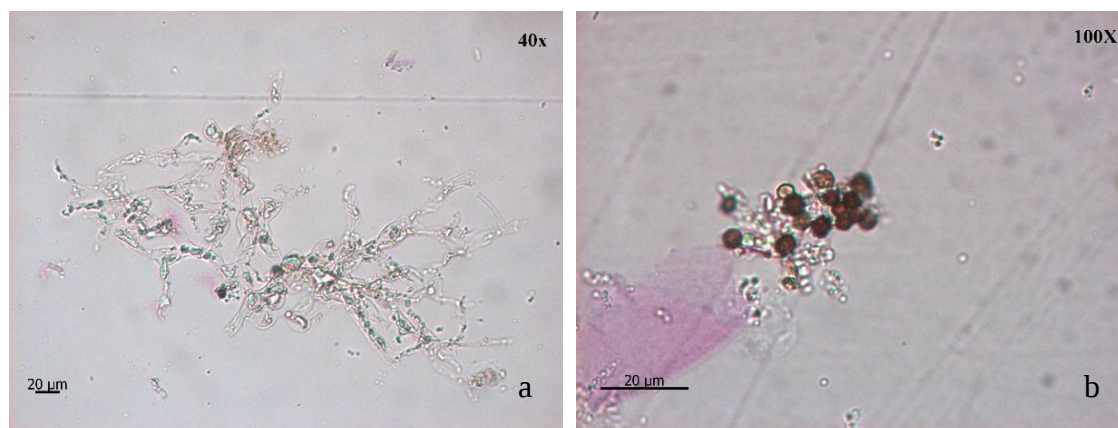


Figura 2. Microfotografia dos Microrganismos Eficientes Endógenos (MEE) prospectados no Campus da UFMA, coradas com Fucsina Básica, observadas sob microscópio óptico. Aumento de 40x (a) e 100x (b).

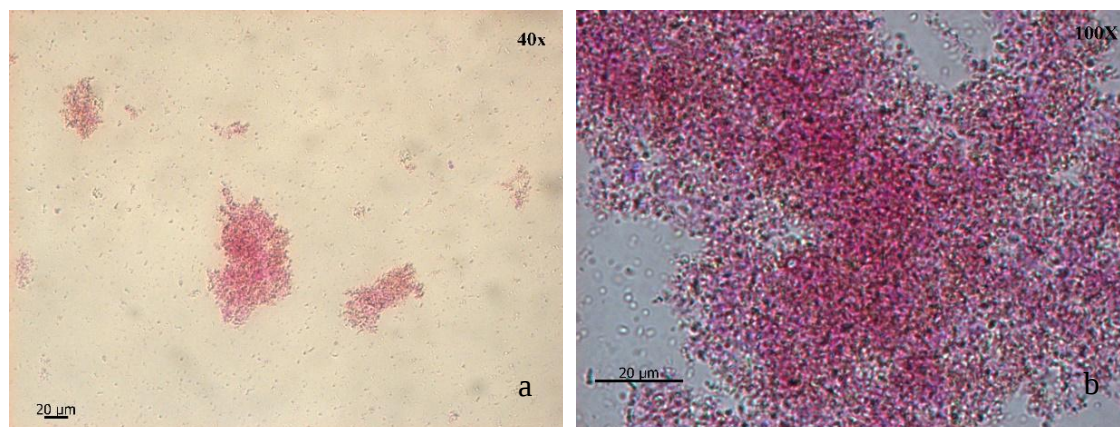


Figura 3. Microfotografia das Bactérias Púrpuras Não-Sulfurosas (BPNS) adquiridas da Aquário Sobrinhos (Vila Velha, ES), coradas com Fucsina Básica, observadas sob microscópio óptico. Aumento de 40x (a) e 100x (b).

5.2. Planejamento Experimental

A água utilizada nos ensaios foi proveniente de abastecimento público, a qual foi desclorada por aeração, cuja ausência de resíduos de cloro foi confirmada com kit colorimétrico baseado no método DPD (dietil-p-fenilenodiamina) (Labcon, SC, Brasil). Em seguida, foi preparada uma solução estoque contendo os fertilizantes à base de nitrogênio e fósforo, seguindo método empregado em tanques de cultivo com tecnologia BFT (Samocha et al., 2007). Para tal, foram dissolvidos ureia (Fertipar®, 99% de pureza) e superfosfato triplo (Fertipar®, 99% de pureza), nas quantidades de 5 mg/L e 0,3 mg/L, respectivamente. A relação C/N do sistema foi mantida em 15/1 utilizando-se açúcar comum (C 42%, H 6% e O 52%) com base na concentração de nitrogênio amoniacal, de acordo com a metodologia proposta por Avnimelech (1999) e Ebeling et al. (2006), sem a adição de farelos como substrato para fixação dos microrganismos, o que poderia aumentar a turbidez do meio. Essa solução nutritiva estoque foi preparada em tanque circular de 500 L sob movimentação constante (bomba submersa 2.000 L/h) e monitorada por 7 dias até a estabilização dos níveis de amônia próximo de 4 mg/L, considerado crítico e frequente para a maioria dos cultivos intensivos no Maranhão (AquaX, s.d.).

Foram utilizadas 12 caixas plásticas (cor preta) tipo gaveteiro (BIN nº07, SIPLAS®, RS), medindo 165 x 210 x 330 mm (A x L x P) dispostas em prateleira de forma agrupada para minimizar a contaminação por aerossóis. Foram preparados três tratamentos além do controle (sem adição de biorremediador), em triplicata, os quais foram constantemente aerados com pedra porosa difusora de ar fornecido por um soprador (18 m³/h, SunSun HG-180, China). A sala foi mantida sem controle de

temperatura (27,7 a 28,5°C) com fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro com luz indireta natural e artificial (4 lâmpadas fluorescente tubular de 40W branca 6.500 K).

5.3. Análises dos Parâmetros Físico-químicos da Água

Antes da aplicação dos biorremediadores, foram determinados os parâmetros físico-químicos com auxílio de uma sonda multiparâmetro (Akso, modelo AK88, Brasil) previamente calibrada com solução própria fornecida pelo fabricante, a saber: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (CE). Além disso, amostras de água (100 mL) foram coletadas e congeladas -20°C até posterior análise. Essas amostras corresponderam ao tempo 'zero'. Em seguida, foi aplicada uma única dose de 1ml de biorremediador em cada uma das três réplicas de cada grupo experimental (exceto no branco), seguindo recomendação dos fabricantes (Aquário Sobrinho - BPNS e Seachem - STBY), e no caso do MEE, com base em resultados prévios obtidos em tratamentos feitos em pisciculturas locais (Aqua s.d.). Nos tempos 6, 12 e 24 h pós tratamento, novas amostras foram coletadas de cada grupo experimental e congeladas até o momento das análises (dentro de no máximo 2 semanas). Também foram determinados os parâmetros físico-químicos em cada um dos tempos em todos os tratamento e réplicas.

A alcalinidade e a dureza foram determinadas por método colorimétrico utilizando o kit Acqua Supre®, segundo método titulométrico (APHA, 2017). A amônia (NH₃) foi determinada em fotômetro de bancada (Hanna, modelo HI-83099, USA) utilizando kit colorimétrico Hanna (HI 93715) em comprimento de onda de 575 nm, adaptado do método Nessler (APHA, 1995). A concentração de nitrito (NO₂⁻) foi determinada com kit Hanna (HI 93707) utilizando uma adaptação do método de sulfato de ferro e medido em 525 nm. O nitrato (NO₃⁻) foi determinado com kit colorimétrico Hanna (HI 93728) baseado no método de redução de cádmio (APHA, 1995). O fósforo (P-PO₄⁻³) e o óxido de fósforo foram determinados com kit colorimétrico Hanna (HI 93713) adaptado do método de ácido ascórbico (APHA, 1995).

A concentração de dióxido de carbono (CO₂) dissolvido na água foi estimada segundo a metodologia proposta por Timmons et al. (2002), conforme fórmula a seguir:

$$[CO_2] = \text{alcalinidade} \times 10^{(6,3-pH)}$$

5.4. Tratamento Estatístico

Os dados foram submetidos à análise de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Leneve), sendo considerados não-paramétricos, e dessa forma, as médias dos diferentes grupos experimentais nos diferentes tempos foram comparadas seguindo o teste GLM (5%) com auxílio do programa R versão 4.4.0 (R Core Team, 2019).

A taxa de degradação (Tx_{degrad}) da amônia (NH_3) e do fósforo (P) foi determinada conforme o método descrito por Henze et al (2008) e Chen et. Al (2023), conforme fórmula a seguir:

$$Tx_{degrad} = \frac{\Delta[NH_3 \text{ ou } P]}{\Delta[t]}$$

Onde:

- $\Delta[NH_3 \text{ ou } P]$: variação na concentração (em mg/L);
- $\Delta[t]$: intervalo de tempo em a variação foi medida (em horas).

Parâmetros de qualidade de água selecionados em função da análise de comparação entre médias foram submetidos à normalização visando uniformizar as escalas das diferentes análises, permitindo uma comparação entre eles. Os dados foram normalizados (x') utilizando a transformação conforme fórmula a seguir:

$$x' = \frac{x}{x_{max}}$$

Onde:

- x : valor do dado;
- x_{max} : valor máximo no conjunto de dados.

6. RESULTADOS

Os ensaios foram conduzidos em laboratório sem controle de temperatura, com o objetivo de simular uma condição semelhante à frequentemente encontrada nos empreendimentos localizados no Maranhão, ou seja, com temperaturas elevadas típicas da região com médias anuais superiores a 26°C (NUGEO, 2016). A temperatura média do ar ficou em 28,2°C (máximo de 28,5°C e mínimo de 27,7°C) durante as 24 h de experimento

6.1. Temperatura

A temperatura da água nos tratamentos ficou em 28,35°C (máximo 28,9°C e mínimo 27,8°C), sendo que não houve diferença significativa da temperatura entre os tratamentos e entre os tempos amostrados ($p>0,05$).

6.2. Oxigênio Dissolvido

Com relação ao oxigênio dissolvido, em todos os tratamentos houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nas primeiras 6 h (cerca de 24%) permanecendo em torno de 6,5 mg/L até o final do experimento, o que representa cerca de 85% de saturação de oxigênio (Figura 4).

Essa diminuição pode estar associada à discreta elevação ($p>0,05$) da temperatura da sala após o início do experimento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$) em todos os tempos amostrados.

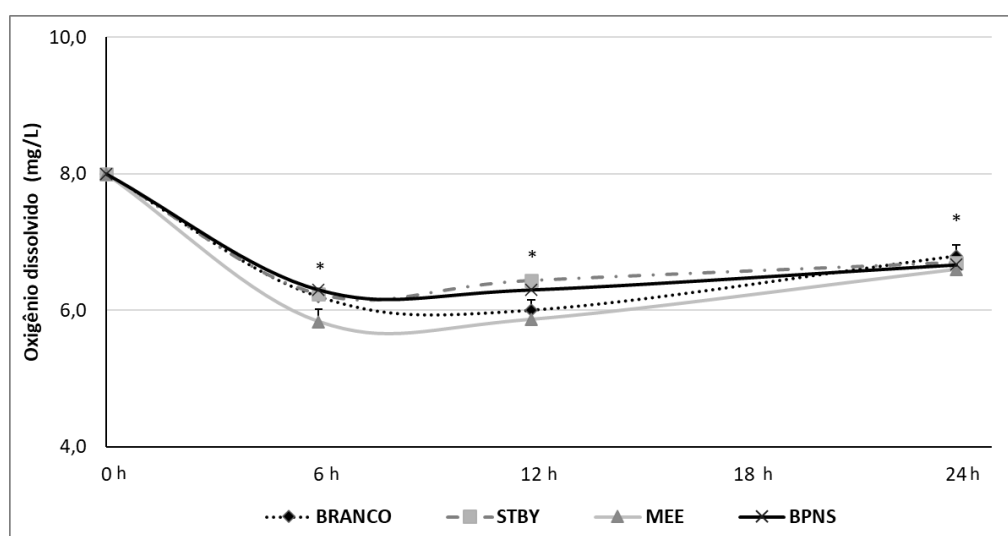


Figura 4. Valores de oxigênio dissolvido (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes (GLM, $p<0,05$) em relação ao tempo ‘zero’.

6.3. pH

Houve efeito significativo no pH ($p < 0,05$) entre os tratamentos e ao longo do tempo (Figura 5). Foi observada uma diminuição do pH no controle (branco) às 12 h com posterior aumento do valor às 24 h (em relação ao tempo zero), sendo que nenhum dos biorremediadores exibiu o mesmo comportamento.

O tratamento STBY manteve os níveis de pH semelhantes ao início até as 24 h quando aumentou em relação ao tempo zero ($p < 0,05$). No tratamento com MEE e BPNS, houve diminuição do pH logo às 6 h, com retorno aos valores iniciais às 12 h e aumento do pH às 24 h.

Considerando a comparação entre os tratamentos no mesmo tempo, nota-se que houve uma diminuição do pH no grupo MEE às 6 h, aumento do pH nos três biorremediadores às 12h (sendo maior no ME, $p < 0,05$), e diminuição do pH às 24h somente no tratamento com STBY.

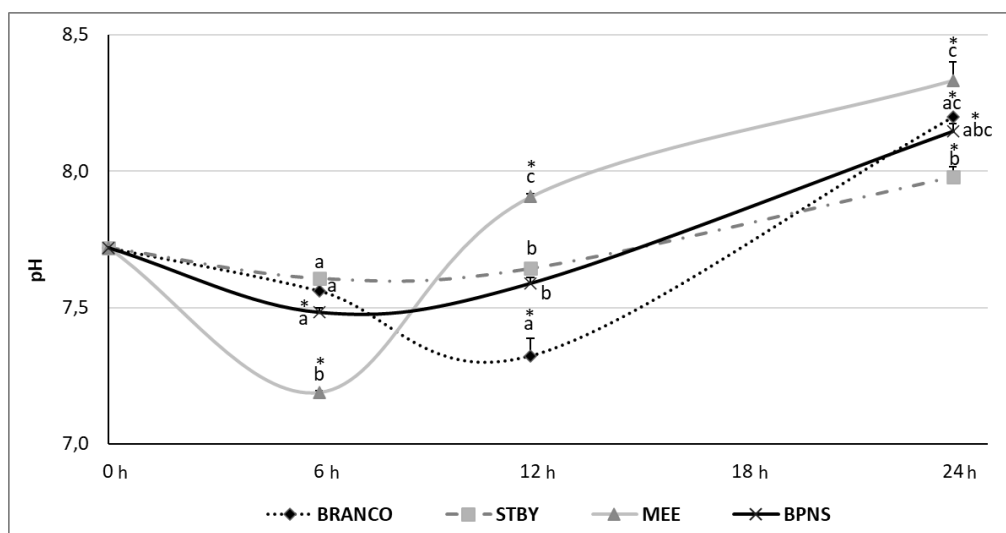


Figura 5. Valores de pH (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.4. Condutividade Elétrica

Com relação à condutividade elétrica (CE), houve aumento nos valores em relação ao início do experimento somente às 24 h no controle e no tratamento com MEE ($p < 0,05$), e nesse caso, a CE foi maior que a observada no controle ($p < 0,05$) (Figura 6). Não houve variação da CE nos tratamentos com STBY e BPNS ($p > 0,05$).

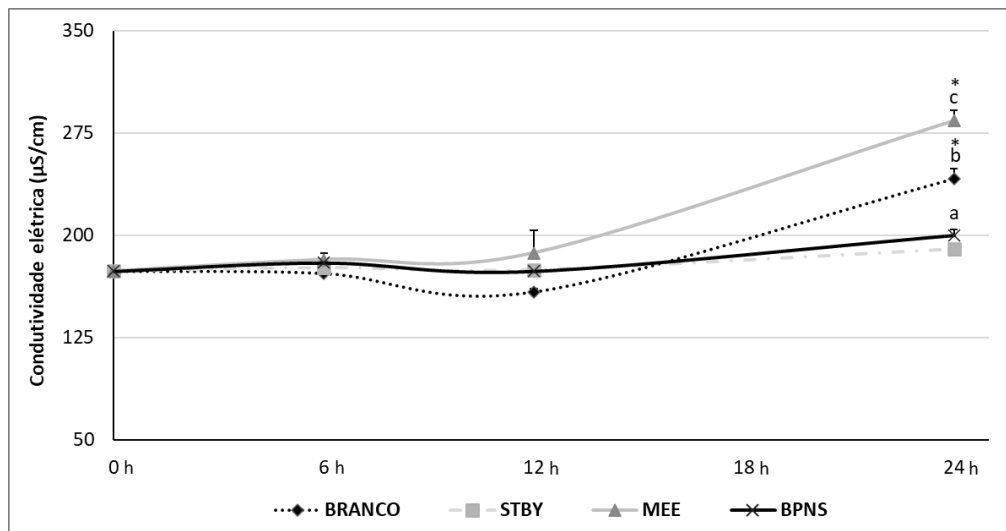


Figura 6. Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.5. Alcalinidade

A alcalinidade não variou no grupo controle durante as 24 h de ensaio ($p > 0,05$). No entanto, variou em relação ao tempo nos tratamentos com biorremediadores ($p < 0,05$) (Figura 7). No caso dos MEE, houve diminuição da alcalinidade às 6 h com posterior aumento expressivo às 12 h (266%) permanecendo elevado às 24 h. As BPNS também consumiram a alcalinidade às 6 h sem (menor em relação aos MEE), retornando ao nível semelhante ao início do experimento (zero) às 12h, seguido de um aumento de 33% às 24h ($p < 0,05$). No caso do STBY, a alcalinidade aumentou somente às 24 h em níveis semelhantes ao observado nas BPNS neste tempo ($p > 0,05$).

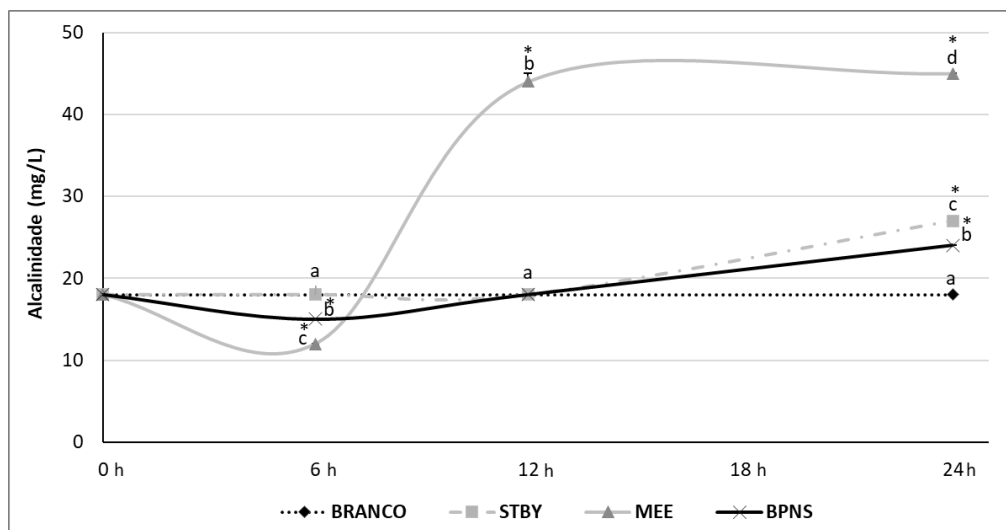


Figura 7. Valores de alcalinidade (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O ‘*’ indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$)

6.6. Dureza

No geral, a dureza aumentou ao longo do tempo ($p < 0,05$), inclusive no controle a partir das 12 h, sendo que nos tratamentos com os biorremediadores, foi verificada certa oscilação entre as 6 e 12 h de ensaio (Figura 8). Às 6 h os tratamentos com os biorremediadores tiveram aumento da dureza, sendo mais pronunciado nos ME ($p < 0,05$) em relação aos demais. Às 12 h STBY teve o maior aumento ($p < 0,05$), seguido por EEM, sendo que BPNS retornou aos valores iniciais (tempo zero), com valor médio menor que o observado no controle ($p < 0,05$). Às 24 h, a dureza dos tratamentos com STBY e MEE diminuíram em relação ao tempo 12 h, enquanto no tratamento com BPNS aumentou, sendo que todos os biorremediadores apresentaram valores moderadamente elevados no final do ensaio em relação ao tempo zero ($p < 0,05$), com valores de dureza semelhantes entre si ($p > 0,05$).

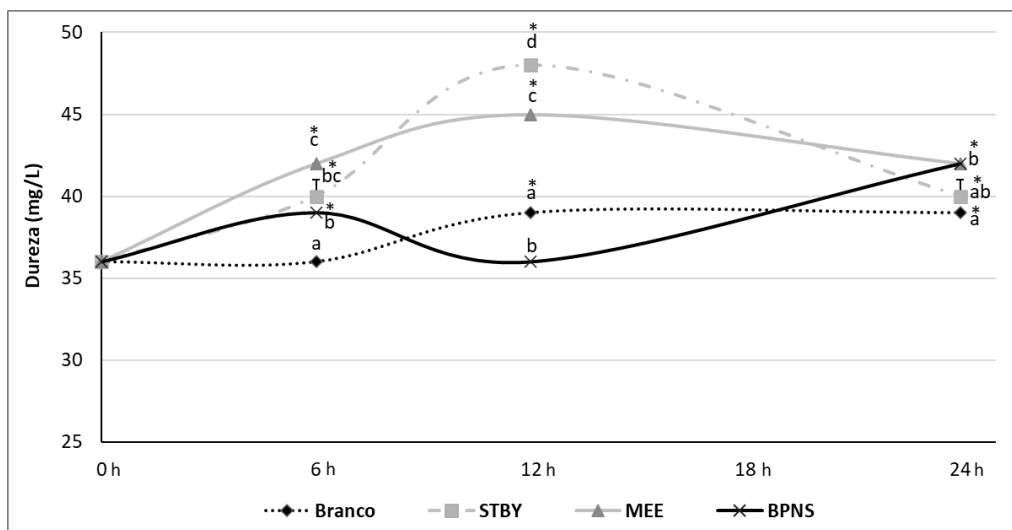


Figura 8. Valores de dureza (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.7. Amônia

Com relação à concentração de amônia, no geral, houve uma diminuição dos valores até as 24 h de ensaio ($p < 0,05$), sendo que a única exceção foi no tratamento com EM às 24 h quando houve um aumento expressivo da concentração de amônia superando em 88% o valor inicial (tempo zero) (Figura 9).

O STBY reduziu a concentração de amônia a partir das 12 h, sendo que às 24 h foi observada uma redução de 85% em relação ao valor inicial ($p < 0,05$). As BPNS exibiram capacidade semelhante na redução da amônia, sendo que a diminuição correu a partir das 6 h de tratamento ($p < 0,05$) reduzindo, ao final do ensaio, cerca de 90% em relação ao valor inicial (tempo zero).

Apesar do tratamento com MEE também ter sido efetivo logo nas primeiras horas, reduzindo a amônia em 60% às 12 h ($p < 0,05$), foi observada uma anomalia, com aumento expressivo da concentração de amônia às 24 h ($p < 0,05$), de cerca de 370% em relação ao tempo anterior (12 h).

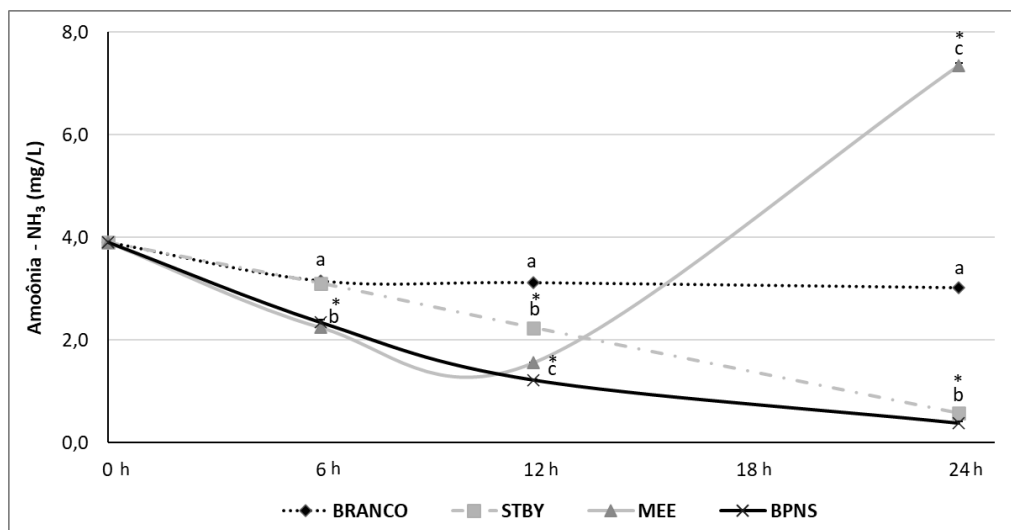


Figura 9. Valores de amônia (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O “*” indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.8. Nitrito

Os níveis de nitrito permaneceram constantes no controle até o final das 24 h de ensaio ($p > 0,05$), sendo que nos demais tratamentos, no geral, os níveis aumentaram ao longo do tempo ($p < 0,05$) (Figura 10). No tratamento com STBY os níveis de nitrito aumentaram logo às 6 h ($p < 0,05$), cuja concentração de nitrito permaneceu nestes níveis até às 24 h.

Comportamento semelhante foi observado no tratamento com PBNS, ou seja, aumento às 6 h e manutenção dos níveis até as 24 h, no entanto, em valores médios de concentração menores quando comparado com o STBY ($p < 0,05$). No caso do tratamento com ME, após o aumento às 6 h, os valores diminuíram progressivamente ($p < 0,05$) até as 24 h sem retornar aos níveis iniciais do tempo zero ($p < 0,05$).

6.9. Nitrato

Os valores de nitrato estiveram abaixo do limite de quantificação do método (0,1mg/L) em todos os tratamentos e tempos.

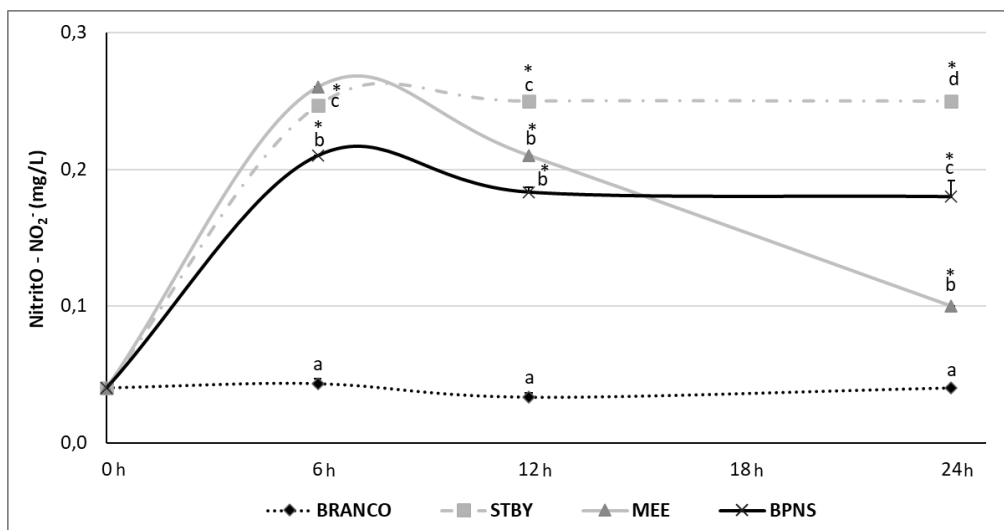


Figura 10. Valores de nitrito (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O “*” indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo ‘zero’ (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.10. Pentóxido de Fósforo

Considerando os compostos fosfatados, o pentóxido de fósforo (P_2O_5), forma como o fósforo é comercializado como fertilizante o qual foi utilizado na preparação dos meios líquidos para os ensaios, as concentrações diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos tratamentos logo às 6 h em níveis semelhantes nos quatro tratamentos ($p > 0,06$) (Figura 11). Os tratamentos com STBY e MEE permaneceram em níveis semelhantes aos das 6 h até as 24 h ($p > 0,05$). No entanto, o controle e BPNS apresentaram redução até as 12 h ($p < 0,05$) mantendo-se nesses níveis até as 24 h de ensaio.

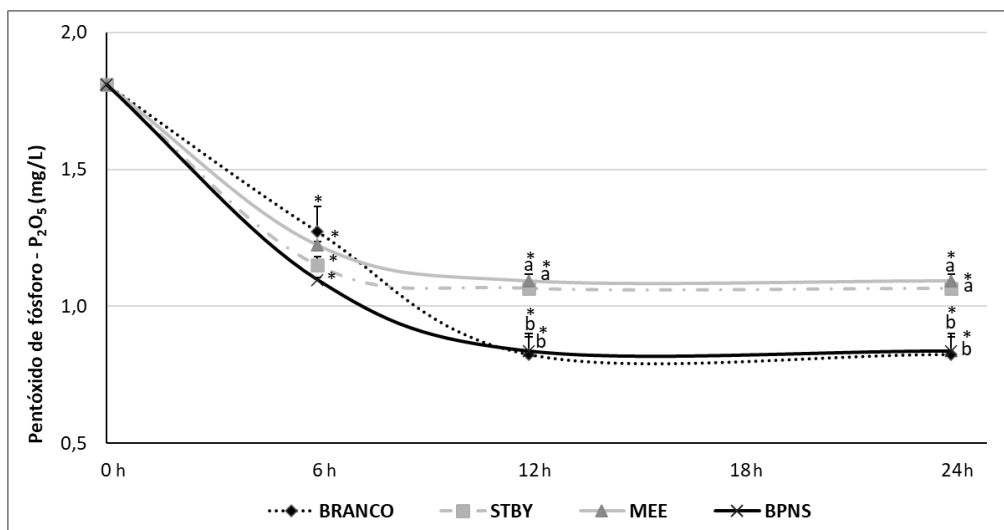


Figura 11. Valores de pentóxido de fósforo (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.11. Fosfato e Fósforo

O fosfato (PO_4^{3-}) e o fósforo elementar (P-PO_4^{3-}) diminuíram significativamente nos tratamentos com BPNS e MEE ($p < 0,05$), logo às 6 h, sendo que para ambos, a diminuição foi maior no tratamento com BPNS ($p < 0,05$) (Figuras 12 e 13). A redução de fosfato no tratamento com MEE foi de 41% e de fósforo foi 39%, enquanto que no tratamento com BPNS foi de 64% e 54%, respectivamente.

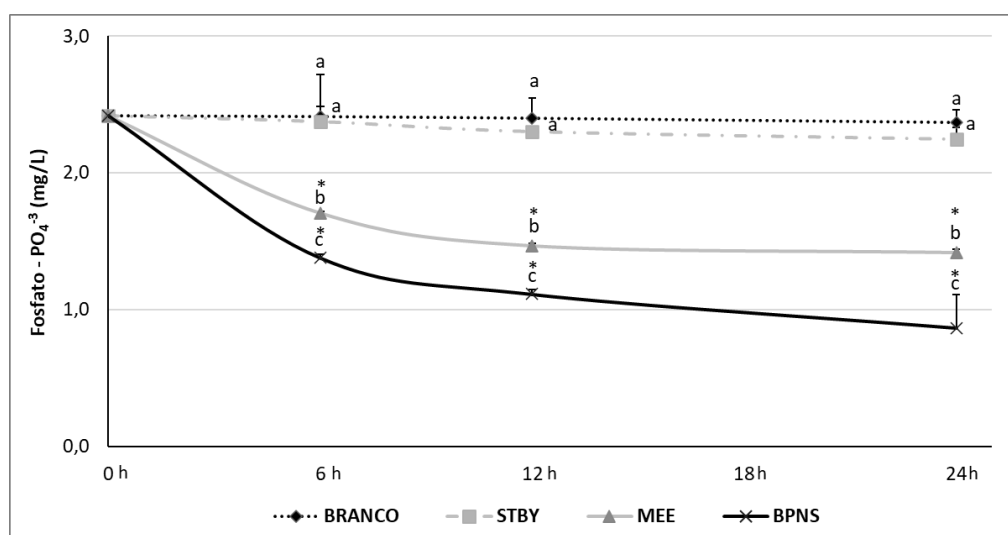


Figura 12. Valores de fosfato (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

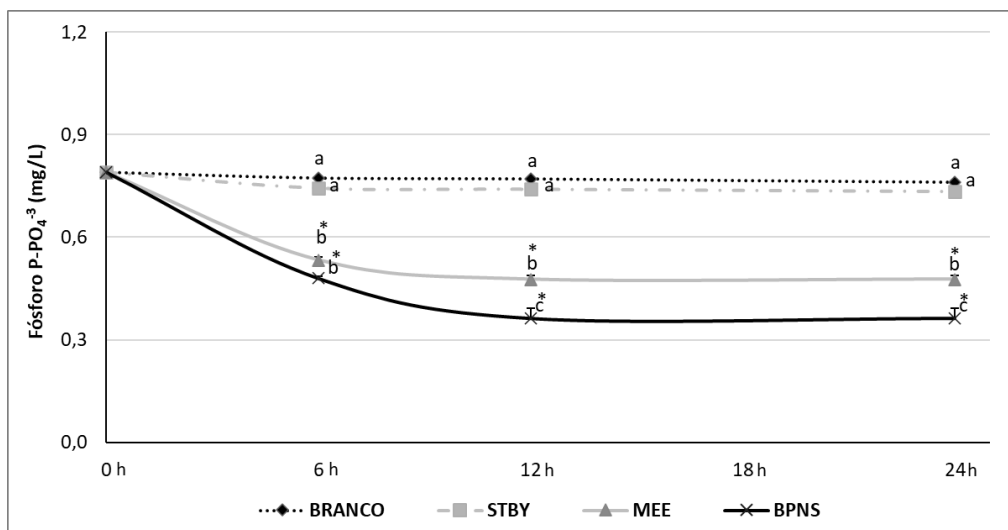


Figura 13. Valores de fósforo (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.12. Dióxido de Carbono

Com relação ao dióxido de carbono, não houve variação significativa ($p > 0,05$) nos tratamentos STBY e BPNS (Figura 14). No entanto, houve um aumento significativo nos valores de CO₂ no controle às 12 h e diminuição (inclusive em relação ao tempo zero) às 24 h ($p < 0,05$). No caso do MEE, o aumento ocorreu logo às 6 h pós tratamento com diminuição progressiva até às 24 h, em níveis semelhantes ao tempo zero ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos no tempo 24 h.

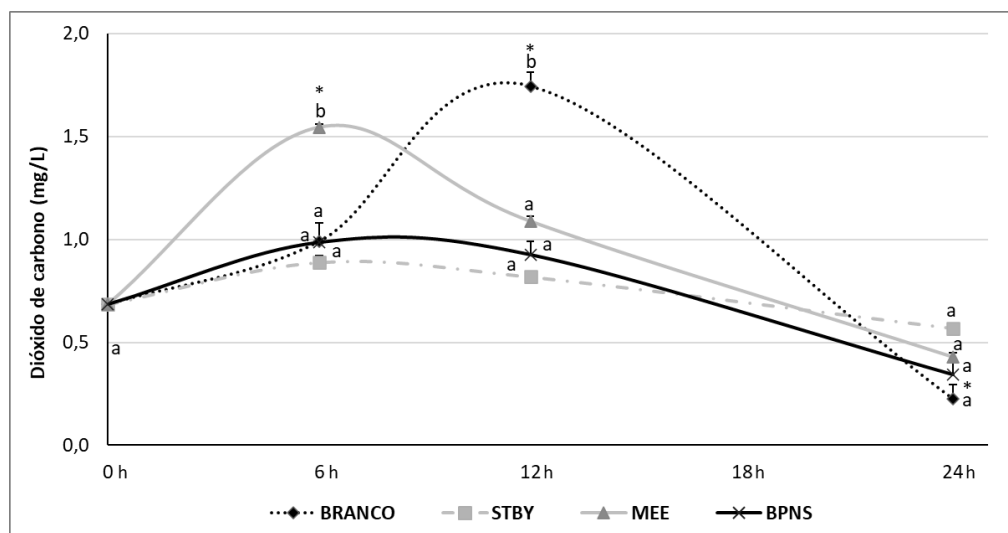


Figura 14. Valores estimados de dióxido de carbono (mg/L) (média + erro padrão) no grupo controle (branco) e nos tratamentos com biorremediadores. O '*' indica valores significativamente diferentes em relação ao tempo 'zero' (GLM, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos no mesmo tempo (GLM, $p < 0,05$).

6.13. Relação pH - alcalinidade - dureza - CO₂ com dados normalizados nos diferentes tratamentos

As Figuras 15 a 18 ilustram os dados normalizados ao longo do tempo das variáveis envolvidas no sistema tampão da água: CO₂, alcalinidade, dureza e pH.

No controle, observou-se pouca variação do pH, alcalinidade e dureza, sendo que o CO₂ apresentou uma tendência de elevação até as 12 h, seguido de queda às 24 h.

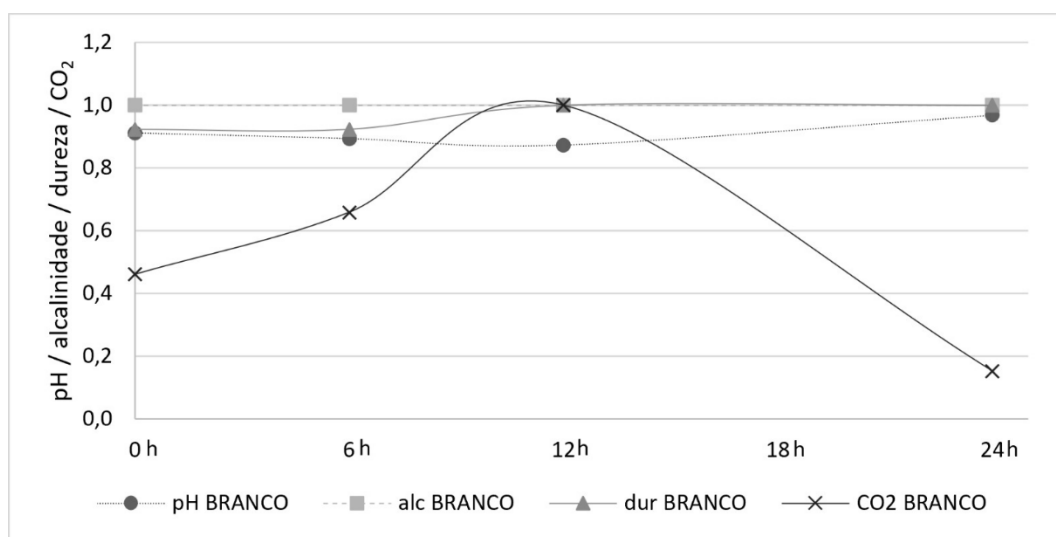


Figura 15. Relação pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico com dados normalizados no grupo controle (branco).

No tratamento com STBY, o pH apresentou certa estabilidade ao longo do tempo. A alcalinidade subiu às 24 h, enquanto a dureza teve um aumento até as 12 h seguido de queda às 24 h. O CO₂ subiu às 6 h seguido de queda até as 24 h.

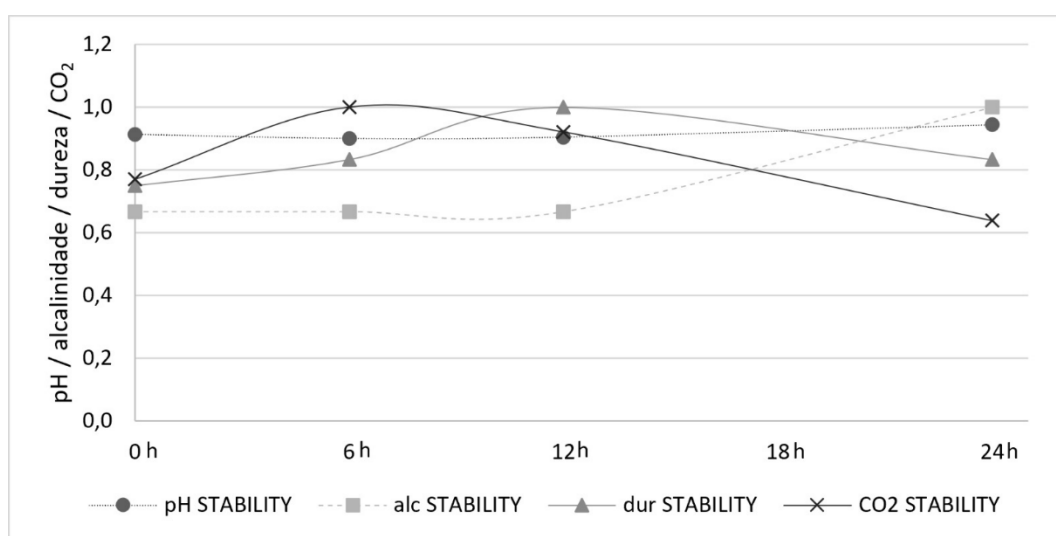


Figura 16. Relação pH, alcalinidade, dureza, gás carbônico com dados normalizados no tratamento STBY.

No tratamento com MEE, o pH apresentou pouca variação, com uma queda discreta às 6 h e também discreta elevação até o final do ensaio. A alcalinidade teve uma leve queda às 6 h seguida de uma elevação pronunciada às 12 h, permanecendo assim até as 24 h. A dureza apresentou um discreto aumento até as 12 h mantendo-se estável até as 24 h. O CO₂ subiu às 6 h seguido de queda até as 24 h, porém de forma mais intensa do que o observado no tratamento com STBY.

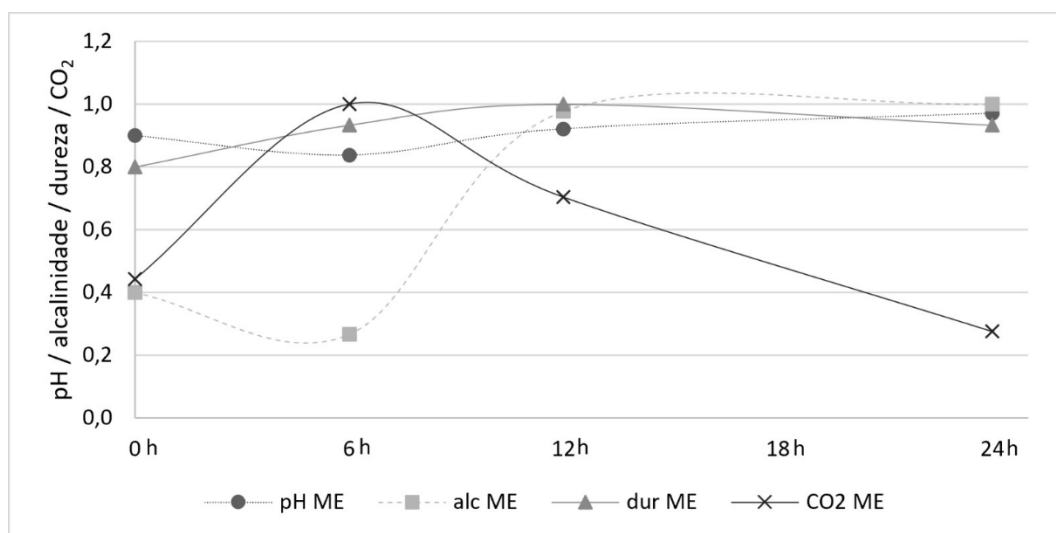


Figura 17. Relação pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico com dados normalizados no tratamento MEE.

No tratamento com BPNS, o pH apresentou pouca variação ao longo do tempo. A alcalinidade teve uma leve queda às 6 h seguida de uma elevação até as 24 h. A dureza apresentou uma discreta oscilação ao longo do tempo, sendo que o CO₂ subiu às 6 h seguido de queda até as 24 h.

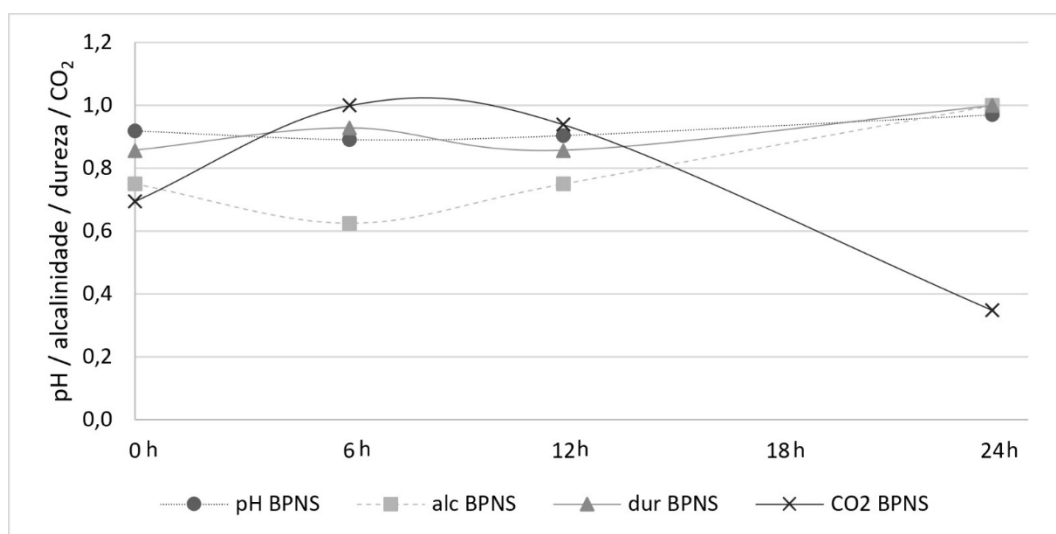


Figura 18. Relação pH, alcalinidade, dureza e gás carbônico com dados normalizados, no tratamento BPNS.

6.14. Linhas de tendência com dados normalizados agrupados por variável analisada (pH, alcalinidade, dureza e dióxido de carbono) nos diferentes tratamentos.

A Figura 19 apresenta as curvas de tendência com o comportamento com os valores médios normalizados das variáveis relacionadas ao sistema tampão agrupados por tratamento. Nesta comparação fica evidente a estabilidade do pH e maior variação da alcalinidade.

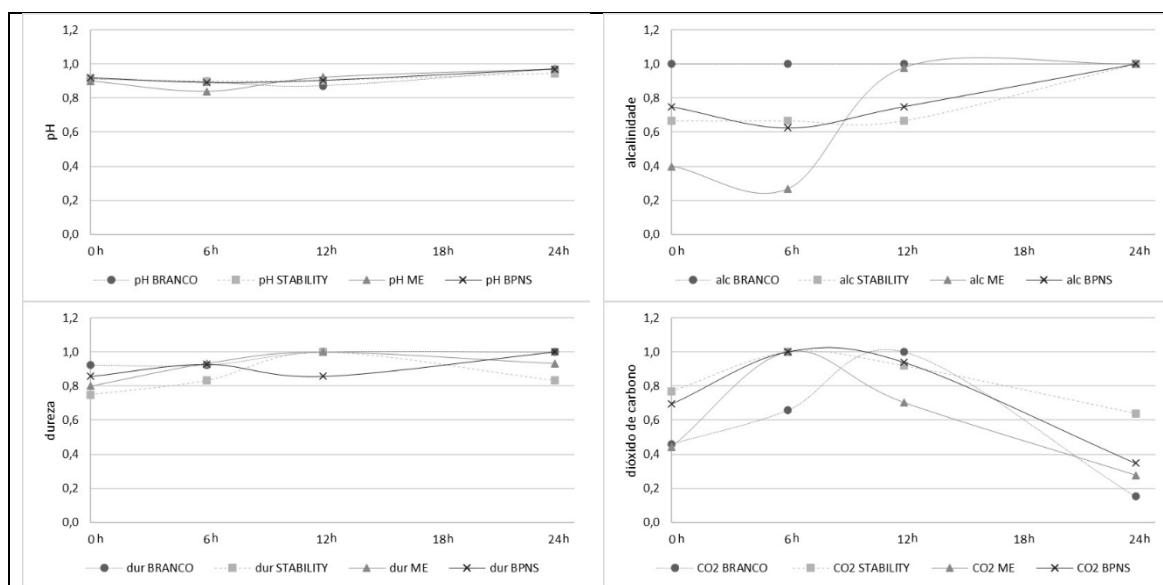


Figura 19. Linhas de tendência com dados normalizados agrupados por variável analisada (pH, alcalinidade, dureza e dióxido de carbono) nos diferentes tratamentos.

6.15. Variação de NH_3 e NO_2^- , com dados normalizados, nos diferentes tratamentos.

A Figura 20 apresenta as relações entre amônia e nitrito (dados normalizados) nos tratamentos. No controle, é possível observar que há uma discreta diminuição dos valores de amônia e uma também discreta oscilação dos valores de nitrito. Por outro lado, no tratamento com STBY e BPNS, observa-se uma queda da amônia ao longo tempo (mais acentuada em BPNS) e uma elevação do nitrito às 6 h.

No tratamento com STBY houve uma manutenção neste patamar até as 24 h de ensaio, enquanto no tratamento com BPNS, ocorreu uma leve queda às 12 h antes dessa estabilização. O tratamento com MEE foi bem diferente em relação aos demais biorremediadores, sendo que houve queda da amônia até as 12 h, seguida de uma abrupta subida às 24 h. O nitrito subiu logo às 6 h e depois caiu até as 24 h.

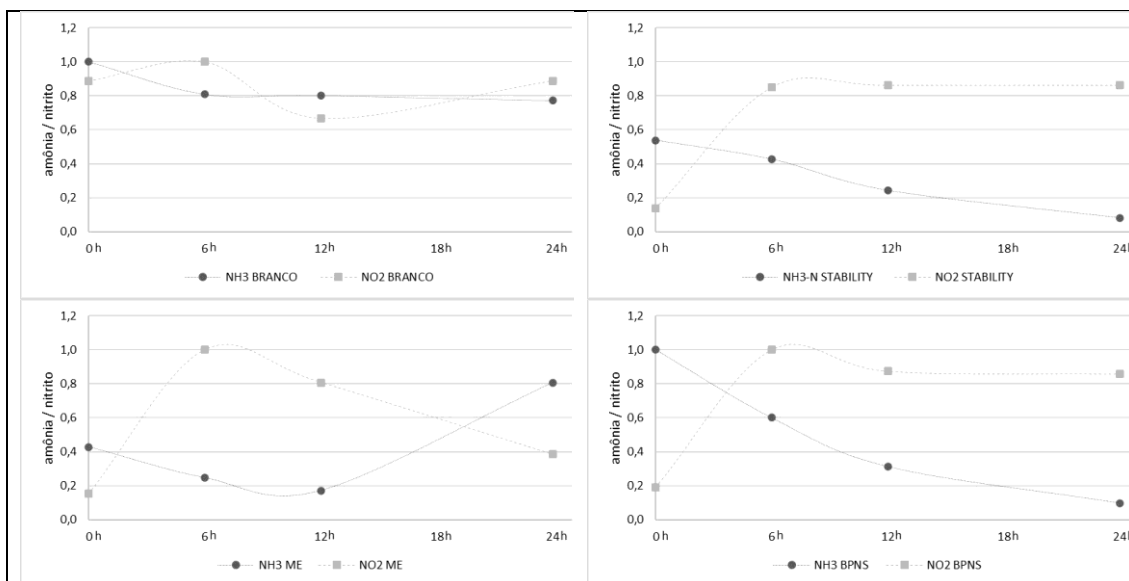


Figura 20. Variação de NH_3 e NO_2^- com dados normalizados nos diferentes tratamentos.

6.16. Linhas de tendência com dados normalizados agrupados de fósforo nos diferentes tratamentos.

A figura 21 apresenta o comportamento dos parâmetros de fósforo nos diferentes tratamentos, evidenciando a maior eficiência de MEE e BPNS no consumo desse nutriente.

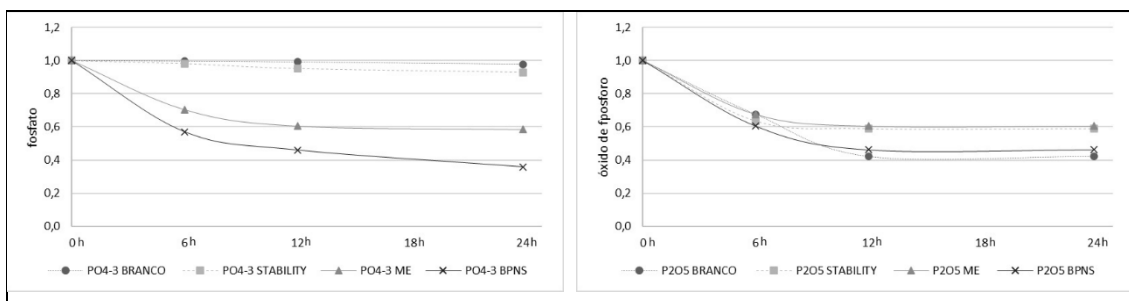


Figura 21. Linhas de tendência com dados normalizados de fosfato e óxido de fósforo nos diferentes tratamentos.

6.17. Taxa de consumo (%) de amônia e fósforo nos intervalos de tempo das análises nos diferentes tratamentos e o acumulado em 24 h.

O percentual de consumo de amônia e fósforo/fosfato nos diferentes intervalos de tempo nos tratamentos com os diferentes biorremediadores, além do controle (branco), estão resumidos na tabela 1. Valores negativos do tratamento com MEE indicam a produção de amônia.

Tabela 1. Taxa de consumo (%) de amônia e fósforo (fósforo / fosfato) nos intervalos de tempo das análises nos diferentes tratamentos e o acumulado em 24 h.

Tratamento	Redução de amônia (%) no intervalo de tempo			Redução de amônia (%) acumulado
	0 a 6 h	6 a 12 h	12 a 24 h	0 a 24 h
Branco	19	1	4	23
STBY	20	28	74	85
MEE	42	31	-372*	-88*
BPNS	40	48	69	90

Tratamento	Redução de fósforo / fosfato (%) no intervalo de tempo			Redução de fósforo / fosfato (%) acumulado
	0 a 6 h	6 a 12 h	12 a 24 h	0 a 24 h
Branco	2 / 0	1 / 1	1 / 1	3 / 2
STBY	6 / 2	0 / 3	1 / 2	7 / 7
MEE	32 / 29	11 / 14	0 / 3	40 / 41
BPNS	39 / 43	24 / 19	0 / 22	54 / 64

* Produção de amônia

7. DISCUSSÃO

A remoção de compostos nitrogenados e fosfatados em sistemas aquáticos é governada por uma complexa interação dos fatores bióticos e abióticos. Entre os parâmetros abióticos, a disponibilidade de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, alcalinidade, dureza e condutividade elétrica influenciam significativamente a dinâmica e a eficiência dos processos de mobilização de nutrientes, afetando tanto a atividade dos microrganismos quanto a disponibilidade química para tais processos. A sinergia entre esses fatores determina, em última análise, a eficácia da remoção dos compostos indesejáveis pelos microrganismos, refletindo a complexidade e a interdependência das reações químicas e físico-químicas que governam os ecossistemas aquáticos.

A temperatura desempenha um papel crucial na influência destas reações no ambiente aquático, e além disso, exerce grande influência sobre o metabolismo da comunidade microbiana refletindo-se, por exemplo, nos processos de oxidação de nutrientes. Considerando os microrganismos eficientes, a faixa de temperatura ideal para o metabolismo dos consórcios microbianos situa-se entre 20°C e 40°C, com um intervalo considerado ótimo entre 30 e 37°C, onde se observa um efeito sinérgico entre as espécies (Higa, 1994). No caso das bactérias fotossintetizantes, como as BPNS, a faixa de temperatura ideal para o crescimento encontra-se entre 30°C e 35°C (Balloni et al., 1982). Dessa forma, temperaturas próximas a 30°C tendem a ser particularmente benéficas para o crescimento e metabolismo desses microrganismos úteis, o que sugere que a temperatura média mantida nos experimentos (28,5°C) foi satisfatória para a avaliação proposta neste estudo.

Houve um declínio de cerca de 24% (média) nos valores de OD a partir das 6 h de experimento, provavelmente em função do leve aumento da temperatura da sala (não significativo), e também devido à DBO associada aos substratos (fertilizantes) dos meios preparados, o que é comum em sistemas aquáticos eutróficos ou com elevadas cargas de nutrientes, incluindo tanques de cultivo (Seitzinger e Garber, 1987; Nielsen e Revsbech, 1990; Nicolaisen e Risgaard-Petersen, 2000; Giame e Teixeira, 2003; Daims et al., 2015). Com base nessas análises, acredita-se que o objetivo de simular uma condição semelhante aos tanques de cultivo, dentro das limitações óbvias, é claro, foi alcançado.

O nível mínimo de OD recomendado para os processos microbiológicos aeróbicos é de 2 mg/L (Giani e Teixeira, 2003; Souza et al., 2011), enquanto que para a manutenção da maioria dos sistemas de cultivo de espécies tropicais, os níveis de OD devem ser

superiores a 4 mg/L (Putra et al., 2020; Nagaraju, 2023). Os níveis de saturações de oxigênio superiores a 84% mantidos durante todo o experimento indicam uma condição aeróbica satisfatória, algo que se preconiza para tanques e viveiros. A aeração é indispensável nos sistemas aquícolas, pois além de disponibilizar OD em quantidade suficiente para os animais em cultivo, favorece os processos oxidativos (biodegradação aeróbica/respiração) além de inibir a proliferação de patógenos ou microrganismos produtores de compostos tóxicos (Chen et al., 2020). Nesse ponto, recomenda-se a manutenção de forte aeração do sistema durante o tratamento com biorremediadores, uma vez que deve haver abundância de oxigênio no meio, garantindo os processos oxidativos em curso.

As bactérias envolvidas no processo de assimilação de compostos nitrogenados e fosfatados atuam de forma mais eficiente em condições de pH situadas entre 7,0 e 8,5, sendo que desvios dessa faixa “ótima” podem diminuir a eficiência na remoção desses compostos (Winogradsky, 1892; Brock et al., 1994; Garrity et al., 2005). Durante os experimentos, os níveis de pH mantiveram-se em torno de 7,9. Contudo, no tratamento com MEE, observou-se uma variação entre 7,2 (MEE-6h) e 8,6 (MEE-24h). Essa diminuição do pH observado após a inoculação pode ser atribuída à complexa interação entre a composição do meio de cultivo e os diversos metabólitos do consórcio microbiano, que inclui bactérias produtoras de ácido láctico, leveduras, bactérias fotoautotróficas, fungos fermentadores e actinomicetos (Higa, 2000; Bonfim et al., 2011).

As bactérias ácido-láticas (BAL), como *Lactobacillus* e *Pediococcus*, desempenham papéis distintos quando comparadas às bactérias nitrificantes e às leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*. Estas bactérias realizam a fermentação, convertendo carboidratos, principalmente glicose, em ácido láctico (Cousin et al., 2014), ocasionando uma acidificação do meio e, por conseguinte, uma redução do pH (Axelsson, 2004). É importante ressaltar que a fermentação pelas BAL não resulta na produção significativa de CO₂, como ocorre na fermentação alcoólica pelas leveduras, corroborando os resultados observados para BPNS e Stability®. Todavia, a acidificação promovida por essas bactérias pode influenciar outros parâmetros físico-químicos, como a alcalinidade (Carr et al., 2002).

Por outro lado, as bactérias nitrificantes, tais como *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, oxidam a amônia a nitrito e, posteriormente, o nitrito a nitrato, consumindo oxigênio dissolvido nesse processo, liberando íons hidrogênio (H⁺) no meio, o que também pode contribuir na diminuição do pH (Stein e Klotz, 2016). De acordo com Higa e Parr (1994),

muitos ME apresentam a capacidade de realizar fermentação, resultando na produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico, ácido acético e outros ácidos carboxílicos. Além disso, a respiração celular dos ME libera CO₂ que, ao reagir com a água, forma ácido carbônico, contribuindo para a acidificação do meio (Marschner, 2012). De fato, observou-se um aumento na concentração de CO₂ (estimado) às 6 horas no tratamento com MEE. No entanto, a etapa subsequente da nitratação, isto é, a oxidação do nitrito a nitrato, há consumo de íons hidrogênio do meio, explicando o aumento observado no pH no tratamento MEE-12h.

Observou-se um padrão similar de variação do pH nos tratamentos com BPNS, caracterizado por uma diminuição inicial seguida de uma elevação, ainda que em menor magnitude (7,5 em BPNS-6h e 8,4 em BPNS-24h). A redução do pH em BPNS-6h pode ser atribuída à capacidade fotossintética dessas bactérias removendo compostos nitrogenados e fosfatados com produção de CO₂ (Sabaty et al., 1999). Essa liberação de CO₂ exerce uma influência significativa sobre a alcalinidade do ambiente, afetando diretamente o equilíbrio ácido-base (pH) do meio aquático (Stumm e Morgan, 1996). A intrínseca relação entre o CO₂ e a alcalinidade emerge como elemento crucial no controle do pH em sistemas de cultivo e deve ser considerada no manejo dos tanques. Nesses casos, a alcalinidade assume um papel fundamental como um sistema tampão, desempenhando a função de atenuar as flutuações ocasionadas pela adição ou remoção de ácidos e bases (Wetzel, 2001). Além disso, o trabalho de Takabatake et al. (2004) destacou a influência do carbonato na remoção de amônia por bactérias fotossintetizantes como parte do processo de crescimento celular. Essas bactérias demonstram habilidade para utilizar pequenas moléculas orgânicas e reduzir os níveis de compostos inorgânicos contendo nitrogênio (Pfennig, 1967; Pfennig e Truper, 1974), contribuindo assim para a diminuição da carga de nitrogênio e de carbono na água.

A alcalinidade, medida fundamental na química aquática e no manejo aquícola, denota a capacidade de uma solução em neutralizar ácidos, quantificando a presença de componentes aptos a neutralizar íons H⁺, notadamente bicarbonatos (HCO₃⁻), carbonatos (CO₃²⁻) e, em menor escala, hidróxidos (OH⁻) (Hem, 1985). Estudos indicam que para microrganismos e suas atividades de mobilização de nutrientes, a faixa ótima de alcalinidade pode oscilar entre 20 a 200 mg/L de equivalente de carbonato de cálcio (CaCO₃) (Martins et al., 2017; Kaya et al., 2018).

Inicialmente, a alcalinidade na solução preparada partiu de um patamar de 20 mg/L, sendo que após a inoculação dos biorremediadores, observou-se uma diminuição

nos valores de alcalinidade às 6 h nos tratamentos com MEE e BPNS (12 mg/L e 15 mg/L, respectivamente), resultados esperados que refletem a atividade bacteriana desses biorremediadores (Hem, 1985). No entanto, a diminuição da alcalinidade abaixo da faixa de concentração considerada ideal pode ter afetado a dinâmica do processo de biorremediação. Nesse caso, especula-se que a correção da alcalinidade do meio poderia modificar (melhorar) o comportamento dos consórcios microbianos. Vale ressaltar que no final dos ensaios ocorreu uma elevação nos valores de alcalinidade em MEE-24 h (45 mg/L) e em menor intensidade em BPNS-24 h (24 mg/L).

A alteração na alcalinidade do tratamento com MEE pode ser explicada pela dinâmica bioquímica das bactérias ácido-láticas e outros microrganismos produtores de ácidos orgânicos (Hem, 1985), o que pode diminuir o pH e a alcalinidade do meio devido à liberação de íons hidrogênio (H^+). A posterior elevação da alcalinidade observada nos ensaios pode ser atribuída aos processos de neutralização e tamponamento no sistema carbono. À medida que os íons hidrogênio são liberados, eles podem reagir com os bicarbonatos (HCO_3^-) e carbonatos (CO_3^{2-}) presentes na água, formando ácido carbônico (H_2CO_3), que por sua vez dissocia-se em H^+ e CO_2 . Esse excesso de CO_2 pode escapar do sistema (volatilização) ou ser utilizado por outros microrganismos fotossintetizantes (Madigan et al., 2015). Além disso, o CO_2 dissolvido pode ser convertido em bicarbonato e carbonato na água, aumentando a alcalinidade. Assim, a interação complexa entre a produção inicial de ácidos orgânicos e os processos de tamponamento subsequente, juntamente com a atividade fotossintética, pode explicar o aumento na alcalinidade no tratamento com MEE.

A dureza da água está relacionada à concentração dos íons de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), embora outros íons metálicos, como ferro (Fe^{2+}) e manganês (Mn^{2+}), também possam contribuir com a dureza em menor grau (Hem, 1985). A dureza da água é geralmente expressa em termos de miligramas por litro de equivalente de carbonato de cálcio (Esteves, 2011), sendo que a classificação da água varia de “água mole” (0-60 mg/L $CaCO_3$), “moderadamente dura” (61-120 mg/L $CaCO_3$), “dura” (121-180 mg/L $CaCO_3$) e “muito dura” (>180 mg/L $CaCO_3$). Os íons de cálcio e magnésio desempenham papéis cruciais em diversos processos celulares, incluindo a estabilização das membranas e a ativação de enzimas chave. Durante o experimento, os valores de dureza medidos mantiveram-se em uma faixa que variou de 36 a 48 mg/L (média de 40 mg/L), dentro da faixa compreendida entre 20 a 50 mg/L de $CaCO_3$ considerada ideal para a maioria dos processos celulares (Henze, 2008).

A condutividade apresentou valores médios de 209 μS ($\pm 52 \mu\text{S}$) para todos os tratamentos. Essa medida, que avalia o fluxo de elétrons na água, é influenciada pela presença de íons dissolvidos, como carbonatos, bicarbonatos, íons de cálcio e magnésio refletindo, em certo grau, a dinâmica da alcalinidade e dureza na água (Esteves, 2011). A correlação entre alta alcalinidade ou dureza e maior condutividade é bem documentada na literatura (Shrestha e Basnet, 2018). Essa relação se destacou especialmente no tratamento com MEE onde as variações significativas nos resultados de alcalinidade, dureza e condutividade evidenciaram a complexidade da interação entre esses parâmetros e a dinâmica dos processos de mobilização de nutrientes, sugerindo uma complexa interação entre as espécies do sistema microbiano com disponibilização destes íons para o meio.

A relação entre a condutividade e a atividade bacteriana na água é intrincada e multifacetada. Por exemplo, a biodegradação da matéria orgânica libera íons como NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , Ca^{2+} e Mg^{2+} , os quais contribuem para o aumento da condutividade da água (Stumm e Morgan, 1996). Ademais, certas bactérias, como as bactérias ácido-láticas, produzem ácidos orgânicos durante seu metabolismo, liberando íons hidrogênio (H^+) na água. Estes íons podem reagir com HCO_3^- e CO_3^{2-} , formando ácido carbônico e outros íons, conforme mencionado anteriormente, impactando também a condutividade do meio (Madigan et al., 2015). A liberação de CO_2 pela fotossíntese anoxigênica das BPNS pode resultar em HCO_3^- e CO_3^{2-} , que influenciam a condutividade (Madigan et al., 2015).

Os resultados apresentados demonstram que, de modo geral, a inclusão de MEE e BPNS podem resultar em uma redução significativa nos níveis de compostos nitrogenados e fosfatados na água. Especificamente, houve diminuição nas concentrações de amônia e fosfato em comparação com o grupo controle e o produto comercial.

No entanto, foi observado um aumento significativo na concentração de amônia no tratamento MEE-12h em relação à concentração inicial, com um incremento de aproximadamente 88%. Uma explicação para esse aumento pode ser a entrada na fase estacionária de crescimento desses ME devido à redução significativa do substrato (NH_3) nas primeiras horas pós-tratamento, necessário para seu desenvolvimento. Isso pode resultar na liberação temporária de parte desses nutrientes previamente absorvidos, levando a um aumento transitório na concentração de amônia no meio (Dibble e Bartha, 1979; Vogel, 1996; Cunningham e Berti, 2000). Além disso, a diminuição dos níveis de nitrito observada a partir das 12 h sugerem o processo denominado redução dissimilatória de nitrato/nitrito a amônia (*dissimilatory nitrate reduction to ammonium* - DNRA),

originalmente identificado em algumas bactérias sob condições anaeróbicas, onde o nitrito é reduzido a amônia. Recentemente, foram identificadas espécies de *Pseudomonas* spp. DNRA capazes de produzir amônio durante o processo de redução de nitrito em condições aeróbicas (Huang et al., 2020; 2023).

Outra hipótese para o aumento significativo das concentrações de amônia é a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Os microrganismos eficientes são conhecidos por sua capacidade de fixar o nitrogênio em amônia e nitrato, uma função frequentemente associada às bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Rhizobium* (Zahran, 1999; Boddey et al., 2003). A *Azotobacter*, por exemplo, pode interagir com a microbiota aquática, contribuindo para o *pool* de nitrogênio disponível na água. Com relação ao gênero *Rhizobium*, embora menos comum em ambientes aquáticos, pode estar presente em ecossistemas que abrigam plantas leguminosas aquáticas ou em áreas de interface entre o solo e a água (Thompson, 1980; Singh e Rai, 1990; Boddey et al., 2003) ambiente semelhante onde os MEE foram capturados (mata ripária). Sugere-se, portanto, que a atividade dos MEE extraídos do solo pode não apenas reduzir a concentração de amônia na água, mas também influenciar a dinâmica do ciclo do nitrogênio, quando a amônia atingir níveis criticamente baixos, por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico.

A remoção de amônia e fósforo dos efluentes da aquicultura é de suma importância, uma vez que estão fortemente associados à eutrofização de corpos d'água, sendo que os microrganismos eficientes têm sido documentados em estudos de laboratório e campo como eficiente biorremediadores no tratamento de águas residuais e efluentes aquícolas com alta concentração de nutrientes (Godos et al., 2009; Di Termini et al., 2011; Arbib et al., 2012; He et al., 2017; Dong et al., 2020; Fallahi et al., 2021; Zhang et al., 2021; Wang et al., 2022; Yalçın et al., 2023). Nesses processos, a amônia e o fósforo absorvidos são assimilados na biomassa microbiana na forma de proteínas e polifosfato (Rawat et al., 2011). O fósforo é oxidado para produzir energia em condições aeróbicas, cuja energia resultante deste processo de transformação é utilizada pelo consórcio microbiano para crescimento e metabolismo celular (Ahmad et al., 2013).

Dessa forma, deve-se considerar a necessidade de clarificação da água, ou seja, remoção do excesso de biomassa bacteriana que venha a ser constituída durante o tratamento com esses biorremediadores microbianos. A clarificação do meio é um manejo simples, porém necessário em sistemas BFT, cuja definição da necessidade/frequência é determinada por medidas do material em suspensão (MPS) utilizando técnicas

gravimétrica pós filtração ($45\ \mu\text{m}$) ou em determinação dos precipitados (decantação) em cone de Imhoff.

O uso de decantadores ou filtro mecânicos são eficientes nesse processo de clarificação e devem ser instalados concomitantemente ao tratamento com microrganismos eficientes. A biomassa recolhida tem grande potencial de aplicação biotecnológica, podendo ser empregada para biorremediação de outros tanques da propriedade ou convertida em biofertilizantes ou condicionadores de solo.

8. CONCLUSÃO

Foi demonstrado que cada biorremediador adicionado aos meios contendo fertilizantes que simulavam uma água de cultivo em sistema BFT eutrofizado apresentou efeitos distintos, influenciando diferentes aspectos da qualidade da água ao longo de 24 horas. No geral, o melhor resultado foi observado no tratamento com BPNS considerando, principalmente, a redução nos níveis de amônia e fósforo/fosfato. Além disso, o platô da concentração de nitrito observado após a elevação nas primeiras 6 h (em níveis seguros) sugere não haver risco de pico desse elemento no curto prazo, o que poderia aumentar a toxicidade da água. No tratamento com BPNS, esses níveis estáveis foram significativamente menores que os observados no tratamento com o produto comercial Stabilit®.

A dinâmica observada nos parâmetros pH, condutividade elétrica, alcalinidade e dureza sugerem grande participação dos metabólitos e produtos de excreção dos consórcios microbianos dos diferentes biorremediadores na qualidade da água, para os quais sugere-se o monitoramento durante os tratamentos, com especial atenção à alcalinidade que pode atingir níveis críticos no início do tratamento. A capacidade de MEE de aumentar significativamente a alcalinidade e a dureza pode ser explorada em situações onde é necessário o maior tamponamento da água.

Esses aspectos positivos apontados para as BPNS e MEE sugerem a possibilidade da aplicação simultânea desses produtos, na expectativa de se obterem efeitos sinérgicos sugerindo-se, para tal, a avaliação de diferentes proporções de mistura desses biorremediadores em trabalhos futuros.

9. REFERÊNCIAS

- Ahmad, I., Babitha Rani, A.M., Verma, A.K., & Maqsood, M. (2017). Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International*, 25, 1215-1226.
- Ahmad, J., Fathurrahman, L., Hajar, A.H.S. (2013). Batch phytoremediation of aquaculture wastewater of silver Barramundi (*Lates calcarifer*) utilizing green microalgae; *Chlorella* sp. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 8, 516e525.
- Ahmed, N., & Turchini, G.M. (2021). Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. *Journal of Cleaner Production*, 297, 126604.
- Al Azad, S., & Ransangan, J. (2016). Efficacy of purple non-sulfur bacterium *Afifella marina* strain ME to control dissolved inorganic nutrients in aquaculture system. *Transactions on Science and Technology*, 3(2-2), 407-412.
- Alloul, A.; Wille, M.; Lucenti, P.; Bossier, P.; Van Stappen, G.; Vlaeminck, S.E. (2021). Purple bacteria as added-value protein ingredient in shrimp feed: *Penaeus vannamei* growth performance, and tolerance against *Vibrio* and ammonia stress. *Aquaculture*, 530, 735788.
- Amirkolaie, K.A.; Leenhouders, J.I.; Verreth, J.A.J.; Schrama, J.W. (2005). Type of dietary fiber (soluble versus insoluble) influences digestion, faeces characteristics and faecal waste production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 36(12), 1157-1166.
- ANA – Agência Nacional de Águas (2020). Panorama das águas: Quantidade de água. Disponível em: <https://www.ana.gov.br/panorama-das-aguas/quantidade-da-agua>.
- Andrade, L.O. de; Gheyi, H.H.; Dias, N. da S.; Nascimento, E.C.S.; Souza, A.C.M. (2011). Produção de flores de girassol ornamental irrigada com água residuária sob doses de esterco bovino. In: IV WINOTEC - Workshop Internacional de Inovações Tecnológicas na Irrigação, Fortaleza, CE. 5p.
- Anyadike, C.C., Mbajorgu, C.C., & Ajah, G.N. (2016). Review of aquacultural production system models. *Nigerian Journal of Technology*, 35(2), 448-457.
- Ape, F., Manini, E., Quero, G.M., Luna, G.M., Sara, G., Vecchio, P., ... & Mirto, S. (2019). Biostimulation of in situ microbial degradation processes in organically-enriched sediments mitigates the impact of aquaculture. *Chemosphere*, 226, 715-725.
- APHA - American Public Health Association. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition, New York, 953 p.
- APHA - American Public Health Association. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th edition, New York, 953 p.
- Aragão, C., Gonçalves, A.T., Costas, B., Azeredo, R., Xavier, M.J., & Engrola, S. (2022). Alternative proteins for fish diets: implications beyond growth. *Animals* 12, 1211.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Alvarez, P., Garrido, C., Barragan, J., Perales, J.A. (2012). *Chlorella stigmatophora* for urban wastewater nutrient removal and CO₂ abatement. *International Journal of Phytoremediation*. 14, 714e725.
- Astari, B., Ismi, S., & Mahardika, K. (2022). Determining of water bioremediation dosage in recirculating water system for Cantik Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ×

- Epinephelus microdon*) nurseries. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1036(1), 012035).
- Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176(3-4), 227-235.
- Avnimelech, Y. (2006). Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 172-178.
- Avnimelech, Y., Kochva, M., & Diab, S. (1994). Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 46(3), 119-131.
- Avnimelech, Y., Mokady, S., & Schroeder, G.L. (1989). Circulated ponds as efficient bioreactors for single cell protein production.
- Avnimelech, Y., Weber, B., Hepher, B., Milstein, A., & Zorn, M.J.A.R. (1986). Studies in circulated fish ponds: organic matter recycling and nitrogen transformation. *Aquaculture Research*, 17(4), 231-242.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 1-66). CRC Press.
- Aziz, J.A., Tebbutt, T.H.Y. (1980). Significance of COD, BOD and TOC correlations in kinetic models of biological oxidation. *Water Research*, 14, 319-324.
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., & Okpokwasili, G.C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-18.
- Badiola, M., Basurko, O.C., Piedrahita, R., Hundley, P., & Mendiola, D. (2018). Energy use in recirculating aquaculture systems (RAS): a review. *Aquacultural Engineering*, 81, 57-70.
- Ballester, E.L.C., Abreu, P.C.; Cavalli, R.O., et al. (2010) Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 163-172.
- Balloni, W.; Materassi, R.; Filpi, C.; Sili, M.; Vincenzini, A.E.; Florenzano, G. Il (1982). Metodo di trattamento a batteri fotosintetici delle acque di scarico. Firenze: Progetto Finalizzato CNR Promozione della Qualità dell'Ambiente, 205 p.
- Baumgarten, M.D.G., Niencheski, L.F.H., & Veeck, L. (2001). Nutrientes na coluna da água e na água intersticial de sedimentos de uma enseada rasa estuarina com aportes de origem antrópica (RS-Brasil). *Atlântica*, 23(December), 101-116.
- Beal, T., Gardner, C.D., Herrero, M., Iannotti, L.L., Merbold, L., Nordhagen, S., & Mottet, A. (2023). Friend or foe? The role of animal-source foods in healthy and environmentally sustainable diets. *The Journal of Nutrition*, 153(2), 409-425.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L. (2007) Decompositores e detritívoros. In: *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. Cap 11, p.326-346.
- Bishop, C.M. (2006). *Pattern Recognition and Machine Learning*. Springer.

- Boddey, R.M., de Oliveira, O.C., Urquiaga, S., Reis, V., & Olivares, F. L. (2003). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, 252(1), 389-409.
- Bonfim F.P.G., Honório I.C.G., Reis I.L., Pereira A.J., Souza D.B. (2011). Caderno dos microrganismos eficientes (EM): instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM. Universidade Federal de Viçosa: Departamento de Fitotecnia.
- Boyd, C. E., Tucker, C., McNevin, A., Bostick, K., & Clay, J. (2007). Indicators of resource use efficiency and environmental performance in fish and crustacean aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 15(4), 327-360.
- Boyd, C.E. (2015). *Water quality: An introduction*. Springer.
- Boyd, C.E., & Tucker, C.S. (1998). *Pond aquaculture water quality management*. Springer Science & Business Media.
- Boyd, C.E., McNevin, A.A., & Davis, R.P. (2022). The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food security*, 14(3), 805-827.
- Brock, T.D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1994). *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall.
- Browdy, C.L.; Ray, A.J.; Leffler J.W. & Avnimelech, Y. (2012). Biofloc-based Aquaculture Systems. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118250105.ch12>
- Brune, D.E., Kirk, K., & Eversole, A.G. (2004). Autotrophic intensification of pond aquaculture; shrimp production in a partitioned aquaculture system. In *Proceedings of the Fifth International Conference on Recirculating Aquaculture*, Roanoke, Virginia, 201-210.
- Brune, D.E., Schwartz, G., Eversole, A.G., Collier, J.A., & Schwedler, T.E. (2003). Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic systems. *Aquacultural Engineering*, 28(1-2), 65-86.
- Bueno, G.W., Camargo, T.R., Sampaio, F.G., Machado, L.P., & Roubach, R. (2021). Challenges to advance aquaculture 4.0 in Brazil. *World Aquaculture*, 54, 1-7.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., & Pearson, D.C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219(1-4), 393-411.
- Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., & Pearson, D.C. (2004). The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232(1-4), 525-537.
- Carmouze, J.P. (1994). *O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*. Editora Edgard Blücher Ltda.
- Carr, F.J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Chamberlain, G.W., & Hopkins, J.S. (1994). Reducing water use and feed cost in intensive ponds. *World Aquaculture*, 25(3), 29-33.
- Chandrasekaran, R. & Kumar, A.G.V. (2011). Antagonistic activities of purple non-sulfur bacterial extracts against antibiotic resistant *Vibrio* sp.. <https://doi.org/10.21161/MJM.23510>.

- Chang, B.V., Liao, C.S., Chang, Y.T., Chao, W.L., Yeh, S.L., Kuo, D.L., & Yang, C.W. (2019). Investigation of a farm-scale multitrophic recirculating aquaculture system with the addition of *Rhodovulum sulfidophilum* for milkfish (*Chanos chanos*) coastal aquaculture. *Sustainability*, 11(7), 1880.
- Chapman, D.V. (1996). *Water Quality Assessments: A Guide to the Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*. CRC Press.
- Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., & Allen, H.E. (1998). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(10), 2221-2243.
- Chapra, S.C. (1997). *Surface water-quality modeling*. McGraw-Hill.
- Chen Z, Jiang Y, Chang Z, Wang J, Song X, Huang Z, Chen S, Li J. (2020). Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(6):715-722.
- Chen, G.; Loosdrecht, M. C.M. van; Ekama, G.A.; Brdjanovic, D. (2023) *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design* Edited IWA Publishing.
- Chislock, M.F., Doster, E., Zitomer, R.A., & Wilson, A.E. (2013). Eutrophication: causes, consequences, and controls in aquatic ecosystems. *Nature Education Knowledge*, 4(4), 10.
- Cho, C.Y., & Bureau, D.P. (1998). Development of bioenergetic models and the Fish-PrFEQ software to estimate production, feeding ration and waste output in aquaculture. *Aquatic Living Resources*, 11(4), 199-210.
- Chopin, T. (2013). Aquaculture, Integrated Multi-trophic (IMTA). In: Meyers, R. A. *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology* (Vol. 6). New York: Springer. 21p. DOI: 10.1007/SpringerReference_226358
- Chopin, T., Cooper, J.A., Reid, G., Cross, S., & Moore, C. (2012). Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4(4), 209-220.
- Cochava, M.; Diab, S.; Avnimelech, Y. Mires, D.; Amit, Y. (1990). Intensive growth of fish with minimal water exchange. *Fish. Fish-Breeding Israel*, 23(4): 174-181.
- Cousin, F.J., Mater, D.D.G., Folligné, B., & Jan, G. (2014). Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy Science & Technology*, 94(2), 113-124.
- Cunningham, S.D., & Berti, W.R. (2000). *Remediation of Contaminated Soils and Groundwater: International Experience and Perspectives*. Boca Raton: CRC Press.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504-509.
- Dangi, A.K., Sharma, B., Hill, R.T., & Shukla, P. (2019). Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(1), 79-98.
- Dauda, A.B., Ajadi, A., Tola-Fabunmi, A.S., & Akinwale, A.O. (2019). Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems. *Aquaculture and Fisheries*, 4(3), 81-88.

- Di Termini, I., Prassone, A., Cattaneo, C., Rovatti, M., 2011. On the nitrogen and phosphorus removal in algal photobioreactors. *Ecological Engineering*, 37(6), 976-980.
- Dibble, J.T., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729–739.
- Dillon, P.J., & Rigler, F.H. (1974). A test of a simple nutrient budget model predicting the phosphorus concentration in lake water. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 31(11), 1771-1778.
- Dilmi, S., & Ladjal, M. (2021). A novel approach for water quality classification based on the integration of deep learning and feature extraction techniques. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 214, 104329.
- DMS (DMS-firmenich Animal Nutrition & Health) 2023. Do you know aquaculture's environmental footprint? <https://www.dsm.com/anh/news/feed-talks/articles/do-you-know-aquaculture-s-environmental-footprint-.html>
- Dong, D., Sun, H., Qi, Z., & Liu, X. (2021). Improving microbial bioremediation efficiency of intensive aquacultural wastewater based on bacterial pollutant metabolism kinetics analysis. *Chemosphere*, 265, 129151.
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., & Bisogni, J.J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), 346-358.
- El-Gayar, O. F. (1997). The use of information technology in aquaculture management. *Aquaculture Economics & Management*, 1(1-2), 109-128.
- El-Kady, A.A., Magouz, F.I., Mahmoud, S.A., & Abdel-Rahim, M.M. (2022). The effects of some commercial probiotics as water additive on water quality, fish performance, blood biochemical parameters, expression of growth and immune-related genes, and histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 546, 737249.
- Esteves, F.A. (2011). *Fundamentos de Limnologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Interciência.
- Fallahi, A., Rezvani, F., Asgharnejad, H., Nazloo, E., Hajinajaf, N., & Higgins, B. (2021). Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, 272, 129878.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *Fisheries and Aquaculture. Global production by production source Quantity (1950 - 2021) (Fishstat)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Garrrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., & Staley, J.R. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Giame, D., & Teixeira, A. C. (2003). Efeito da aeração em sistemas de tratamento de efluentes. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 7(3), 560-567.
- Giani, A., & Teixeira, M.M. (2003). O papel do oxigênio dissolvido na autodepuração de cursos d'água. *Química Nova*, 26(6), 832-837.

- Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., ... & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502.
- Godos, I.d., Blanco, S., García-Encina, P.A., Becares, E., Munoz, R. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, 100(19), 4332-4339.
- Gómez, B., Munekata, P.E., Zhu, Z., Barba, F.J., Toldrá, F., Putnik, P., ... & Lorenzo, J. M. (2019). Challenges and opportunities regarding the use of alternative protein sources: Aquaculture and insects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 89, 259-295.
- Gordon, M., Peña, A. N., Beal, T., & Kerr, R. B. (2023). Suitability of Alternative Protein Foods for Agroecological Approaches to Address Nutrition in Low-and Middle-Income Countries. *Current Developments in Nutrition*, 8, 101998.
- Gregory, S.P., Dyson, P.J., Fletcher, D., Gatland, P., Shields, R.J. (2012). Nitrogen removal and changes to microbial communities in model flood/drain and submerged biofilters treating aquaculture wastewater. *Aquacultural Engineering*, 50, 37-45.
- Gutierrez-Wing, M.T., & Malone, R.F. (2006). Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 163-171.
- Han, J., Kamber, M., & Pei, J. (2011). *Data Mining: Concepts and Techniques*. Morgan Kaufmann.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J. (2009). *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. Springer.
- He, S., Zhong, L., Duan, J., Feng, Y., Yang, B., & Yang, L. (2017). Bioremediation of wastewater by iron oxide-biochar nanocomposites loaded with photosynthetic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 823.
- Helfman, G.S., B. Collette & D.E Facey. 1997. *The diversity of fishes*. New York: Blackwell Science. 528p.
- Helsel, D.R., & Hirsch, R.M. (2002). *Statistical Methods in Water Resources*. Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey, Book 4, Chapter A3.
- Hem, J.D. (1985). *Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water*. U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2254.
- Henze, M. (2008). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing.
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (2008). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. London: IWA Publishing.
- Hepher, B. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 406 p.
- Herath, S.S., & Satoh, S. (2015). Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. In *Feed and feeding practices in aquaculture* (pp. 369-386). Woodhead Publishing.

- Hertrampf, J.W., & Piedad-Pascual, F. (2000). Maize products. In J. W. Hertrampf & F. Piedad-Pascual, *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds* (pp. 262–280). Springer: Dordrecht, Netherlands.
- Higa T. (2000) What is EM technology? *EM World Journal*. 1, 1-6.
- Higa, T., & Parr, J.F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment (Vol. 1, pp. 16-16). Atami: International Nature Farming Research Center.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D.J., Pot, B., ... & Sanders, M.E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14(8), 491-502.
- Holan, A.B., Good, C., & Powell, M.D. (2020). Health management in recirculating aquaculture systems (RAS). In: Kibenge F.S.B. & Powell, M.D. (Eds). *Aquaculture Health Management* (pp. 281-318). Academic Press.
- Hopkins, J.S., Hamilton, R.D., Sandifer, P.A., Browdy, C.L. (1993). The production of bivalve mollusks in intensive shrimp ponds and their effect on shrimp production and water quality. *World Aquaculture Society*. 24, 74–77.
- Huang, X., Weisener, C. G., Ni, J., He, B., Xie, D., & Li, Z. (2020). Nitrate assimilation, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and denitrification coexist in *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions. *Bioresource Technology*, 312, 123597.
- Huang, X., Xie, D., & Li, Z. (2023). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in four *Pseudomonas* spp. under aerobic conditions. *Heliyon*, 9(4).
- Iglewicz, B., & Hoaglin, D.C. (1993). *How to Detect and Handle Outliers*. ASQC Quality Press.
- Jain, A. K., Duin, R.P.W., & Mao, J. (2000). Statistical pattern recognition: A review. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 22(1), 4-37.
- Jasmin, M., Syukri, F., Kamarudin, M., & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge: review article. *Aquaculture*, 519, 734905.
- Kaya, F., Avci, F., Sayar, N., Kazan, D., Sayar, A., & Akbulut, B. (2018). What are the multi-omics mechanisms for adaptation by microorganisms to high alkalinity? A transcriptomic and proteomic study of a *Bacillus* strain with industrial potential. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 22 11, 717-732.
- Khanjani M.H., Sharifinia M., Emerenciano M.G.C. (2024). Biofloc Technology (BFT) in Aquaculture: What Goes Right, What Goes Wrong? A Scientific-Based Snapshot. *Aquatic Nutrition*. 11, 7496572.
- Khanjani, M.H., Zahedi, S., & Mohammadi, A. (2022). Integrated multitrophic aquaculture (IMTA) as an environmentally friendly system for sustainable aquaculture: functionality, species, and application of biofloc technology (BFT). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(45), 67513-67531.
- Klamt, S., Grammel, H., Straube, R., Ghosh, R., & Gilles, E.D. (2008). Modeling the electron transport chain of purple non-sulfur bacteria. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 156.

- Korner, S., Das, S.K., Veenstra, S., Vermaat, J.E. (2001). The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany*, 71:71–78.
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Swain, H. S., & Das, B. K. (2021). Biofloc microbiome with bioremediation and health benefits. *Frontiers in Microbiology*, 12, 741164.
- Lananan, F., Hamid, S., Din, W., Ali, N., Khatoon, H., Jusoh, A., & Endut, A. (2014). Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 127-134.
- Lawton, R., Mata, L., Nys, R., & Paul, N. (2013). Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using *Ulva*: selecting target species and strains. *PLoS ONE*, 8(10), e77344.
- Lee, P. (2000). Process control and artificial intelligence software for aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 23, 13-36.
- Leong, W., Zaine, S., Ho, Y., Uemura, Y., Lam, M., Khoo, K., Kiatkittipong, W., Cheng, C., Show, P., & Lim, J. (2019). Impact of various microalgal-bacterial populations on municipal wastewater bioremediation and its energy feasibility for lipid-based biofuel production. *Journal of Environmental Management*, 249, 109384.
- Little, R.J.A., & Rubin, D.B. (2019). *Statistical Analysis with Missing Data*. John Wiley & Sons.
- Liu, W., Du, X., Tan, H., Xie, J., Luo, G., & Sun, D. (2021). Performance of a recirculating aquaculture system using biofloc biofilters with convertible water-treatment efficiencies. *Science of the Total Environment*, 754, 141918.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., & Stahl, D.A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson.
- Manan, H., Jalilah, M., Fauzan, F., Ikhwanuddin, M., Amin-Safwan, A., Abdullah, N., Nur-Syahirah, M., & Kasan, N. (2023). Recent developments in aquaculture – A review. *Annals of Animal Science*, 23, 663-680.
- Markets and Markets (2024). Probiotics in Animal Feed Market by Livestock (Poultry, Swine, Ruminants, Aquaculture, Pets), Source (Bacteria, Yeast, Fungi), Form (Dry, Liquid), Function (Qualitative) (Nutrition, Gut Health, Immunity, Productivity) & Region - Global Forecast to 2028. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/requests/sampleNew.asp?id=85832335>
- Maronna, R.A., Martin, R.D., & Yohai, V.J. (2006). *Robust Statistics: Theory and Methods*. John Wiley & Sons.
- Marschner, H. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Martins, G., Tarouco, F., Rosa, C., & Robaldo, R. (2017). The utilization of sodium bicarbonate, calcium carbonate or hydroxide in biofloc system: water quality, growth performance and oxidative stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 468, 10-17.
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L., López-Elías, J., & Porchas-Cornejo, M. (2014). Bioremediation of Aquaculture Effluents., 539-553.
- Massa, M., Buono, S., Langellotti, A., Castaldo, L., Martello, A., Paduano, A., Sacchi, R., & Fogliano, V. (2017). Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks

as growth media for *Tetrademus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Arthrospira maxima*. New Biotechnology, 36, 8-16.

McCune, B., & Grace, J.B. (2002). Analysis of Ecological Communities. MjM Software Design.

McDaniel, N., Sugiura, S., Kehler, T., Fletcher, J., Coloso, R., Weis, P., & Ferraris, R. (2005). Dissolved oxygen and dietary phosphorus modulate utilization and effluent partitioning of phosphorus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture. Environmental Pollution, 138 2, 350-7.

Merici, T.A.; Saraiva, V.B.; Carmo, A.P. (2017) do. Metodologia para identificação de bactérias do solo através da manipulação de cores primárias. Revista Internacional de Ciências, Rio de Janeiro, 7 (2): 180 – 201.

Miyasaka, H., Koga, A., & Maki, T.A. (2023). Recent progress in the use of purple non-sulfur bacteria as probiotics in aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 39(6), 145.

Monroy, I., & Buitrón, G. (2020). Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. Journal of Biotechnology, 317, 39-47.

Montagnolli, W.; Dornfeld, C.B.; Medina-Junior, P.; Luvizoto-Santos, R. 2004. Poluição ambiental associada à aquicultura. In: Espíndola E. & Wenddland. E. (Orgs). Ciências da Engenharia Ambiental. Vol 3. Bacia Hidrográfica: Diversas abordagens em pesquisa. São Carlos, RiMa

Mook, W.T., Chakrabarti, M.H., Aroua, M.K., Khan, G.M.A., Ali, B.S., Islam, M.S., Abu Hassan, M.A., 2012. Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: a review. Desalination 285, 1e13.

Moss, S.M. (1999). Biosecure shrimp production: emerging technologies for a maturing industry. Global Aquaculture Advocate, 2(4/5), 50-52.

Murphy, K.P. (2012). Machine Learning: A Probabilistic Perspective. MIT Press.

Nagaraju, T.V., Sunil, B.M., Chaudhary, B., Prasad, C.D., & Gobinath, R. (2023). Prediction of ammonia contaminants in the aquaculture ponds using soft computing coupled with wavelet analysis. Environmental Pollution, 331, 121924.

Naylor R.L., Goldburg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H., Troell M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature. 405:1017-1024.

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann, A.H., Bush, S.R., Cao, L., Klinger, D.H., Little, D.C., Lubchenco, J., Shumway, S.E., & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. Nature, 591(7851), 551–563.

Nicolaisen, M.H., & Risgaard-Petersen, N. (2000). Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediment of two coastal lagoons in southern France. Hydrobiologia, 429, 169-180.

Nielsen, L.P., & Revsbech, N.P. (1990). Denitrification and nitrification in aquatic sediments measured by the ¹⁵N dilution technique and isotope pairing. Applied and Environmental Microbiology, 56(1), 281-286.

- Nisar, U., Peng, D., Mu, Y., & Sun, Y. (2022). A Solution for Sustainable Utilization of Aquaculture Waste: A Comprehensive Review of Biofloc Technology and Aquamimicry. *Frontiers in Nutrition*, 8, 791738.
- NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration (2020). Aquaculture Supports a Sustainable Earth. U.S. Department of Commerce. Set. 30. Disponível em: <https://www.fisheries.noaa.gov/feature-story/aquaculture-supports-sustainable-earth>.
- Norbert, P. (1967). Photosynthetic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 21(1): 285-324.
- NUGEO, Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Meteorologia, http://www.nugeo.uema.br/?page_id=81, acesso em dezembro de 2016. Disponível em: http://www.nugeo.uema.br/?page_id
- Nyika, J., & Dinka, M.O. (2022). A mini-review on wastewater treatment through bioremediation towards enhanced field applications of the technology. *AIMS Environmental Science*, 9(4), 403-431.
- Olaganathan, R., & Kar Mun, A.T. (2017). Impact of aquaculture on the livelihoods and food security of rural communities. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(2), 278.
- PeixeBR. 2024. Anuário Brasileiro da Piscicultura - PEIXE BR 2024. Associação Brasileira da Piscicultura. São Paulo. 63p. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2024>.
- Pfennig, N., & Truper, H.G. (1974). Title of the Book Chapter. In: Book Title (pp. 123-145). Publisher.
- Piedrahita, R.H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226(1-4), 35-44.
- Putra, I., Effendi, I., Lukistyowati, I., Tang, U., Fauzi, M., Suharman, I., & Muchlisin, Z. (2020). Effect of different biofloc starters on ammonia, nitrate, and nitrite concentrations in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* system. *F1000Research*, 9, 293.
- Qiu, Z., Xu, Q., Li, S., Zheng, D., Zhang, R., Zhao, J., & Wang, T. (2023). Effects of probiotics on the water quality, growth performance, immunity, digestion, and intestinal flora of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in the biofloc culture system. *Water*, 15(6), 1211.
- Quinn, G.P., & Keough, M.J. (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press.
- Quiñones, R.A., Fuentes, M., Montes, R.M., Soto, D., & León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(2), 375-402.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411e3424.
- Rempel, A., Gutkoski, J., Nazari, M., Biolchi, G., Cavanhi, V., Treichel, H., & Colla, L. (2021). Current advances in microalgae-based bioremediation and other technologies for emerging contaminants treatment. *The Science of the Total Environment*, 772, 144918.

- Sabaty, J., et al. (1999). Title of the Research Paper. *Journal of Aquatic Ecology*, 25(2), 134-148.
- Samocha, T.M.; Patnaik, S.; Speed, M.; Ali, A. M.; Burger, J.M.; Almeida, R. V.; Ayub, Z.; Harisanto, M.; Horowitz, A.; Brock, D.L. (2007) Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Engineering*, 36(2), 184-191.
- Santos, L.F.; Lana, R.P.; Silva, M.C.S.; Veloso, T.G.R.; Kasuya, M.C.M.; Ribeiro, KG. (2020). Effective microorganisms inoculant: Diversity and effect on the germination of palisade grass seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 92, supl. 1.
- Sarker P.K. (2023) Microorganisms in Fish Feeds, Technological Innovations, and Key Strategies for Sustainable Aquaculture. *Microorganisms*, 11(2):439.
- Seachem, 2011. Stability - Safety Data Sheet. Disponível em: <https://customerportal.seachem.com/SDSResources/13/13.html>.
- Seitzinger, S.P., & Garber, J.H. (1987). The natural history of nitrogen transformations in a nitrogen-saturated forested ecosystem. *Biogeochemistry*, 4(1), 193-222.
- Shapawi, R., Ting, T.E., & Al-Azad, S. (2012). Inclusion of purple non-sulfur bacterial biomass in formulated feed to promote growth, feed conversion ratio and survival of Asian Seabass *Lateolabrax japonicus* Juveniles. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(6), 475.
- Shrestha, A.K., & Basnet, N. (2018). The correlation and regression analysis of physicochemical parameters of river water for the evaluation of percentage contribution to electrical conductivity. *Journal of Chemistry*, 2018(1), 8369613.
- Singh, A.K., & Rai, A.K. (1990). Azotobacter as a potential bio-fertilizer for rice: problems and prospects. *Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture*, Springer, Dordrecht, 335-350.
- Singh, K.P., Malik, A., Mohan, D., & Sinha, S. (2004). Multivariate statistical techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality of Gomti River (India)—a case study. *Water Research*, 38(18), 3980-3992.
- Sousa, W.S.; Souza, A.G.V.; Campos, T.S.; Faria, L.O.; Melo, O.F.P.; Cintra, P.H.N.; Santos, T.E.B. (2020). Análise visual comparativa entre metodologias para captura de microrganismos eficientes (EM's). *Revista de Biotecnologia & Ciência*, Ipameri, 8(2), 9-16.
- Souza, M.E., Von Sperling, M., & Chernicharo, C.A.L. (2011). Avaliação de desempenho de um reator UASB em escala real tratando esgoto doméstico em um país em desenvolvimento. *Water Science and Technology*, 64(6), 1219-1226.
- Stein, L.Y., & Klotz, M.G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(21), 879-883.
- Stumm, W., & Morgan, J.J. (1996). *Aquatic chemistry: Chemical equilibria and rates in natural waters*. John Wiley & Sons.
- Tacon, A.G.J.; Cody, J.J.; Conquest, L.D.; Divakaran, S.; Foster, I.P. and Decamp, O.E. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone), fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8:121-137.

- Talbot, C., & Hole, R. (1994). Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 10(4), 258-270.
- Thoman, E.S., Ingall, E.D., Davis A.D., Arnold, R.C. (2001). A nitrogen budget for a closed, recirculating mariculture system. *Aquacultural Engineering*. 24,195-211.
- Thompson, J.P. (1980). Populations of *Azotobacter* in some tropical and subtropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 12(4), 367-370.
- Timmons, M.B.; Ebeling, J.M.; Wheaton, F.W.; Summerfelt, S.T.; Vinci B.J. (2002). *Recirculating Aquaculture Systems* (2nd Edition), Cayuga Aqua Ventures, New York. 769p.
- Twarowska, J.G., Westerman, P. W. & Losordo, T. M. (1997). Water treatment and waste characterization evaluation of an intensive recirculating fish production system. *Aquacultural Engineering*. 16(3), 133-147.
- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G.W., & Cavalli, R.O. (2021). Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports* 19,1-18.
- Vo, T.T.E., Ko, H., Huh, J.H., & Kim, Y. (2021). Overview of smart aquaculture system: Focusing on applications of machine learning and computer vision. *Electronics*, 10(22), 2882.
- Vogel, T.M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(3), 311–316.
- Walsh P.J., Mommsen T.P. (2001) Evolutionary Considerations of Nitrogen Metabolism and Excretion. In: *Nitrogen Excretion* (eds. Wright PA, Anderson PM), pp. 1-26. Academic Press.
- Wang, T., Chen, M., Liang, X., Chen, F., He, T., & Li, Z. (2022). The alkali-tolerant bacterium of *Bacillus thuringiensis* EM-A1 can effectively perform heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 818316.
- Weirich, C.R.; Browdy, C.L.; Bratvold, D.; Mcabee, B.J.; Stokes, A.D. (2002). Preliminary characterization of a prototype -minimal exchange superintensive shrimp production system. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Recirculating Aquaculture*. 2002.
- Wetzel, R.G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*. 3ª edição. Academic Press.
- Winogradsky, S. (1892). Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur*, 6, 61-68.
- Wright P.A. (1995) Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology* 198, 273-281.
- Yalçın, Z.G., Dağ, M., & Aydoğmuş, E. (2023). Wastewater treatment using active microorganisms and evaluation of results. *Int. J. Adv. Nat. Sci. Eng. Res*, 7, 55-61.
- Yang, X., Zhang, S., Liu, J., Gao, Q., Dong, S., & Zhou, C. (2021). Deep learning for smart fish farming: applications, opportunities and challenges. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 66-90.
- Yogev, U., Vogler, M., Nir, O., Londong, J., & Gross, A. (2020). Phosphorous recovery from a novel recirculating aquaculture system followed by its sustainable reuse as a fertilizer. *Science of The Total Environment*, 722, 137949.

- Zablon, W. O., Ogello, E.O., Getabu, A., & Omondi, R. (2022). Biofloc system improves protein utilization efficiency and growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fry: Experimental evidence. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 2(2), 94-103.
- Zafar, M.A., & Rana, M.M. (2022). Biofloc technology: an eco-friendly “green approach” to boost up aquaculture production. *Aquaculture International*, 30(1), 51-72.
- Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989.
- Zambrano, A.F., Giraldo, L.F., Quimbayo, J., Medina, B., & Castillo, E. (2021). Machine learning for manually-measured water quality prediction in fish farming. *Plos One*, 16(8), e0256380.
- Zhang, C., Li, S., & Ho, S. (2021). Converting nitrogen and phosphorus wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: a critical review. *Bioresource Technology*, 126056.
- Zhang, M.K., & Fang, L.P. (2006). Phosphorus accumulation and eutrophication in feed-supply freshwater fishponds. *Journal of Environmental Sciences*, 18(4), 816-821.
- Zhang, Z., Wu, Y., Zhang, Y., Cao, Y., Chen, S., Tian, Z., ... & Chen, A. (2022). Effects of adding EM bacteria and mechanical aeration on water quality, growth and antioxidant status of *Meretrix meretrix* and *Exopalaemon carinicauda* farmed in the clam–shrimp polyculture system. *Aquaculture Research*, 53(5), 1823-1832.
- Zhao, S., Zhang, S., Liu, J., Wang, H., Zhu, J., Li, D., & Zhao, R. (2021). Application of machine learning in intelligent fish aquaculture: A review. *Aquaculture*, 540, 736724.
- Zheng, X., Tang, J., Ren, G., & Wang, Y. (2017). The effect of four microbial products on production performance and water quality in integrated culture of freshwater pearl mussel and fishes. *Aquaculture Research*, 48(9), 4897-4909.
- Zhou, Q., Wu, K., Yao, L., Chen, R., Liu, S., Xing, H., ... & Wu, Z. (2023). Bio-ecological remediation of freshwater aquaculture environments: A systematic review and bibliometric analysis. *Water Biology and Security*, 100229.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., & Smith, G. M. (2007). *Analysing Ecological Data*. Springer.