



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Wilson Pereira Maia

Influência de biorremediador no cultivo intensivo de alevinos de tilápia-do-nilo em sistema de bioflocos

Florianópolis

2023

Wilson Pereira Maia

Influência de biorremediador no cultivo intensivo de alevinos de tilápia-do-nilo em sistema de bioflocos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Maurício Laterça Martins, Dr.
Coorientador: Marco Shizuo Owatari, Dr.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Maia, Wilson Pereira

Influência de biorremediador no cultivo intensivo de
alevinos de tilápia-do-nilo em sistema de bioflocos /
Wilson Pereira Maia ; orientador, Maurício Laterça Martins
, coorientador, Marco Shizuo Owatari, 2023.
32 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Tilapicultura. 3. Microbioma. 4.
Probiótico. 5. Sistema BFT. I. Martins , Maurício Laterça .
II. Owatari, Marco Shizuo . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
IV. Título.

Wilson Pereira Maia

Influência de biorremediador no cultivo intensivo de alevinos de tilápia-do-nilo em sistema de bioflocos

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado em 29/09/2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Maurício Laterça Martins Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuner
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Jaqueline Inês Alves de Andrade
Instituto Federal Catarinense - IFC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Maurício Laterça Martins Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023

Dedico esse estudo a toda minha família,
para minha companheira e amigos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wilson Maia e Eulina Pereira, por todo apoio e amor incomensurável, minha gratidão eterna a vocês, a minha felicidade é ver vocês felizes, amo vocês!

Minha companheira Bruna Larissa, por todo apoio nessa caminhada que começou lá atrás em 2017, por toda felicidade, leveza, paz, lugares que formos, shows, jogos em estádio, todos esses momentos estão gravados em mim eternamente, ao teu lado evolui e continuou evoluindo como homem e profissional oceanógrafo, palavras são poucas para descrever meu amor por ti, te amo!

Minha irmã Daiany Luísa pelo carinho que tens por mim e que essa dissertação possa de alguma lhe inspirar durante sua trajetória acadêmica.

In memoriam aos meus avós, Wilson Benedito “Mestre Willian”, Antônia Santos “Mizinha”, Severiano Pereira “Sívico”, Cândida Cunha e tio Manuel “Maneco” a saudade eterniza a presença de quem se foi, quem é amado e lembrado jamais desaparecerá.

As minhas tias e tio por todo carinho e apoio incluísse financeiro, um grande abraço a todos, amo vocês!

Aos meus primos e primas, no qual tenho como irmãos, amo cada um de vocês, em especial ao meu primo mais novo Davi, que terá um universo todo para explorar.

Aos meus orientadores Prof. Maurício Laterça Martins e Dr. Marco Shizuo, por essa oportunidade de desenvolver esse estudo, por todo apoio e ensinamentos, a paixão de vocês pela ciência é inspiradora.

Ao Laboratório AQUOS e todo seu corpo de funcionários sempre extremamente simpáticos e prestativos, prontos a auxiliar a qualquer momento.

A toda “raça” do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), vou sempre lembrar das tardes de café e confraternizações, foram pessoas que me receberam de coração aberto, sou grato a todos.

Agradeço a coordenação do programa de Pós-Graduação em aquicultura – PPGAQI na figura do Carlito, que me ajudou bastante no momento que mais precisei de ajuda dentro da Pós-Graduação, você é um querido, muito obrigado.

A amiga Alaine Carneiro por todo suporte a mim dado assim que cheguei em Florianópolis – SC, você me ajudou bastante durante meu processo de adaptação.

A todos os amigos que fiz em Florianópolis – SC, vocês me apresentaram lugares incríveis nessa cidade maravilhosa.

Por fim, gratidão a todas as oportunidades que o mestrado me proporcionou, foram vivências incríveis que pude desfrutar como aluno, o que era apenas um sonho distante se tornou real. Obrigado.

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma das espécies de peixe mais importantes para a aquicultura e pode ser cultivada em diferentes sistemas de produção. Os sistemas com tecnologia de bioflocos (BFT) se destaca pelo seu baixo impacto ambiental, e pela produção e gestão de comunidades microbianas dentro da coluna d'água. Entre as alternativas ambientalmente amigáveis, capazes de modular o microbioma intestinal de peixes, destacam-se os probióticos e os ácidos orgânicos, que exercem influência positiva sobre os índices zootécnicos e imunológicos de peixes. O objetivo desse estudo foi estabelecer relações entre o microbioma da água e do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo cultivados em sistema BFT. Para isso, foi utilizado o Sequenciamento de Alto Rendimento (SAR) que possibilitou o sequenciamento do perfil microbiano e o mapeamento completo da comunidade bacteriana intestinal e da água do sistema BFT. Os peixes foram cultivados em seis tanques circulares em condições heterotróficas utilizando a tecnologia BFT, sendo alimentados quatro vezes ao dia, com uma taxa de alimentação de 3,0% do peso vivo. Com a adição do biorremediador a diversidade da microbiota aquática e intestinal das tilápias foi influenciada. Nos tanques onde foi adicionado o biorremediador, foi registrada maior diversidade de bactérias tais como Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria. O uso do biorremediador produziu implicações significativas para a saúde e o bem-estar dos peixes cultivados, de forma que diminuíram a distribuição de possíveis bactérias patogênicas no intestino dos peixes, colaborando para uma gestão sustentável da aquicultura.

Palavras-chave: Aquicultura; Tilapicultura; Microbioma; Probiótico; Sistema BFT

ABSTRACT

Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, is one of the most important fish species for aquaculture and can be cultivated in different production systems. Systems with biofloc technology (BFT) stand out for their low environmental impact, and for the production and management of microbial communities within the water column. Among the environmentally friendly alternatives, capable of modulating the intestinal microbiome of fish, probiotics and organic acids stand out, which have a positive influence on the zootechnical and immunological indexes of fish. The objective of this study was to establish relationships between the water and intestinal microbiome of juvenile Nile tilapia cultured in a BFT system. For this, High Throughput Sequencing (SAR) was used, which enabled the sequencing of the microbial profile and the complete mapping of the intestinal bacterial community and the water of the BFT system. The fish were cultivated in six circular tanks under heterotrophic conditions using BFT technology, being fed four times a day, with a feeding rate of 3.0% of live weight. With the addition of the bioremediator, the diversity of the aquatic and intestinal microbiota of tilapia was influenced. In the tanks where the bioremediator was added, a greater diversity of bacteria was recorded, such as Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria. The use of bioremediation produced significant implications for the health and well-being of farmed fish, reducing the distribution of possible pathogenic bacteria in the intestine of fish, contributing to sustainable management of aquaculture.

Keywords: Aquaculture; Tilapiculture; Microbiome; Probiotic; BFT System.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Comunidade bacteriana na água durante o cultivo de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* sob condições de bioflocos (BFT). 23
- Figura 2 Espécies bacterianas potencialmente patogênicas encontradas no intestino da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* cultivada em condições de bioflocos (BFT). 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de qualidade da água durante o cultivo de tilápia-do-nilo <i>Oreochromis niloticus</i> em condições de bioflocos (BFT) em escala comercial.....	22
Tabela 2	Índices de desempenho de crescimento da tilápia-do-nilo <i>Oreochromis niloticus</i> sob condições de bioflocos (BFT) em escala comercial	26

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivos Específicos	15
2.1	INTRODUÇÃO	17
2.1.1	Material e Métodos	18
2.1.2	Delineamento experimental	19
2.1.3	Parâmetros zootécnicos	19
2.1.4	Sequenciamento de alto rendimento (SAR)	20
2.1.5	Parâmetros físico-químicos da água	21
2.1.6	Análise estatística	21
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
2.3.	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS	27
	REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	31

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce em comparação a outras atividades do setor de alimentos, sendo responsável pelo aumento do consumo de pescado para alimentação humana. No ano de 2020, a produção aquícola global atingiu 214 milhões de toneladas, resultados que mostraram um aumento de 3% em relação a estudos anteriores (FAO, 2022).

A produção brasileira de pescado em 2022 atingiu 860.355 toneladas, sendo que a tilápia é a espécie mais cultivada na piscicultura brasileira, respondendo por 63,9% da produção, tornando o país o quarto maior produtor do mundo (PEIXE BR, 2023). Prevê-se que em até 2050, a população global atinja a marca de 9,5 bilhões de pessoas. Com esse crescimento populacional, espera-se também um aumento na demanda por proteínas de alta qualidade. (TACON; METIAN; MCNEVIN, 2022). Neste sentido a indústria aquícola tem um papel vital em fornecer as futuras exigências alimentares, adotando estratégias ecologicamente sustentáveis. (KHANJANI et al., 2023).

Uma das espécies mais importantes para a aquicultura, se adapta facilmente a diferentes condições ambientais e alimentares, por apresentar rápido crescimento e alta produtividade (KHANJANI; SHARIFINIA; HAJIREZAEI, 2022). De hábito onívoro, a tilápia se alimenta tanto de ração comercial como de plantas, algas, insetos e também filtra partículas alimentares presentes na água (RODRIGUES et al., 2015; DURIGON et al., 2020). Diante disso, a espécie pode ser cultivada em diferentes sistemas de produção.

A tecnologia de bioflocos (BFT) destaca-se por ser uma tecnologia sustentável e de baixo impacto ambiental (BROL et al., 2017; LAICE et al., 2021). O BFT envolve a produção e gestão de comunidades microbianas dentro da coluna de água. Vários estudos têm investigado a utilização da BFT para a cultura de tilápias, com resultados promissores (DURIGON et al., 2020; LAICE et al., 2021; RODRIGUES et al., 2015).

O BFT caracteriza-se por altas densidades populacionais de peixes, baixas trocas de água, e pela presença de sólidos em suspensão, que são formados por agregados microbianos, matéria fecal, e ração não consumida (EMERENCIANO et al., 2017; YU et al., 2023), em sistemas BFT, tilápias podem obter grande parte das proteínas alimentares das comunidades microbianas presentes na coluna de água, reduzindo a dependência da alimentação comercial e melhorando a viabilidade econômica do cultivo (DOS SANTOS LIMA et al., 2021).

Neste sistema, a conversão de resíduos nitrogenados em proteínas microbianas é facilitada pela presença de bactérias autotróficas, que podem utilizar fontes de carbono para converter amônia e nitritos em nitratos (DOS SANTOS LIMA et al., 2021; EL-HAWARRY et al., 2021). O nitrato produzido pode então ser utilizado por bactérias autotróficas para produzir proteína microbiana, que pode ser consumida pela tilápia. Além disso, o biofloco do sistema BFT pode fornecer uma fonte de fibra alimentar e ácidos graxos essenciais, melhorando ainda mais a nutrição da tilápia (GULLIAN KLANIAN et al., 2020; YU et al., 2023)

Pesquisas recentes mostraram que os sistemas BFT podem melhorar o desempenho zootécnico, a taxa de sobrevivência e a resposta imunitária da tilápia em comparação com os métodos tradicionais de cultivo (GULLIAN KLANIAN et al., 2020), além disso o sistema BFT também exerce um efeito protetor contra patógenos como *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, e *Streptococcus iniae*, causadores de grandes perdas econômicas nas pisciculturas (YU et al., 2023). Esse efeito protetor do sistema BFT ocorre devido à presença de várias substâncias bioativas no sistema, incluindo a clorofila, polifenóis, caroteno, taurina, polissacarídeos, fitoesterol e vitaminas, que possuem capacidade antagonista contra agentes patogênicos, suprimindo os surtos de doenças e melhorando a imunidade dos peixes cultivados (KIM et al., 2020).

O microbioma da água de sistemas BFT é composto por uma grande variedade de microrganismos, como bactérias, fungos, algas e protozoários (EL-SAYED, 2021). As bactérias são os principais componentes do microbioma da água em sistemas BFT (EL-SAYED, 2021). In-Kwon (2012) relatou que mais de 2000 espécies de bactérias podem crescer adequadamente no sistema BFT. Dentre estas, as bactérias nitrificantes e heterotróficas são consideradas os grupos mais importantes (KHANJANI; MOHAMMADI; EMERENCIANO, 2022).

As comunidades microbianas no habitat aquático respondem a mudanças em seu ambiente de forma imediata. Estas alterações podem ser sutis, manifestando-se como ativação ou inativação de vias metabólicas específicas na comunidade bacteriana ou através da alteração na composição e funcionalidade dos processos endógenos dos peixes (GULLIAN-KLANIAN; QUINTANILLA-MENA; HAU, 2023).

Nas últimas décadas, a utilização de aditivos alimentares como os probióticos, tem mostrado bons resultados em termos de crescimento, imunologia, resistência a doenças, e melhorias na digestibilidade, produção de enzimas, e controle do microbioma intestinal em peixes (PEREIRA et al., 2020a).

Vários autores já relataram que os bioflocos formados no sistema BFT também são formados por bactérias probióticas, que podem melhorar a digestão e a absorção de nutrientes

e de modo produzir influência positivamente sobre o sistema imunológico dos peixes (HARAZ et al., 2023; KHANJANI; SHARIFINIA; HAJIREZAEI, 2022; VAN DOAN et al., 2021; YU et al., 2023).

A biorremediação é definida como um ramo da biotecnologia que apresenta diversas técnicas, com a ajuda de microrganismos, para tratamento de água contaminada, bem como, dos resíduos orgânicos, transformando a um estado inócuo ou a níveis abaixo dos limites de concentração estabelecidos; (STRONG; BURGESS, 2008). Além disso, pode ser utilizada em cultivos aquícolas para a modulação de comunidade de microrganismos benéficos na água (VENKATESWARA, 2007).

A aplicação de biorremediador diretamente na água de cultivo para aquicultura está relacionada aos benefícios na saúde dos peixes por meio da melhoria das variáveis abióticas e bióticas da água e na inibição de patógenos (VENKATESWARA, 2016). Por outro lado, determinadas bactérias são capazes de melhorar a qualidade da água decompondo a matéria orgânica em dióxido de carbono em produções intensivas (LOH, 2017), bem como, redução de bactérias patogênicas e fitoplâncton prejudicial (ZORRIEHZAHRA et al., 2016). Além disso, podem trazer benefícios nas alterações histológicas no fígado e intestino proporcionando melhor crescimento aos peixes (ZHOU et al., 2010).

Na biorremediação, os microrganismos utilizados podem ser isolados da natureza. Normalmente se utiliza bactérias do gênero *Bacillus* spp., *Pseudoalteromonas* spp., e *Achromobacter* spp., que possuem características específicas como a liberação de enzimas digestivas que aceleram a degradação de componentes orgânicos em determinadas condições. Outra bactéria que tem sido bastante utilizada é do gênero *Lactobacillus* spp., sendo a *L. plantarum* um exemplo no uso de bactérias lácticas (VINE et al., 2010), pois são de fácil multiplicação, produzem compostos antimicrobianos e estimulam resposta imune inespecífica nos hospedeiros (GATESOUBE, 2012).

Amorim (2018) sugeriu que a suplementação de dietas com *blend* comercial de ácidos orgânicos em dietas para juvenis de tilápias, produziu efeitos benéficos para o: desempenho produtivo, composição corporal, digestibilidade de nutrientes, taxa de eficiência proteica, índices fisiológicos e sobre a histomorfometria intestinal.

A microbiota desempenha um papel essencial para o bom desenvolvimento e maturação do trato gastrointestinal e sobre o sistema imune em peixes, pela regulação da expressão molecular associada com a proliferação e diferenciação intestinal, o metabolismo dos nutrientes e genes de resposta inata (QUESADA, 2019).

Embora a água e a ração sejam as duas principais fontes de microrganismos disponíveis para os peixes, os fatores subjacentes à colonização bem-sucedida dos microrganismos ingeridos e a comunidade microbiana intestinal ainda são mal compreendidos (GIATSI et al., 2016).

Por esta razão, a previsibilidade e repetitividade das manipulações do microbioma intestinal atualmente é limitada. As vantagens da utilização de probióticos e ácidos orgânicos como aditivos alimentares na aquicultura são comprovadas, porém pouco se sabe sobre a influência destes aditivos sobre a dinâmica do microbioma em sistemas BFT. Este conhecimento é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes para o controle de doenças e a maximização do crescimento dos organismos aquáticos.

O objetivo deste estudo foi estabelecer relações entre o microbioma da água e do intestino de alevinos de tilápia-do-Nilo cultivadas em sistema BFT

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estabelecer relações entre o microbioma da água e do intestino de alevinos de tilápia-do-nilo cultivadas em sistema BFT.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se a inclusão de biorremediador na água do cultivo de alevinos de tilápia-do-nilo diminui a presença de bactérias patogênicas no microbioma intestinal.
- Analisar o microbioma da água e do intestino de alevinos de tilápia-do-nilo.

2. CAPÍTULO 1: USO DE BIORREMEIADOR COMERCIAL MULTI-CEPAS PARA PRODUÇÃO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO EM CONDIÇÕES DE BIOFLOCOS: UM ESTUDO DE CAMPO

O artigo esta formatado de acordo com as normas da revista Aquaculture Elsevier, Qualis CAPES A1

Wilson Pereira Maia¹, Marco Shizuo Owatari¹, Natieli Inacio Fernandes², Luís Otávio Martini Del Guerra³, José Luiz Pedreira Mouriño¹, Maurício Laterça Martins¹

¹AQUOS-Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), SC.

²Aquicultura e Gestão de Projetos, Dourados, MS.

³HIPHRA.

Resumo

O presente estudo de campo avaliou a influência de um biorremediador comercial (*Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Paracoccus* sp.) na fase de alevinagem da tilápia-do-nilo em condições de bioflocos (BFT). Para isso, 780 mil alevinos de tilápia com peso médio inicial de $1,36 \pm 0,26$ g foram distribuídos em seis tanques circulares de 50m^3 e submetidos a diferentes tratamentos: grupo controle sem biorremediador e grupo com biorremediador. O biorremediador foi aplicado diretamente na água do bioflocos, na dosagem de 3 g m^{-3} (150 g por tanque) a cada três dias, seguindo as recomendações do fabricante, durante 24 dias. Foram realizadas análises de desempenho de crescimento, qualidade da água e metagenômica para mapear a comunidade microbiana tanto na água BFT quanto no intestino dos peixes. O biorremediador não alterou as variáveis de qualidade da água no BFT, porém foram observadas diferenças significativas na comunidade microbiana aquática e intestinal, bem como no desempenho de crescimento da tilápia. O grupo biorremediação apresentou maiores índices de peso final, ganho de peso, ganho de peso diário, ganho de biomassa, taxa de crescimento específico, produtividade e conversão alimentar. Em relação à diversidade bacteriana, foram identificados 13 filos, 41 ordens e 114 gêneros bacterianos na água dos bioflocos. As maiores diversidades de filos, ordens e gêneros foram observadas no grupo biorremediador. O grupo controle apresentou maior número de espécies potencialmente patogênicas na água BFT, com destaque para *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *Edwardsella* spp., *Flavobacterium* spp., *Mycobacterium* spp. No microbioma intestinal, identificamos 186 espécies bacterianas; 174 gêneros bacterianos no grupo controle e 52 no grupo de biorremediação. O grupo biorremediador apresentou diminuição da diversidade bacteriana, porém a quantidade de bactérias com potencial patogênico como *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*; *Flavobacterium* spp., *Mycobacterium flavescens* e *Vibrio cholerae* estavam diminuídos no intestino dos peixes deste grupo. O biorremediador promoveu a manutenção da qualidade da água, melhorou os indicadores de crescimento e reduziu a presença de patógenos Gram-negativos e Gram-positivos, tanto na água quanto no intestino da tilápia do Nilo criada sob condição de bioflocos em situação real de produção.

Palavras-chave: Aquicultura; cultura da tilápia; microbioma; probiótico; Biorremediação.

2.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, onde a tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* se destaca com grande proeminência na piscicultura mundial (FAO, 2022) devido às suas características organolépticas e fisiológicas, compatíveis com a atividade aquícola (Khanjani et al., 2022). Além disso, nos últimos anos a produção de tilápia tem ganhado destaque em sistemas com tecnologia de bioflocos (Barbosa et al., 2022).

A tecnologia de bioflocos (BFT) se destaca por ser uma tecnologia sustentável de baixo impacto ambiental e altas densidades populacionais de peixes, que envolve a produção e gestão de comunidades microbianas (Laice et al., 2021; Khanjani et al., 2022); e tem como princípio fundamental o estabelecimento de uma elevada relação carbono/nitrogênio (C:N) na água para estimular o crescimento de bactérias heterotróficas. Tais Bactérias metabolizam compostos nitrogenados e os transformam em biomassa microbiana que, eventualmente, pode ser aproveitada como suplementação dietética de organismos cultivados (Samocha, 2019). Além disso, o BFT pode fornecer uma fonte de fibra alimentar e ácidos graxos essenciais, melhorando ainda mais a nutrição da tilápia (Gullian-Klanian et al., 2020; Yu et al., 2023). Diversos estudos têm investigado a utilização da BFT para a cultura de tilápias, com resultados promissores (Durigon et al., 2020; Laice et al., 2021; Khanjani et al., 2022). Por exemplo a diversidade dos grupos bacterianos presentes no biofoco podem contribuir no metabolismo digestivo e no desempenho de *O. niloticus* (Gullian-Klanian et al., 2023), bem como reduzir a dependência da alimentação comercial e melhorar a viabilidade econômica do cultivo (Lima et al., 2021).

Pesquisas recentes mostraram que os sistemas com tecnologia BFT exercem um efeito protetor contra patógenos como *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, e *Streptococcus iniae*, causadores de grandes perdas econômicas nas pisciculturas (Yu et al., 2023). Esse efeito protetor ocorre devido à presença de várias substâncias bioativas no sistema, incluindo a clorofila, polifenóis, caroteno, taurina, polissacarídeos, fitoesterol e vitaminas, que possuem capacidade antagonista contra agentes patogênicos, suprimindo os surtos de doenças e melhorando a imunidade dos peixes cultivados (Kim et al., 2020).

O microbioma da água de sistemas BFT é composto por uma grande variedade de microrganismos, como fungos, algas, protozoários e principalmente por bactérias (El-Sayed, 2021). Segundo In-Kwon (2012) mais de 2000 espécies de bactérias podem crescer adequadamente no sistema BFT, dentre as quais, se destacam as bactérias nitrificantes e bactérias heterotróficas como os grupos mais importantes (Khanjani et al., 2022). Tais comunidades microbianas no ambiente aquático respondem a mudanças em seu ambiente de

forma imediata. Estas alterações podem ser sutis, manifestando-se como ativação ou inativação de vias metabólicas específicas na comunidade bacteriana ou através da alteração na composição e funcionalidade dos processos endógenos dos peixes (Gullian-Klanian et al., 2023). Dessa forma, uma possibilidade de causar mudanças nas comunidades microbianas do biofoco seria a aplicação direta de probióticos na água do cultivo.

Nas últimas décadas, pesquisas em escala laboratorial investigaram o potencial de biorremediação de probióticos baseados em bactérias do gênero *Bacillus* e resultados promissores foram evidenciados (Khanjani et al., 2022; Oliveira et al., 2023). Já se sabe que algumas cepas do gênero *Bacillus* são capazes de nitrificação heterotrófica (Huang et al., 2017), enquanto *Thiobacillus denitrificans* e *Paracoccus* sp. são bactérias que participam do ciclo de oxidação do enxofre e desmineralização do nitrogênio (Jaffer et al., 2019; Ahmad et al., 2022). Além disso, vários autores já relataram que os flocos formados no BFT também são formados por bactérias probióticas, que podem melhorar a digestão e absorção de nutrientes, produzindo assim uma influência positiva no sistema imunológico dos peixes (Van Doan et al., 2021; Khanjani et al., 2022; Haraz et al., 2023; Yu et al., 2023). No entanto, as avaliações em condições reais de cultivo, ou seja, em escala comercial, são escassas na aquicultura e requerem comprovação técnica, uma vez que a previsibilidade e a repetibilidade das manipulações do microbioma em BFT em escala comercial são atualmente limitadas.

As vantagens da utilização de probióticos como aditivos alimentares na aquicultura são comprovadas, porém pouco se sabe sobre a influência destes aditivos sobre a dinâmica do microbioma em sistemas BFT comerciais.

Este conhecimento é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes para o controle de doenças e a maximização do crescimento dos organismos aquáticos. Portanto, o presente estudo de campo, baseado em evidências de pesquisas anteriores em condições laboratoriais, teve como objetivo avaliar os possíveis benefícios de um biorremediador a base de *Bacillus subtilis* AquaStar® em uma piscicultura comercial de tilápias-do-Nilo criadas em sistema de biofoco, considerando o desempenho de crescimento dos peixes, a qualidade da água e alterações na comunidade microbiana intestinal e na água do sistema.

2.1.1 Material e Métodos

Este estudo foi realizado durante um ciclo de produção de tilápia-do-nilo sob condições de biofocos em uma piscicultura comercial localizada no município de Santa Fé do Sul, São Paulo, Brasil. A piscicultura utilizou tanques circulares de polietileno de alta densidade (PEAD)

com capacidade de 50 m³, equipados individualmente com sistemas de aeração constante. Os dados de biometria e qualidade da água foram obtidos durante a rotina diária de manejo da empresa, enquanto as amostras biológicas para análise intestinal foram coletadas durante o abate dos animais no frigorífico da própria empresa.

2.1.2 Delineamento experimental

Os alevinos de tilápia-do-Nilo da linhagem GIFT (*genetically improved farmed tilapia*), foram fornecidos de uma piscicultura em Santa Fé do Sul, SP, Brazil. Para o estudo de campo, 780,000 alevinos de tilápia com peso médio inicial de 1,36±0,26 g foram distribuídos e cultivados em seis tanques circulares de 50 m³, em sistema de bioflocos (BFT) divididos em um controle sem biorremediador, e um grupo com o biorremediador AquaStar[®]. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia com uma ração comercial apropriada para tilápia contendo 38% de proteína bruta, a uma taxa de alimentação equivalente a 3% da biomassa dos peixes. O biorremediador (*Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Paracoccus* sp. na concentração de 1 × 10⁹ UFC g⁻¹) foi aplicado diretamente na água do biofoco, na dosagem de 3 g m³ (150 g por tanque) a cada 3 dias, seguindo as recomendações do fabricante. Essa etapa da avaliação teve duração de 24 dias.

Inicialmente, as seis unidades experimentais foram inoculadas com uma alíquota de 5% do tanque matriz de biofoco que apresentava os seguintes parâmetros de qualidade de água: pH 6.83, volume do floco 18 mL L⁻¹, temperatura 26.5 °C, oxigênio dissolvido 6.35 mg L⁻¹, alcalinidade 128 mg L⁻¹ CaCO₃, amônia total (TAN) 0.12 mg L⁻¹, amônia tóxica (N-NH₃) 0.00 mg L⁻¹ (abaixo dos níveis detectáveis), nitrito (N-NO₂) 0.05 mg L⁻¹, nitrato (N-NO₃) 9.25 mg L⁻¹, sólidos suspensos totais (TSS) 174 mg L⁻¹, e condutividade elétrica 1.45 µS⁻¹. Após o povoamento dos peixes no sistema, as variáveis de qualidade da água foram aferidas duas vezes ao dia e a relação C:N foi mantida em 15:1 durante todo o período experimental pela adição diária de melação (30%) como fonte de carbono. A relação C:N foi calculada com base na alcalinidade e na concentração de amônia nos tanques, com base em Jatobá et al. (2019).

2.1.3 Parâmetros zootécnicos

Ao final dos 60 dias de alimentação e após 24 horas de jejum, os peixes foram eutanasiados por secção cerebral após anestesia com sobre dose de eugenol Vetec[®] (100 mg L⁻¹), contados e pesados em balança de precisão (0,01 g) para avaliação do ganho de peso (GP),

ganho de peso em biomassa (GB), taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar (CA) e sobrevivência (S) através das seguintes equações (LAZZARI et al., 2011):

- Ganho de peso (g) = (peso médio final – peso médio inicial);
- Ganho de biomassa (kg) = (biomassa final – biomassa inicial);
- Ganho de peso diário (%) = $\{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / (\text{dias de cultivo})\}$;
- Produtividade (kg m⁻³) = $\{(\text{biomassa final} - \text{biomassa inicial}) / (\text{volume unitário experimental})\}$;
- Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) = $\{(\text{Ln}(\text{peso final}) - \text{Ln}(\text{peso inicial})) / (\text{dias de cultivo})\} \times 100$;
- Conversão alimentar = (consumo total de ração/ganho de peso);
- Sobrevivência (%) = $\{(\text{número final de animais} / \text{número inicial de animais})\} * 100$.

2.1.4 Sequenciamento de alto rendimento (SAR)

Amostras de água foram coletadas assepticamente de cada unidade de produção e mantidas em recipientes estéreis sob refrigeração. A extração total do DNA foi realizada pelo método fenol/clorofórmio. A concentração de DNA de cada pool foi estimada usando dsDNA Picogreen. Para identificar a população microbiana, o banco de bibliotecas de DNA foi ajustado para uma concentração final de 23h, e a amplificação da região V3-V4 do gene ribossômico 16 S (rRNA) foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores 341F (5' CCTACGGGRSGCAGCAG 3') e 805R (5' GGACTACCAGGGTATCTAAT 3'). As sequências foram agrupadas em Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU) usando USEARCH (versão 10.0.240) com 97% de similaridade com o algoritmo UPARSE. Para atribuição taxonômica foi utilizada a base de dados SILVA (versão 132) com 91% de identidade. Os índices de riqueza e diversidade foram calculados usando o pacote vegan R, e a cobertura de Good foi calculada usando o pacote QsRutils R.

Ao final do ciclo produtivo, as amostras biológicas para análise intestinal foram coletadas no frigorífico próprio da empresa. As amostras foram compostas por pools provenientes do trato intestinal dos peixes. Foram coletadas amostras do intestino de 30 peixes de cada unidade experimental de forma asséptica, sem o conteúdo digestivo, sendo considerada uma amostra, ou seja, foram coletadas seis amostras (três de cada grupo). As amostras foram armazenadas a -80°C até o processamento. Posteriormente, o ácido desoxirribonucléico (DNA) foi extraído com o kit comercial QIAamp® DNA Stool mini (QIOGEN, Hilden, Alemanha, DE), conforme recomendação do fabricante. O material extraído foi quantificado utilizando o

espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific DE, EUA). As amostras foram mantidas acima de $60 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), a amplificação das amostras de DNA foi enviada à empresa MacroGen® para sequenciamento de alto rendimento (HTS). A amplificação por PCR da população microbiana foi realizada pela primeira vez amplificando a região V3-V4 do gene do ácido ribonucleico ribossômico 16S (rRNA). A PCR foi realizada utilizando primers para bactérias: 341F (5'CCT ACG GGN GGC WGC AG 3') e 805R (5' GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 3') e purificado em gel.

Para sequenciamento de alto rendimento, foi realizado utilizando a tecnologia Illumina SBS, marcando os nucleotídeos ligados em cada ciclo por fluorescência. Análises taxonômicas das leituras sequenciais foram realizadas após filtrar as leituras e cortar cortes extras. As sequências de ruído foram removidas do cluster e as leituras representativas restantes dos clusters foram agrupadas usando algoritmo ganancioso em unidades de taxonomia operacional (OTUs) por meio de ajuste rápido de comprimento de leitura curta (FLASH) e as leituras agrupadas com 100% de identidade (ID) usando CD- HIT-DUP em um único arquivo. As sequências foram então analisadas usando Quantitative Insights in Microbial Ecology (QIIME). As OTUs foram coletadas usando um filtro de qualidade para garantir 97% de identificação em nível de espécie. Para o sequenciamento foi utilizado um alinhamento mínimo de 300 pares de bases (pb) e com 20k leituras por amostra.

2.1.5 Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água dos tanques tratamento e controle foram monitorados diariamente e apresentaram pouca variabilidade mantendo-se dentro dos padrões recomendados pela literatura para o cultivo em tecnologia bioflocos.

2.1.6 Análise estatística

Os dados obtidos de desempenho produtivo e qualidade da água foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se a distribuição dos dados estava dentro da curva de normalidade e ao teste de Levene para verificar a homocedasticidade. Os dados obtidos que atenderam aos pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade foram submetidos ao teste t de Student. Todas as análises têm significância de 5%.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

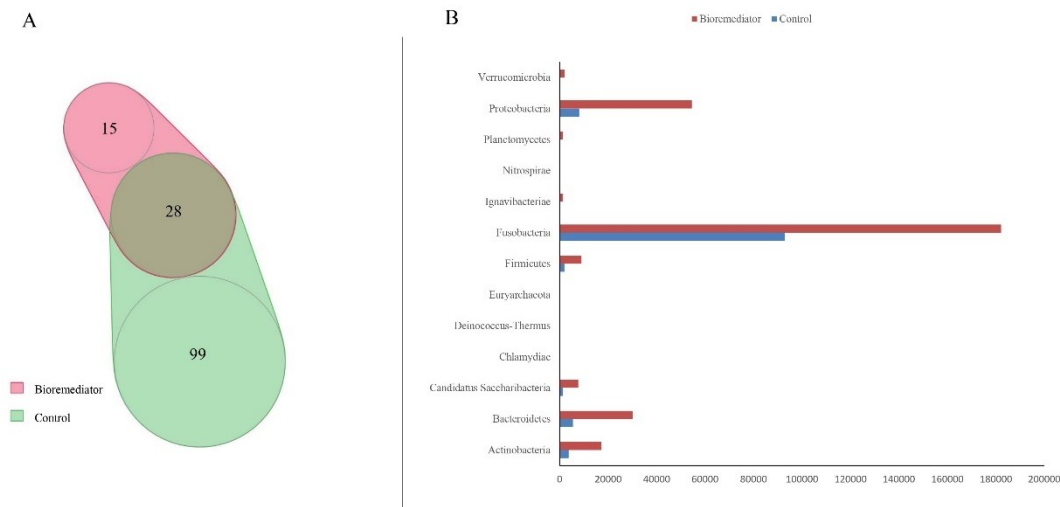
A aplicação do biorremediador não alterou significativamente ($p>0,05$) as variáveis de qualidade da água entre os tratamentos (Tabela 1). A aplicação de biorremediadores diretamente na água dos tanques de aquicultura está relacionada aos benefícios no tratamento de lodo de aquicultura e à saúde dos peixes, através da melhoria de variáveis abióticas e bióticas na água e da inibição de patógenos (Zhou et al., 2010; Zorriehzahra et. al., 2016; Huang et al., 2017; Jaffer et al., 2019; Ahmad et al., 2022). No presente estudo de campo, apesar de não ter sido observadas alterações significativas nas variáveis de qualidade da água entre os grupos, destaca-se que os animais do grupo de biorremediação alcançaram uma biomassa final significativamente maior. Fator que provavelmente contribuiu para maior geração de resíduos na água. Portanto, é muito provável que essa igualdade estatística na qualidade da água entre os grupos se deva ao biorremediador, que foi capaz de manter compostos de nitrogênio e sólidos suspensos totais equivalentes entre os grupos.

Foram identificadas a presença de 13 filos, 41 ordens, 114 gêneros e 142 espécies bacterianas na água do biofloco (Figura 1). Porém, observou-se maior diversidade de filos, ordens e gêneros nos tanques aos quais o biorremediador foi adicionado. A indicação da presença de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Nitrobacter* destaca a importância destas espécies no processo de biorremediação. O fato de *Nitrobacter* contribuir para a conversão de nitrito em nitrato (Owatari et al., 2018) é relevante, pois ajuda a manter níveis aceitáveis destas substâncias nos tanques, evitando possíveis impactos negativos na qualidade da água.

Tabela 1: Parâmetros de qualidade da água durante o cultivo de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* em condições de bioflocos (BFT) em escala comercial. Os dados representam o grupo controle sem biorremediador e um grupo com biorremediador. Os dados foram submetidos ao teste t de Student. Todas as análises têm significância de 5%.

Indicadores de qualidade de água	Tratamentos		
	Controle	Biorremediador	Valor de <i>p</i>
Temperatura (°C)	27.5±0.26	27.33±0.15	0.193
pH	7.80±0.01	7.75±0.05	0.115
Salinidade (‰)	0.5±0.0	0.5±0.0	-
Amônia tóxica (mg L ⁻¹)	0.44±0.31	0.14±0.07	0.110
Nitrito-N (mg L ⁻¹)	0.06±0.05	0.02±0.01	0.153
Nitrato-N (mg L ⁻¹)	0.02±0.01	0.01±0.01	0.245
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	4.67±0.29	4.83±0.58	0.253
Sólidos suspensos totais (mg L ⁻¹)	203.2±40.41	213.33±56.86	0.387
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	152.22±14.24	132.18±54.23	0.290
Condutividade elétrica (µS ⁻¹)	258.36±193.23	196.17±31.78	0.316

Figura 1: Comunidade bacteriana na água durante o cultivo de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* sob condições de bioflocos (BFT). Os dados representam o grupo controle sem biorremediador e um grupo com biorremediador. Em (A) o diagrama mostrando a comunidade bacteriana compartilhada entre os tratamentos em água BFT. Em (B) os filos bacterianos encontrados nos respectivos tratamentos.



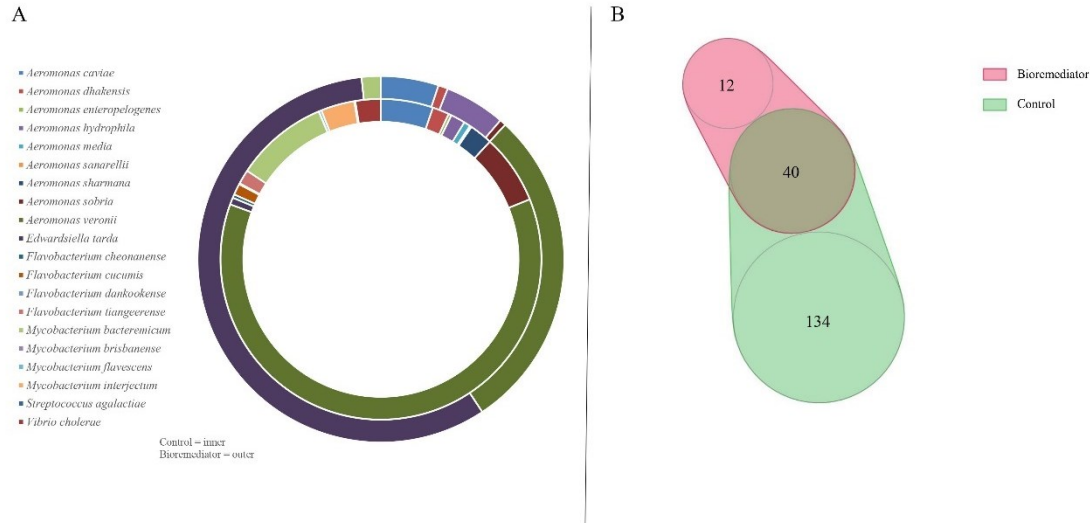
Com relação aos filos, destacam-se as proteobactérias que desempenham um papel importante na ciclagem de nutrientes, degradação de resíduos orgânicos, fixação de nitrogênio, proteção contra agentes patogênicos e biodegradação de compostos tóxicos (Bereded et al., 2021), enquanto a ordem Fusobacteriales, pertencentes ao gênero *Cetobacterium*, desempenham um papel importante na aquicultura, devido a várias funções essenciais, tais como degradação de compostos orgânicos, ciclagem de nutrientes, e competição com patógenos, de forma que essa ordem ajuda a prevenir doenças e promovendo a saúde dos peixes (Fan et al., 2021). Por outro lado, as bactérias do gênero *Cetobacterium*, as quais possuem um importante papel na aquicultura como probiotic for fish, melhoram a digestão de nutrientes (Qi et al., 2023). Neste contexto, o uso do biorremediador favoreceu a presença de filos potencialmente benéficos, promovendo uma maior diversidade bacteriana para o BFT, promovendo melhorias desejáveis na aquicultura.

Além dos efeitos benéficos sobre o incremento na diversidade de Filo, Ordem e Gêneros bacterianos, no presente estudo destacamos a presença de 20 potenciais bactérias patogênicas na água do BFT, com destaque para *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp., *Edwardsella* spp., *Flavobacterium columnare*, *Mycobacterium* spp., *Streptococcus agalactiae*, conhecidas na aquicultura pelo seu impacto econômico na produção comercial (Tavares-Dias and Martins, 2017). Devido a ação do biorremediador, aplicado diretamente na água, observou-se que as bactérias potencialmente patogênicas foram menos frequentes na água do BFT, indicando que o biorremediador foi um importante aliado na saúde dos peixes e refletindo nos indicadores de crescimento. Tais benefícios fortalecem o uso de biorremediadores em BFT comercial.

No presente estudo, foram identificadas 186 espécies de bactérias no intestino das tilápias. Um total de 174 gêneros bacterianos foram identificadas no grupo controle, enquanto 52 espécies no grupo biorremediador (Figura 2). Os grupos, controle e biorremediador, compartilharam 40 espécies de bactérias. O grupo biorremediador apresentou uma diminuição na diversidade bacteriana, contudo demonstrou potencial para reduzir a quantidade de bactérias com potencial patogênico no intestino.

A colonização precoce do intestino dos peixes tem sido estudada nos últimos anos com o objetivo de alterar e direcionar o crescimento de bactérias intestinais benéficas durante o início da vida e como tais mudanças afetam a microbiota intestinal em fases posteriores da vida dos peixes (Giatsis et al., 2016). Embora a água e os alimentos sejam as duas principais fontes de microrganismos disponíveis para os peixes, os fatores subjacentes ao sucesso da colonização dos microrganismos ingeridos e da comunidade microbiana intestinal ainda não são totalmente compreendidos. Segundo Giatsis et al. (2016), estudos que enfocam os efeitos de longo prazo dos probióticos legados durante os estágios iniciais do desenvolvimento animal são desejáveis na aquicultura. Apesar disso, o presente estudo relatou que o biorremediador à base de *Bacillus* causou alterações significativas na comunidade microbiana intestinal da tilápia do Nilo sob condições BFT, e tais alterações no microbioma foram verificadas em apenas 24 dias de cultivo, indicando que estes peixes obtiveram algumas vantagens para as próximas etapas de produção quando transferidos para a fase final de engorda.

Figura 2: Espécies de bactérias potencialmente patogênicas encontradas no intestino da tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* cultivada em condições de bioflocos (BFT). Os dados representam o grupo controle sem biorremediador e um grupo com biorremediador. Em (A) o gráfico mostra as principais espécies consideradas patógenos de importância aquícola, identificadas no intestino dos peixes. Em (B) o diagrama mostrando 186 espécies de bactérias no intestino da tilápia e a comunidade bacteriana compartilhada entre os tratamentos.



Em relação aos indicadores de desempenho de crescimento, observamos importantes diferenças significativas ($p < 0,05$) para peso final, ganho de peso final, ganho de peso diário, ganho em biomassa, taxa de crescimento específico, produtividade, e taxa de conversão alimentar (Tabela 2). Determinadas bactérias probióticas são capazes de melhorar a qualidade da água em produções intensivas, decompondo a matéria orgânica, reduzindo a presença de bactérias patogênicas. Além disso, podem ocasionar maior integridade do fígado e melhorias na morfometria intestinal, importantes benefícios que estão relacionados ao melhor crescimento aos peixes (Zorriehzakra et al., 2016; Loh and Ting, 2017; Jasmin et al., 2020, Oliveira et al., 2023). Ineedy, a melhoria no indicadores de crescimento no presente estudo também podem ter sido ocasionadas por benefícios na morfometria intestinal, resultando em maior absorção e aproveitamento dos nutrientes alimentares. Porém, esses indicadores não foram avaliados na presente pesquisa.

Tabela 2: Índices de desempenho de crescimento da tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* sob condições de bioflocos (BFT) em escala comercial. Os dados representam o grupo controle sem biorremediador e um grupo com biorremediador. Os dados foram submetidos ao teste t *Student*. Todas as análises têm significância de 5%. (*) Significativo.

Índices zootécnicos	Tratamentos		
	Controle	Biorremediador	Valor de <i>p</i>
Dias de cultivo	24	24	-
Número de peixes inicial (n)	390.000	390.000	-
Peso inicial (g)	1,36±0,26	1,36±0,26	-
Biomassa inicial (kg)	530,4±11,40	530,4±11,40	-
Biomassa total final (kg)	1.382,59±17,74	1.454,16±81,60	0,061
Peso final (g)*	3,74±0,51	4,20±1,46	0,002
Ganho de peso (g)*	2,38±0,36	2,84±0,85	<0,001
Ganho de peso diário (g day ⁻¹)*	0,09±0,01	0,12±0,03	0,040
Ganho em biomassa (kg)*	852,19±6,34	923,76±72,2	0,016
Taxa de crescimento específico (% day ⁻¹)*	2,33±0,04	3,07±0,12	<0,001
Produtividade (kg m ⁻³)*	17,04±0,12	18,67±1,40	<0,001
Conversão alimentar*	1,10±0,02	1,29±0,11	0,019
Sobrevivência (%)	94,8±4,82	88,68±4,14	0,085

Laice et al. (2021), observaram efeitos benéficos para o desempenho produtivo da tilápia após o uso de uma combinação de prebióticos e probióticos na água do bioflocos, sem causar alterações significativas na morfometria intestinal. Entretanto, a microbiota intestinal desempenha um papel essencial para o desenvolvimento e maturação do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, sobre o metabolismo dos nutrientes (Van Doan et al., 2021). Isto significa que a maior absorção e aproveitamento dos nutrientes, não está somente relacionada a melhorias na morfometria intestinal, mas sim relacionada aos microrganismos que se estabelecem permanentemente dentro do trato gastrointestinal sem prejudicar os hospedeiros em situações normais. Tal fato justificaria os melhores resultados para o desempenho de crescimento no grupo biorremediador.

Uma associação entre as proteobactérias, Bacteroidetes, fusobactérias e actinobactérias com processos digestórios e produção de enzimas relevantes para os peixes demonstrou como o biorremediador beneficiou alguns indicadores de desempenho da tilápia. A diminuição na distribuição de bactérias patogênicas no intestino dos peixes após a aplicação do biorremediador foi um resultado promissor em escala comercial. A pesquisa abre portas para o desenvolvimento

de estratégias de manejo mais eficazes e ecologicamente sustentáveis na aquicultura, com potencial para reduzir a incidência de doenças e melhorar a produção de peixes de forma eficiente.

2.3. CONCLUSÕES

O biorremediador promoveu a manutenção da qualidade da água e melhorou alguns indicadores de crescimento da tilápia-do-Nilo em sistema de biofoco. Além disso, o biorremediador reduziu a presença de potenciais patógenos aquícolas Gram-negativos e Gram-positivos, tanto na água do BFT quanto no intestino dos peixes em escala comercial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa a M.L. Martins (CNPq 303822/2022-8 e J.L.P. Mouriño (CNPq 307541/2020-7), pela bolsa de Mestrado a W.P. Maia (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES) e auxílio parcial da CAPES código 001.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, A. L., Chin, J. Y., Harun, M. H. Z. M., & Low, S. C. (2022). Environmental impacts and imperative technologies towards sustainable treatment of aquaculture wastewater: A review. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102553. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102553>
- Barbosa, P. T. L., Povh, J. A., Farias, K. N. N., da Silva, T. V., Teodoro, G. C., Ribeiro, J. S., Stringhetta, G. R., Fernandes, C. E. D. S., Corrêa Filho, R. A. C. (2022). Nile tilapia production in polyculture with freshwater shrimp using an aquaponic system and biofloc technology. *Aquaculture*, 551, 737916. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737916>
- Bereded, N. K., Abebe, G. B., Fanta, S. W., Curto, M., Waidbacher, H., Meimberg, H., & Domig, K. J. (2021). The impact of sampling season and catching site (wild and aquaculture) on gut microbiota composition and diversity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biology*, 10(3), 180. <https://doi.org/10.3390/biology10030180>
- Durigon, E. G., Lazzari, R., Uczay, J., de Alcântara Lopes, D. L., Jerônimo, G. T., Sgnaulin, T., Emerenciano, M. G. C. (2020). Biofloc technology (BFT): Adjusting the levels of digestible protein and digestible energy in diets of Nile tilapia juveniles raised in brackish water. *Aquaculture and Fisheries*, 5(1), 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.07.001>

- El-Sayed, A. F. M. (2021). Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: a comprehensive review, with emphasis on the last decade. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 676-705. <https://doi.org/10.1111/raq.12494>
- Fan, Z., Wu, D., Zhang, Y., Li, J., Xu, Q., & Wang, L. (2021). Carbonate alkalinity and dietary protein levels affected growth performance, intestinal immune responses and intestinal microflora in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu). *Aquaculture*, 545, 737135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737135>
- FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Giatsis, C., Sipkema, D., Ramiro-Garcia, J., Bacanu, G. M., Abernathy, J., Verreth, J., Smidt, H., Verdegem, M. (2016). Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. *Scientific Reports*, (6), 33965. <https://doi.org/10.1038/srep33965>
- Gullian-Klanian, M., Quintanilla-Mena, M., & Hau, C. P. (2023). Influence of the biofloc bacterial community on the digestive activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 562, 738774. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738774>
- Gullian-Klanian, M., Díaz, M. D., Solís, M. J. S., Aranda, J., & Moral, P. M. (2020). Effect of the content of microbial proteins and the poly- β -hydroxybutyric acid in biofloc on the performance and health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed on a protein-restricted diet. *Aquaculture*, 519, 734872. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734872>
- Haraz, Y. G., Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Mansour, A. M., & Elblehi, S. S. (2023). Performance of juvenile *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) raised in conventional and biofloc technology systems as influenced by probiotic water supplementation. *Aquaculture*, 566, 739180. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739180>
- Huang, F., Pan, L., Lv, N., & Tang, X. (2017). Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(5), 564-571. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.06.008>
- In-Kwon, J. (2012). Biofloc as disease control. In *International Water Congress*, Busan, Korea.
- Jaffer, Y. D., Sanath Kumar, H., Vinothkumar, R., Irfan, A. B., Ishfaq, N. M., Ganie, P. A., Bhat, R. A. H., Vennila, A. (2019). Isolation and characterization of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification and sulphur-oxidizing bacterium *Paracoccus saliphilus* strain SPUM from coastal shrimp ponds. *Aquaculture International*, 27, 1513-1524. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00407-0>
- Jasmin, M. Y., Syukri, F., Kamarudin, M. S., & Karim, M. (2020). Potential of bioremediation in treating aquaculture sludge. *Aquaculture*, 519, 734905. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734905>
- Jatobá, A., Borges, Y. V., & Silva, F. A. (2019). BIOFLOC: sustainable alternative for water use in fish culture. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71, 1076-1080. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10309>

Khanjani, M. H., Sharifinia, M., & Hajirezaee, S. (2022). Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. *Aquaculture*, 552, 738021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738021>

Kim, J. H., Sohn, S., Kim, S. K., & Hur, Y. B. (2020). Effects on hematological parameters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 97, 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.011>

Laice, L. M., Corrêa Filho, R. A. C., Ventura, A. S., Farias, K. N. N., Silva, A. L. D. N., Fernandes, C. E., Silva, A. C. F., Barbosa, P. T. L., Souza, A. I. D., Emerenciano, M. G. C., Povh, J. A. (2021). Use of symbiotics in biofloc (BFT)-based Nile tilapia culture: Production performance, intestinal morphometry and hematological parameters. *Aquaculture*, 530, 735715. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735715>

Lima, F. R. D. S., Apoliano, M. L. D. S., Cavalcante, D. D. H., & Sá, M. V. C. (2021). Dietary supplementation of tilapia juveniles reared in bft (bioflocs) tanks with dl-methionine. *Ciência Animal Brasileira*, 22. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-63874>

Loh, J.Y., Ting, A.S.Y. (2017). Bioprospecting Gastrointestinal Microflora of Common Fishes for Disease Control in Aquaculture. In: Kalia, V., Shouche, Y., Purohit, H., Rahi, P. (eds) *Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5708-3_10

Oliveira, H. M. D., Owatari, M. S., Martins, M. A., Lopes, G. R., Ferreira, M. B., Jesus, G. F. A., Godoi, L. A., Shapira, B., Martins, M. L., Mouriño, J. L. P. (2023). Probiotic BioPlus® PS modulate shrimp-tilapia polyculture pond soil microbiome and exhibit bioremediation potential. *Journal of Applied Aquaculture*, 1-18. <https://doi.org/10.1080/10454438.2023.2185562>

Owatari, M. S., Jesus, G. F. A., de Melo Filho, M. E. S., Lapa, K. R., Martins, M. L., & Mouriño, J. L. P. (2018). Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquacultural Engineering*, 82, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.001>

Qi, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Luo, F., Song, K., Wang, G., & Ling, F. (2023). Vitamin B12 produced by *Cetobacterium somerae* improves host resistance against pathogen infection through strengthening the interactions within gut microbiota. *Microbiome*, 11(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01574-2>

Samocha, T. M. (2019). *Sustainable biofloc systems for marine shrimp*. Academic Press.

Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, 41, 913-918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>

Van Doan, H., Lumsangkul, C., Hoseinifar, S. H., Tongsiri, S., Chitmanat, C., Musthafa, M. S., El-Haroun, E., Ringo, E. (2021). Modulation of growth, innate immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture under biofloc system by supplementing pineapple peel powder and *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 115, 212-220. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.06.008>

Yu, Y. B., Choi, J. H., Lee, J. H., Jo, A. H., Lee, K. M., & Kim, J. H. (2023). Biofloc Technology in Fish Aquaculture: A Review. *Antioxidants*, 12(2), 398. <https://doi.org/10.3390/antiox12020398>

Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., & Li, W. (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 501-509. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9320-z>

Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(4), 228-241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AMORIM, D.B. Interações de níveis de ácidos orgânicos e de proteína digestível das dietas no desempenho e eficiência de utilização de nutrientes para tilápia do Nilo. 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.

BROL, J. et al. Tecnologia de bioflocos (BFT) no desempenho zootécnico de tilápias: efeito da linhagem e densidades de estocagem. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 229-235, 2017.

DURIGON, E. G. et al. Biofloc technology (BFT): Adjusting the levels of digestible protein and digestible energy in diets of Nile tilapia juveniles raised in brackish water. **Aquaculture and Fisheries**, v. 5, n. 1, p. 42–51, 2020.

DOS SANTOS LIMA, F. R. et al. Dietary supplementation of tilapia juveniles reared in bft (bioflocs) tanks with dl-methionine. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 22, 2021.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. Em: TUTU, H. (Ed.). **Water Quality**. Rijeka: IntechOpen, 2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome: Sofia, 2022.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotic in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 2012.

GIATSI, C. et al. Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. **Scientific Reports**, v. 6:33965, 2016.

GULLIAN KLANIAN, M. et al. Effect of the content of microbial proteins and the poly- β -hydroxybutyric acid in biofloc on the performance and health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed on a protein-restricted diet. **Aquaculture**, v. 519, 734872, 2020.

GULLIAN-KLANIAN, M.; QUINTANILLA-MENA, M.; HAU, C. P. Influence of the biofloc bacterial community on the digestive activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 562, 738774, 2023.

KHANJANI, M. H.; SHARIFINIA, M.; HAJIREZAEI, S. Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. **Aquaculture**, v. 552, 738021, 2023.

KIM, J. H. et al. Effects on hematological parameters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by *Edwardsiella tarda*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 97, p. 194–203, 1 fev. 2020.

LAICE, L. M. et al. Use of symbiotics in biofloc (BFT)-based Nile tilapia culture: Production performance, intestinal morphometry and hematological parameters. **Aquaculture**, v. 530, 2021.

MOHAMED, M. A. et al. Growth Performance and Histological Changes in Ileum and Immune Related Organs of Broilers Fed Organic Acids or Antibiotic Growth Promoter. **International Journal of Poultry Science**, v. 13, n. 10, p. 602–610, out. 2014 ok

PEREIRA, S. A. et al. The Chelating Mineral on Organic Acid Salts Modulates the Dynamics and Richness of the Intestinal Microbiota of a Silver Catfish *Rhamdia quelen*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1483–1495, 2020.

Peixe BR, Associação Brasileira de Piscicultura (2023). Peixe BR Anuário da Piscicultura Brasileira. <https://www.peixebr.com.br/anuario-2023>.

QUESADA, José Pablo Fuentes. Microbiota intestinal em peixes de aquicultura. **Aquaculture Brasil**, v. 5, n. 8, p. 36-37, 2019

RODRIGUES, R. B. et al. Tecnologia de bioflocos no cultivo de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Tecnológica**, v. 10, n. 2, p. 1-15, 2015.

STRONG, P.J.; BURGESS, J.E. Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. **Bioremediation Journal**, v. 12, n. 2, p. 70-87, 2008.

TACON, A. G. J.; METIAN, M.; MCNEVIN, A. A. Future feeds: suggested guidelines for sustainable development. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 30, n. 2, p. 135-142, 2022.

VAN DOAN, H. et al. Modulation of growth, innate immunity, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture under biofloc system by supplementing pineapple peel powder and *Lactobacillus plantarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 115, p. 212–220, 2021.

VENKATESWARA, A. R. Bioremediation to restore the health of aquaculture. In: Advances in aquatic ecology. ed. **Vishwas Balasaheb Sakhare**, v. 1, p. 85-94, 2007.

YU, Y. BIN et al. **Biofloc Technology in Fish Aquaculture: A Review**. **Antioxidants** MDPI, 1 fev. 2023.

ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y.; LI, W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 501-509. 2010.

ZORRIEZHARA, M.J.; DELSHAD, S.T.; ADEL, M; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K; LAZA, C.C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016