



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**JÉSSICA LUCINDA SALDANHA DA SILVA**

**DOMESTICAÇÃO DO PERIFÍTON NO CULTIVO DE JUVENIS DE TILÁPIA DO  
NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**FORTALEZA**

**2018**

JÉSSICA LUCINDA SALDANHA DA SILVA

DOMESTICAÇÃO DO PERIFÍTON NO CULTIVO DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S58d Silva, Jéssica Lucinda Saldanha da.  
Domesticação do Perifiton no cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Jéssica Lucinda Saldanha da Silva. – 2018.  
154 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

1. Piscicultura. 2. Biofilme. 3. Probióticos. I. Título.

CDD 639.2

---

JÉSSICA LUCINDA SALDANHA DA SILVA

DOMESTICAÇÃO DO PERIFÍTON NO CULTIVO DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

---

Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Édson e Tânia.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me renovar a cada novo amanhecer, me dando forças para continuar a realizar meus sonhos e por me proporcionar tantas conquistas e pessoas maravilhosas ao meu lado.

Aos meus pais, Édson Agostinho e Tânia Saldanha, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente para a realização dos mesmos. Agradeço pelo amor que sempre dedicaram a mim. Amo vocês por toda a vida.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Oscarina Viana Sousa, por ter me acolhido com tanto carinho em seu laboratório. Pela compreensão e atenção sempre prestada não só comigo, mas com todos os seus alunos. E principalmente pelos ensinamentos repassados até aqui. Tens minha gratidão e quero levar sua amizade para a minha vida.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regine Helena por ter me apresentado o mundo da microbiologia de uma forma tão poética e apaixonante durante as aulas da graduação. Admiro a pessoa que a senhora é, sempre alegre e muito animada. Aprendi muito com seus conselhos no laboratório. Obrigada por ter me aceitado de braços abertos.

Aos membros da banca examinadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gleire Rodrigues, Prof. Dr. Pedro Martins, Prof. Dr. Rodrigo Maggioni e Prof. Dr. Rubens Feijó pelo aceite e pela valiosa colaboração na presente pesquisa que muito enriquecerá o documento final. Meu muito obrigada.

Ao Nailson Brito por seu amor e paciência durante os períodos mais difíceis da minha vida. Amo você.

À minha mãe de laboratório, Crisinha (Dra. Cristiane Teles), pela ajuda incondicional e por tudo que você já me ensinou nos trabalhos de bancada. Quero levar a sua alegria e amizade comigo por onde eu for e seu amor ao trabalho. Obrigada Crisinha.

À Ma. Maria das Graças Lima Coelho, Graçinha, técnica do laboratório CEDECAM (Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos) pelos ensinamentos na parte hematológica, você foi essencial para a execução das metodologias. Meu muito obrigada.

Aos Professores Marcelo Vinicius do Carmo e Sá, PhD e Me. Oscar Pacheco Passos Neto pela disponibilização das estruturas físicas para a execução dos experimentos *in vivo*.

À Dra. Marina Torres por ter palavras sábias em todos os momentos e por sua disposição em ajudar a todos a qualquer momento. Sua amizade quero levar para a vida.

Ao Dr. Rafael Rocha pela execução e ensinamentos na biologia molecular, você foi essencial e muito prestativo durante todo esse tempo de laboratório. Aprendi muito com sua responsabilidade no trabalho e na vida. Sua amizade é muito importante para mim.

À Profa. Dra. Gleire Menezes e Profa. Dra. Rosa Helena pela amizade e ajuda sempre prestada. Vocês me inspiram na profissão que escolhi. Quero sempre estar perto de vocês.

À Mariana Franco e Patrícia Cavalcante por estarem presentes na execução dos experimentos, vocês trouxeram alegrias e descontrações para os momentos de tensão. Obrigada pela amizade e sorrisos de todos os dias mais pesados.

Ao Dr. Davi de Holanda Cavalcante por sua amizade e seus conselhos acadêmicos, sempre me ajudando em tudo que precisei.

À Rubson Mateus e Maria João pelo apoio na execução dos testes laboratoriais. Pela amizade e paciência, que trouxeram leveza para o ambiente de trabalho.

À Deborah Oliveira, Lorrana Santana, Sylvânio Ferreira e Adson Queiroz por me proporcionarem tantos momentos de brincadeiras e risadas sem motivos.

A todos os integrantes do LAMAP pela ajuda e por fazerem o ambiente do laboratório mais divertido: Karla Catter, Rebeca Martins, Jade Abreu, Hemilly Praxedes, Thiara do Amaral, Mariana Lima, Gisele Cristina, Graciene Fernandes, Raul Vitor, Jéssica Frota, Jhones Lima, Isaías da Câmara, Yasmin Girão, Larissa Nunes, Anna Luisa e Jamille Rabelo.

As amigas Rebeca Larangeira e Nayagra Vidal, pelo companheirismo e amizade durante esses anos todos. Vocês são especiais para mim.

Ao Roberto Lima e Lorena Leite pela amizade e risos durante esses tempos de faculdade.

Ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) pelas instalações físicas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP).

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca, pelos ensinamentos repassados durante essa caminhada acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo acadêmico, o qual contribuiu para a realização da pesquisa da presente tese.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO

O cultivo de organismos aquáticos em sistema com presença de perifíton é uma alternativa para a melhoria da sustentabilidade econômica e ambiental da aquicultura. A formação espontânea do perifíton é induzida pela introdução de substratos artificiais ou naturais em tanques de cultivo que servem como suporte para agregação e crescimento de comunidades microbianas melhorando a qualidade da água e servindo como fonte suplementar de alimento natural. No entanto, a diversidade e dinâmica desses grupos bacterianos formadores do biofilme aderidos aos substratos imersos necessitam ser entendidos, possibilitando a manipulação de bactérias benéficas aos peixes e ao ambiente de cultivo. Dessa forma, o objetivo geral da pesquisa foi avaliar o desempenho zootécnico e imunológico de juvenis tilápia do Nilo cultivadas com perifíton formado a partir do uso de grupos bacterianos benéficos aos animais como iniciadores do biofilme microbiano. Na primeira etapa do projeto, juvenis de Tilápia foram cultivados em tanques com estruturas para agregação e formação espontânea de perifíton. Foram monitorados os parâmetros de qualidade de água, desempenho zootécnico, quantificação, isolamento e identificação de grupos bacterianos (BHC, *Aeromonas* sp., bactérias do nitrogênio), fúngicos e fito/zooplancônicos. Os isolados bacterianos foram identificados e caracterizados através de testes funcionais, enzimáticos e de antagonismo que serviram como base para formação de consórcios iniciadores de biofilme. Na segunda etapa foram montados cultivos com juvenis de tilápias para testar cinco tratamentos: T1 (sem perifíton), T2 (perifíton espontâneo), T3 (inóculo iniciador formado por bactérias com perfil probiótico), T4 (inóculo iniciador formado por bactérias do ciclo do nitrogênio) e T5 (cultivo de Tilápia com ração adicionada de bactérias probióticas, sem substrato). Foram monitorados os parâmetros de qualidade de água e desempenho zootécnico. No final do cultivo foi feita avaliação de parâmetros hematológicos e realizado um teste desafio por exposição ao patógeno *Aeromonas hydrophila*. Os resultados da primeira etapa comprovaram a eficiência do perifíton formado espontaneamente na manutenção da qualidade de água e melhoria no desempenho zootécnico dos peixes. No segundo experimento, os tratamentos T2 e T4 tiveram efeito positivo sobre o crescimento dos peixes. O uso de bactérias como iniciadoras do perifíton e a adição de probióticos via ração trouxeram melhorias nos parâmetros hematológicos. No teste desafio, os peixes cultivados com perifíton ou probióticos (T2 a T5) apresentaram menor número de sinais clínicos após exposição a *A. hydrophila*.

**Palavras-chave:** Piscicultura. Biofilme. Probióticos.

## RESUMEN

El cultivo de organismos acuáticos en sistemas con presencia de perifiton es una alternativa para la mejoría en la sustentabilidad económica y ambiental de la acuicultura. La formación espontánea del perifiton es inducida por la introducción de sustratos artificiales o naturales en tanques de cultivo que sirven como soporte para la agregación y el crecimiento de comunidades microbianas, mejorando la calidad del agua, sirviendo como fuente suplementaria de alimento natural. Sin embargo, la diversidad y dinámica de estos grupos bacterianos formadores del biofilme adheridos a los sustratos inmersos necesitan ser entendidos, posibilitando la manipulación de bacterias beneficiosas a los peces y al ambiente de cultivo. De esta forma, el objetivo general de la investigación fue evaluar el desempeño zootécnico e inmunológico de tilapia del Nilo en la fase de recreación cultivadas con perifiton formado a partir del uso de grupos bacterianos beneficiosos a los animales como iniciadores del biofilm microbiano. En la primera etapa, juveniles de tilapia fueron cultivados en tanques con estructuras para agregación y formación espontánea de perifiton. Se han monitoreado los parámetros de calidad de agua, rendimiento zootécnico, cuantificación, aislamiento e identificación de grupos bacterianos (BHC, *Aeromonas* sp., Bacterias del nitrógeno), hongos y fito / zooplanctónicos. Los aislados bacterianos fueron identificados y caracterizados a través de pruebas funcionales, enzimáticas y de antagonismo que sirvieron como base para la formación de consorcios iniciadores de biofilm. En la segunda etapa fueron montados cultivos con juveniles de tilapias para probar cinco tratamientos: T1 (sin perifiton), T2 (perifiton espontáneo), T3 (inóculo iniciador formado por bacterias con perfil probiótico), T4 (inóculo iniciador formado por bacterias del ciclo del nitrógeno) y T5 (cultivo de tilapia con ración agregada de bacterias probióticas, sin sustrato). Se monitorizaron la calidad de agua y desempeño zootécnico. Al final del cultivo se realizó una evaluación de parámetros hematológicos y se realizó una prueba desafiante contra el patógeno *A. hydrophila*. Los resultados de la primera etapa comprobaron la eficiencia del perifiton formado espontáneamente en el mantenimiento de la calidad del agua y la mejora en el desempeño zootécnico de los peces. En el segundo experimento, los tratamientos T2 y T4 tuvieron un efecto positivo sobre el crecimiento de los peces. El uso de bacterias como iniciadoras del perifiton y la adición de probióticos vía ración trajeron mejoras en los parámetros hematológicos. En la prueba desafiante, los peces cultivados con perifiton o probióticos (T2 a T5) presentaron menor número de signos clínicos después de la exposición a *A. hydrophila*.

**Palabras clave:** Pez. Biopelículas. Probióticos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Visão das estruturas de PVC utilizadas como substrato artificial para crescimento do perifíton.....	38
Figura 2	– Imagem da placa de AVC após período de incubação: A) produtora de EPS e B) não produtora.....	49
Figura 3	– Imagem dos tubos após o teste de aderência: A) resultado positivo; B) resultado negativo.....	49
Figura 4	– Resultado do teste de aderência em microplacas, coloração roxa e agregados na parede do poço apresenta resultado positivo (figura 6A), enquanto poço sem coloração e sem agregados na parede é considerado negativo (6B) .....	50
Figura 5	– Resultados positivos dos testes enzimáticos representados pela formação de halos ao redor das colônias bacterianas.....	53
Figura 6	– Concentração de oxigênio dissolvido ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.....	65
Figura 7	– Concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.....	66
Figura 8	– Figura 8- Concentração de nitrito ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia.....	67
Figura 9	– Concentração de nitrato ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.....	67
Figura10	– Concentração de fósforo reativo ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.....	68
Figura 11	– Acompanhamento visual do perifíton formado espontaneamente durante as 8 semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.....	73
Figura 12	– Imagens de microscopia optica do perifíotn espontâneo e alguns componentes do plâncton.....	74

Figura 13 – Abundância relativa dos gêneros fúngicos isolados por coleta no perifíton espontâneo.....	91
Figura 14 – Morfologia dos leucócitos dos juvenis de tilápia do Nilo.....	120
Figura 15 – Figura 15- Imagens das tilápias após 96h do desafio sanitário com <i>A hydrophila</i> .....	123

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Percentual de grupos bacterianos isolados do perifíton formado espontaneamente na superfície dos substratos submersos durante cultivo de tilápia do Nilo..... 77
- Gráfico 2 – Percentual dos grupos bacterianos de BHC isolados do perifíton espontâneo ao longo do tempo do cultivo de tilápias..... 79
- Gráfico 3 – Percentual de grupos bacterianos isolados do meio de cultura seletivo para nitrificantes..... 82
- Gráfico 4 – Frequência de isolamento dos grupos bacterianos nitrificantes a partir da formação espontânea de perifíton ao longo do cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ..... 83
- Gráfico 5 – Percentual de grupos fúngicos identificados no perifíton desenvolvido espontaneamente em substrato submerso durante cultivo de juvenis de tilápia do Nilo..... 87
- Gráfico 6 – Abundância relativa dos gêneros fúngicos isolados por coleta no perifíton espontâneo..... 88
- Gráfico 7 – Acompanhamento semanal dos compostos nitrogenados na água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo..... 110
- Gráfico 8 – Valores médios da concentração de eritrócitos dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)..... 115
- Gráfico 9 – Leucócitos totais dos juvenis de tilápia do Nilo sob diferentes tratamentos..... 118
- Gráfico 10 – Proteína plasmática total dos juvenis de tilápia do Nilo..... 121

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Variáveis físico-químicas da água de cultivo, metodologia e periodicidade das análises realizadas.....	39
Tabela 2	– Reagentes utilizados na formação do mix para cada amostra e condições de termociclagem.....	47
Tabela 3	– Delineamento experimental do teste <i>in vivo</i> do cultivo de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) em sistema com perifíton espontâneo, domesticado e cultivo sem perifíton.....	57
Tabela 4	– Variáveis de qualidade de água do cultivo de juvenis de tilápia do Nilo na presença e ausência de biofilme perifítico espontâneo, .....	62
Tabela 5	– Desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia do Nilo cultivados na presença e ausência de biofilme perifítico.....	69
Tabela 6	– Identificação qualitativa das principais famílias e respectivas espécies de plâncton identificadas no perifíton presente no cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.....	72
Tabela 7	– Quantificação dos grupos de bactérias heterotróficas cultiváveis totais (BHC), <i>Aeromonas</i> spp, fixadoras de nitrogênio, nitrificantes, desnitrificantes e de fungos presentes no perifíton oriundo do cultivo de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	74
Tabela 8	– Caracterização enzimática das bactérias heterotróficas cultiváveis totais isoladas do perifíton espontâneo durante cultivo de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	92
Tabela 9	– Caracterização fenotípica das cepas bacterianas produtoras de biofilme através do Teste de aderência ao vidro (TAV), Teste de aderência na microplaca (TMC) e produção de exopolissacarídeo nas placas de ágar vermelho congo (AVC) .....	95

Tabela 10 – Caracterização enzimática das bactérias isoladas do meio das nitrificantes crescidas no substrato submerso durante cultivo de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	97
Tabela 11 – Caracterização fenotípica das cepas bacterianas nitrificantes produtoras de biofilme através do Teste de aderência na microplaca (TMC) e produção de exopolissacarídeo nas placas de ágar vermelho congo (AVC) .....	99
Tabela 12 – Caracterização das cepas bacterianas heterotróficas cultiváveis pré-selecionadas para compor consórcio microbiano a ser aplicado no cultivo de tilápia, seja como iniciador do perifíton ou como probiótico adicionado via ração.....	101
Tabela 13 – Teste de antagonismo ( <i>Cross streak</i> ) das cepas isoladas das BHC contra <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966, <i>Edwardsiella tarda</i> ATCC 15947, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 37853 e <i>Streptococcus</i> sp.....	102
Tabela 14 – Resultado do teste de antagonismo entre os isolados das bactérias heterotróficas selecionadas.....	104
Tabela 15 – Resultado teste de crescimento em diferente pH e temperatura dos <i>Bacillus</i> sp. selecionados para composição do consórcio.....	104
Tabela 16 – Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de <i>Bacillus</i> sp. selecionados para composição do consórcio.....	105
Tabela 17 – Caracterização das cepas bacterianas nitrificantes selecionadas para o teste de antagonismo.....	106
Tabela 18 – Resultado do teste de antagonismo entre as cepas de bactérias representantes das nitrificantes.....	107
Tabela 19 – Variáveis de qualidade de água dos tanques de cultivo de tilápia do Nilo nos tratamentos empregados.....	108
Tabela 20 – Desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) (média $\pm$ d.p; n = 4) .....	112

Tabela 21 – Valores médios do hematócrito (HTC), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) .....	116
Tabela 22 – Contagem diferencial de leucócitos do sangue dos juvenis de tilápia do Nilo após o cultivo empregando os diferentes tratamentos.....	119
Tabela 23 – Sinais clínicos observados nas tilápias após 96h do desafio sanitário com injeção intraperitoneal (IP) de <i>A. hydrophila</i> .....	122

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Identificação de micro-organismos no perifíton desenvolvido espontaneamente em substratos submersos no cultivo de organismos aquáticos..... 29
- Quadro 2 – Descrição da metodologia empregada para a quantificação dos grupos bacterianos (BHC e gênero *Aeromonas* sp.) ..... 42
- Quadro 3 – Meios seletivos utilizados para quantificação dos grupos de bactérias participantes do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos..... 43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADB	Ágar Dextrose Batata (sigla em inglês)
Ágar BHI	Ágar Infusão Cérebro e coração (sigla em inglês)
AGSP	Ágar Seletivo para <i>Aeromonas</i> e <i>Pseudomonas</i> (sigla em inglês)
ANOVA	Análise de variância
APHA	American Public Health Association
ATCC	American Type Culture Collection (sigla em inglês)
AVC	Ágar Vermelho Congo
BHC	Bactérias Heterotróficas Cultiváveis
°C	Graus Celsius
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (sigla em inglês)
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro ao quadrado
CPP	Contagem Padrão em Placas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EPS	Exopolissacarídeo
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FCA	Fator de conversão alimentar
fL	Fentolitro
g	Gramma
g dL <sup>-1</sup>	Gramma por decilitro
g m <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup>	Gramma por metro cúbico por dia
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
hrs	horas
HTC	Hematócrito
IU	Índice de uniformidade
kg	Kilograma
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
LB	Luria Bertani
M	Marcador molecular
mg L <sup>-1</sup>	Miligramma por litro

mL	Mililitro
μL	Microlitro
MRS	De Man, Rogosa e Sharpe (sigla em inglês)
NAT	Nitrogênio amoniacal total
nm	Nanômetro
IOC	Instituto Osvaldo Cruz
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (sigla em inglês)
PF	Peso final
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PPT	Proteína Plasmática Total
PVC	Polyvinyl chloride (sigla em inglês)
S%	Sobrevivência
TEP	Taxa de eficiência proteica
TSA	Ágar Triptona Soja (sigla em inglês)
TSB	Caldo Soja Triptecaseína (sigla em inglês)
TSI	Triple Sugar Iron (sigla em inglês)
TMC	Teste de aderência na microplaca
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
%	Porcentagem
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
<b>2.1</b>	<b>Aquicultura e cultivo de Tilápias</b> .....	25
<b>2.2</b>	<b>Importância e potencial dos sistemas de aquicultura</b> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Micro-organismos constituintes do perifíton espontâneo</b> .....	28
<b>2.4</b>	<b>Biofilme perifítico como alimento natural</b> .....	31
<b>2.5</b>	<b>Melhoria na qualidade de água</b> .....	32
<b>2.6</b>	<b>Domesticação do perifíton</b> .....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>3.1</b>	<b>Delineamento experimental 1</b> .....	38
<b>3.1.1</b>	<i>Variáveis de qualidade de água</i> .....	38
<b>3.1.2</b>	<i>Variáveis de desempenho zootécnico</i> .....	39
<b>3.1.3</b>	<i>Coletas do perifíton desenvolvido espontaneamente</i> .....	41
<b>3.1.3.1</b>	<i>Processamento das amostras de perifíton espontâneo</i> .....	41
<b>3.1.3.2</b>	<i>Análise qualitativa do plâncton presente no perifíton espontâneo</i> .....	41
<b>3.1.3.3</b>	<i>Análise quantitativa dos grupos bacterianos</i> .....	41
<b>3.1.3.3.1</b>	Bactérias Heterotróficas cultiváveis e gênero <i>Aeromonas</i> sp. ....	41
<b>3.1.3.3.2</b>	Populações bacterianas do ciclo do nitrogênio.....	42
<b>3.1.3.3.3</b>	Fungos.....	44
<b>3.1.3.4</b>	<i>Seleção e Isolamento dos micro-organismos</i> .....	44
<b>3.1.4</b>	<i>Identificação dos isolados microbianos</i> .....	45
<b>3.1.4.1</b>	<i>Identificação morfológica das bactérias</i> .....	45
<b>3.1.4.2</b>	<i>Identificação bioquímica das bactérias</i> .....	45
<b>3.1.4.3</b>	<i>Identificação genotípica</i> .....	45
<b>3.1.4.3.1</b>	Extração do DNA total.....	45
<b>3.1.4.3.2</b>	Amplificação dos fragmentos dos genes DNAr 16S e sequenciamento.....	46
<b>3.1.4.4</b>	<i>Caracterização dos isolados fúngicos</i> .....	48
<b>3.1.5</b>	<i>Caracterização e seleção de cepas iniciadoras do perifíton</i> .....	48
<b>3.1.5.1</b>	<i>Caracterização fenotípica das cepas bacterianas produtoras de biofilme</i> .....	48
<b>3.1.5.1.1</b>	Teste do Vermelho Congo.....	48
<b>3.1.5.1.2</b>	Teste de aderência ao vidro.....	49

3.1.5.1.3	Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC).....	50
3.1.5.2	<i>Detecção da atividade enzimática das bactérias isoladas do perifíton espontâneo.....</i>	51
3.1.5.2.1	Caseínase.....	51
3.1.5.2.2	Gelatinase.....	51
3.1.5.2.3	Elastase.....	51
3.1.5.2.4	Fosfolipase.....	52
3.1.5.2.5	Lipase.....	52
3.1.5.2.6	Celulase.....	52
3.1.5.2.7	Amilase.....	52
3.1.5.2.8	Avaliação da produção de ácido láctico (MRS).....	53
3.1.5.2.9	$\beta$ -hemólise.....	53
<b>3.2</b>	<b>Delineamento experimental 2.....</b>	<b>54</b>
3.2.1	<i>Crítérios para a seleção dos isolados bacterianos para compor consórcio iniciador do perifíton no teste in vivo.....</i>	54
3.2.1.1	<i>Bactérias heterotróficas cultiváveis.....</i>	54
3.2.1.2	<i>Bactérias nitrificantes.....</i>	55
3.2.2	<i>Formação do perifíton domesticado (bactérias iniciadoras do perifíton).....</i>	56
3.2.3	<i>Aplicação dos consórcios bacterianos no ambiente de cultivo.....</i>	56
<b>3.3</b>	<b>Análise hematológica dos peixes.....</b>	<b>58</b>
<b>3.4</b>	<b>Desafio in vivo.....</b>	<b>60</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Delineamento experimental 1.....</b>	<b>62</b>
4.1.1	<i>Qualidade de água.....</i>	62
4.1.2	<i>Acompanhamento semanal das variáveis de qualidade de água.....</i>	65
4.1.3	<i>Desempenho zootécnico.....</i>	69
4.1.4	<i>Acompanhamento do plâncton presente no Perifíton.....</i>	71
4.1.5	<i>Quantificação dos grupos microbianos do perifíton espontâneo.....</i>	74
4.1.6	<i>Identificação dos grupos bacterianos do perifíton espontâneo.....</i>	76
4.1.7	<i>Identificação dos grupos fúngicos no perifíton espontâneo.....</i>	86
4.1.8	<i>Caracterização enzimática dos grupos bacterianos.....</i>	92

<b>4.1.9</b>	<b><i>Seleção das bactérias para a construção do consórcio iniciador do perifíton..</i></b>	<b>100</b>
4.1.9.1	<i>Bactérias heterotróficas cultiváveis.....</i>	100
4.1.9.2	<i>Bactérias nitrificantes.....</i>	106
<b>4.2</b>	<b>Delineamento experimental 2.....</b>	<b>107</b>
4.2.1	<i>Qualidade de água.....</i>	107
4.2.2	<i>Desempenho zootécnico.....</i>	111
4.2.3	<i>Hematologia.....</i>	115
4.2.3.1	<i>Eritrograma.....</i>	115
4.2.3.2	<i>Leucograma.....</i>	117
4.2.3.3	<i>Proteína plasmática total.....</i>	120
4.2.4	<i>Desafio in vivo.....</i>	121
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>125</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>127</b>
	<b>APÊNDICE A – IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS SELECIONADAS DE BHC E NITRIFICANTES.....</b>	<b>146</b>
	<b>APÊNDICE B – IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS SELECIONADAS DE BHC E NITRIFICANTES.....</b>	<b>148</b>
	<b>APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS DO PERIFÍTON DESENVOLVIDO NATURALMENTE NO SUBSTRATO DURANTE CULTIVO DE TILÁPIA DO NILO.....</b>	<b>150</b>
	<b>APÊNDICE D – CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS BHCS.....</b>	<b>152</b>
	<b>APÊNDICE E – CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES.....</b>	<b>154</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de produção de alimento que vem crescendo continuamente tentando suprir o déficit causado pela redução dos estoques pesqueiros. No entanto, no modelo de manejo atual, a obtenção de elevadas produtividades requer o emprego de alimentos artificiais cada vez mais elaborados e completos. O emprego de ração é quase que exclusivo, o que eleva os custos da produção. Além disso, por possuir elevado teor de nutrientes como fósforo e nitrogênio, há a geração de efluentes mais poluentes. Outro problema associado à intensificação dos sistemas de cultivo é o surgimento de doenças, devido à elevada densidade populacional, e consequente aumento da matéria orgânica e redução dos níveis de oxigênio dissolvido (HIRSCH *et al.*, 2006).

Uma abordagem viável para melhoria da alimentação, da qualidade de água de cultivos e dos efluentes gerados, seria a utilização de comunidades microbianas que se desenvolvem nos viveiros como alimento natural para os peixes cultivados. Essas comunidades podem crescer agregadas às superfícies imersas em ambientes aquáticos como perifíton. O perifíton é uma comunidade complexa de micro-organismos que cresce em quaisquer substratos submersos e é formado basicamente por fitoplâncton, zooplâncton e outros membros da microbiota aquática em combinação com biofilmes microbianos (AZIM *et al.*, 2002; POMPÊO, MOSCHINI-CARLOS, 2003).

A indução da formação de biofilmes e perifíton em superfícies introduzidas em ambientes de cultivo é uma estratégia já utilizada visando o aumento da produtividade natural e de alimento para os organismos cultivados em vários países. No Brasil, a experiência com a introdução de substratos de bambu em tanques-redes para cultivo de tilápia do Nilo resultaram em aumento da produtividade (até 52 kg/m<sup>3</sup>) e redução de 32% na oferta de ração (GARCIA *et al.*, 2016). Esses resultados promissores vêm fortalecendo essa biotecnologia como uma alternativa acessível para pequenos aquicultores aumentarem a eficiência e lucro dos sistemas de cultivo além de reduzirem os impactos sobre o ambiente.

O uso de biofilme perifítico reduz o excesso de nutrientes, mantendo a qualidade de água, além de prover alimento natural para os organismos cultivados (KHATOON *et al.*, 2007; PANDEY; BHARTI; KUMAR, 2014). No entanto, a composição dessa comunidade é variável e influenciada por fatores bióticos e abióticos da água, além do tipo de substrato utilizado como base para a fixação e crescimento dos micro-organismos. Essa variação se reflete também na qualidade nutricional do perifíton formado espontaneamente o que representa uma restrição para utilização dessa biomassa nos tanques de cultivo devido à

instabilidade e a variabilidade da microbiota instalada nos substratos. De fato, o perifíton espontâneo pode conter micro-organismos prejudiciais e até mesmo patogênicos ou tóxicos para os organismos aquáticos cultivados.

Assim, a aplicação mais eficiente dessa tecnologia depende da seleção e manutenção de componentes desejáveis na comunidade microbiana formada. Portanto, faz-se necessário o entendimento desses sistemas biológicos, através da identificação dos micro-organismos envolvidos na formação do perifíton espontâneo, o entendimento do papel dos vários constituintes microbianos no desenvolvimento da estrutura perifítica e possibilidade de manipulação desses micro-organismos. A domesticação do perifíton pode contribuir para a redução da instabilidade do sistema microbiano. Esse controle pode favorecer a saúde dos animais cultivados, melhorar a qualidade da água e dos efluentes gerados e servir como fonte de alimento natural o que resultaria em redução de custos com alimentação artificial e melhoria da qualidade ambiental e sustentabilidade dos cultivos.

Diante do exposto, a hipótese que orienta a presente pesquisa é que a manipulação de bactérias para formação do perifíton em tanques de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) influencia positivamente no desempenho zootécnico, hematológico e na qualidade de água de cultivo dos peixes.

Como objetivo geral, foi proposto avaliar o desempenho zootécnico e imunológico de tilápia do Nilo na fase de recria cultivadas com perifíton formado a partir do uso de grupos bacterianos benéficos aos animais como iniciadores do biofilme microbiano. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram traçados: 1) avaliar o efeito do perifíton formado espontaneamente nos tanques de cultivo de tilápia do Nilo sobre: qualidade de água, principalmente na remoção ou diminuição dos compostos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) e desempenho zootécnico dos peixes; 2) caracterizar o plâncton presente no perifíton formado espontaneamente; 3) quantificar Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC), *Aeromonas* spp., e bactérias envolvidas no ciclo de nitrogênio no ambiente aquático (fixadoras de nitrogênio, nitrificantes e desnitrificantes) isoladas do perifíton formado espontaneamente; 4) quantificar, isolar e caracterizar os fungos do perifíton formado espontaneamente; 5) identificar através de testes bioquímicos e por biologia molecular BHC e nitrificantes; 6) avaliar fenotipicamente as bactérias produtoras de biofilme; 7) caracterizar a produção de enzimas das bactérias isoladas do perifíton espontâneo; 8) selecionar as bactérias que irão compor o perifíton induzido; 9) aplicar o perifíton induzido no segundo bioensaio; 10) avaliar a qualidade de água do cultivo de juvenis de tilápia do Nilo submetidos ao bioensaio com a utilização do perifíton induzido; 11) avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de

tilápia do Nilo submetidos ao bioensaio com a utilização do perifíton induzido; 12) avaliar os parâmetros hematológicos das tilápias após o bioensaio; 13) teste desafio dos peixes cultivados no segundo bioensaio por exposição a *Aeromonas hydrophila*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aquicultura e cultivo de Tilápias

A aquicultura é a atividade de cultivo de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, se dá total ou parcialmente em meio aquático. É o setor de produção de alimento que mais cresce no mundo e no Brasil. Em 2014 a produção mundial foi de 73,8 milhões de toneladas. No Brasil, o valor total de produção da aquicultura foi de 562,5 mil toneladas, representando R\$ 3,87 bilhões (FAO, 2016).

A maior parte desse montante foi oriunda da piscicultura, cerca de 70,9%, a qual apresentou produção total de 507,12 mil toneladas, em 2016, representando um aumento de 4,4% em relação ao ano anterior. Dentre as espécies de peixes mais produzidas no Brasil, a tilápia do Nilo ocupa a primeira colocação, alcançando produção de 239,09 mil toneladas, sendo a região Sul o polo principal de produção, seguida pela região Nordeste. O estado do Ceará tem destaque na região Nordeste, tendo o município de Orós (CE) como o líder no *ranking* de produção de tilápia do Nilo, despescando 8,74 mil toneladas no ano de 2015 (IBGE, 2016).

Os fatores que justificam a preferência pela criação da tilápia, no Nordeste e no Brasil como um todo, são: fácil adaptação às condições de cultivo, alta capacidade de resistência às doenças, excelente capacidade de reprodução em cativeiro, facilidade na obtenção de larvas, ciclo de engorda relativamente curto, taxa de crescimento rápido, hábito alimentar omnívoro (EL-SAYED, 2006; VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014; LONG *et al.*, 2015). Além disso, é uma espécie que apresenta elevado valor comercial sendo bem aceita pelos consumidores, por conta da carne de excelente qualidade, ausência de espinhas intramusculares em forma de “Y”, ótimo rendimento de filé e elevado valor comercial (HAYASHI *et al.*, 2002).

Na tilapicultura, assim como nas demais atividades aquícolas, os alimentos artificiais são empregados quase que exclusivamente, sendo este um dos insumos mais significativos na composição de custos no cultivo de organismos aquáticos (AVNIMELECH, 2006; C.A; KURUP, 2015). Cerca de 15-30% dos nutrientes presentes na alimentação artificial ofertada é convertido em produtos cultiváveis, e o restante é lançada na água, permanecendo nos tanques de cultivo (GROSS; BOYD; WOOD, 2000), como fezes e restos de ração não consumida, gerando efluentes ricos em nutrientes, os quais podem causar poluição significativa dos corpos de água receptores (BENDER; PHILLIPS, 2004). Além

disso, o sistema de produção também fica comprometido por causa do acúmulo de compostos tóxicos, como a amônia e nitrito, ocasionando a deterioração da qualidade de água, a qual afeta diretamente o desempenho zootécnico dos animais cultivados (LEZAMA-CERVANTES; PANIAGUA-MICHEL; ZAMORA-CASTRO, 2010).

A atividade aquícola tradicional demanda grandes áreas de produção e elevada quantidade de água disponível (ASADUZZAMAN *et al.* 2008), para a realização de trocas de água, gerando impactos ambientais. Além disso, tem-se a maior probabilidade de introdução de patógenos nos ambientes de cultivo, pela captação de água (C.A; KURUP, 2015). Todos esses aspectos levam a perdas econômicas, sociais e ambientais.

Dessa forma, novas tecnologias têm que ser desenvolvidas a fim de mitigar os efeitos negativos da aquicultura, para que haja uma produção de alimento de forma sustentável do ponto de vista social, econômico e ambiental.

## **2.2 Importância e potencial dos sistemas de aquicultura baseados em substratos submersos para desenvolvimento do perifíton**

Novas formas de produção na aquicultura têm sido desenvolvidas, a fim de diminuir ou amenizar os efeitos negativos introduzidos no ambiente com essa atividade. Nesse sentido, intervenções microbianas têm sido utilizadas na aquicultura a fim de tornar a atividade mais sustentável, sendo um método alternativo para um manejo saudável e ecologicamente correto. Essas intervenções podem ser realizadas diretamente na água ou no sedimento, por bioaugmentação, biorremediação, ou ser administrado diretamente aos organismos cultivados através de vacinas, probióticos ou imunoestimulantes, gerando respostas positivas contra agentes patogênicos (MARTÍNEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2015; PANIGRAHI; AZAD, 2007). O emprego de comunidades microbianas é uma das alternativas que vêm sendo usada na aquicultura. Essas comunidades podem crescer agregadas a substratos como perifíton ou em suspensão como flocos (bioflocos).

Uma tecnologia considerada ecologicamente amigável ao ambiente, com baixo custo, é a adição de substratos artificiais ou naturais aos tanques para crescimento de perifíton, o qual tem gerado muito interesse no setor aquícola, por conta da melhoria nas variáveis de qualidade de água e geração de efluentes menos poluentes, assegurando um ambiente de cultivo mais saudável, além de ser fonte de alimento natural (AZIM *et al.*, 2003b; KHATOON *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2011).

Os sistemas de aquicultura baseado em substrato também é descrito como sistema

baseado em perifíton. A estrutura do perifíton ou biofilme perifítico é constituída por uma mistura complexa de micro-organismos (algas, zooplâncton, bactérias, protozoários, fungos), detritos orgânicos e inorgânicos aderidos a substratos orgânicos ou inorgânicos, vivos ou mortos (AZIM; WAHAB, 2005; ZHANG *et al.*, 2016).

O princípio da aquicultura baseada em perifíton é aumentar a produção do alimento natural crescido nos substratos rígidos introduzidos nos tanques de cultivo (ASADUZZAMAN *et al.*, 2010), possibilitando a diminuição considerável da entrada de alimento artificial, aliado a elevadas taxas de produção de peixes e camarões a baixo custo (ASADUZZAMAN *et al.*, 2008; KHATOON *et al.*, 2007). Além disso, o substrato funciona como filtro biológico, reduzindo a concentração de amônia e nitrito, por meio do desenvolvimento de bactérias nitrificantes, e diminuição da turbidez da água de cultivo por reter sólidos em suspensão. Esses nutrientes retidos nos substratos contribuem para o crescimento de micro-organismos heterotróficos, que também auxiliam na ciclagem dos nutrientes, e aumento de biomassa microbiana disponível como alimento (AUDELO-NAJARO *et al.*, 2011; AZIM; LITTLE, 2006).

Os substratos também possibilitam o desenvolvimento de comunidade microbiana autóctone com ação probiótica (AZIM *et al.* 2001; DOMINGOS; VINATEA, 2008), redução da ocorrência de patógenos e produção de substâncias antimicrobianas (THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002), evitando assim o uso de produtos químicos como antibióticos sintéticos, os quais ao serem utilizados geram compostos intermediários que prejudicam a saúde do consumidor e problemas ao meio ambiente. Comprovaram-se também o aumento da atividade das enzimas digestivas e aumento das respostas do sistema imune do camarão *Penaeus monodon* (KUMAR *et al.*, 2015; ANAND *et al.*, 2013a; ANAND *et al.*, 2014a), quando esses foram cultivados na presença de perifíton, tendo sido associado esses efeitos positivos as diversas formas de algas autotróficas e comunidades heterotróficas microbianas presentes no perifíton, existindo possivelmente bactérias probióticas nos biofilmes perifícos. Esta tecnologia é uma alternativa para tornar a aquicultura uma atividade sustentável, especialmente nos países em desenvolvimento (PANDEY; BHARTI; KUMAR, 2014). No entanto, seriam interessantes o isolamento e a caracterização dos grupos microbianos, a fim de determinar o real potencial probiótico das cepas e assim utilizá-las nos cultivos, adicionando via ração ou diretamente no ambiente aquático.

### 2.3 Micro-organismos constituintes do perifíton espontâneo

O biofilme perifítico é formado por uma biomassa heterotrófica e autotrófica devido as diversas espécies de fitoplâncton e zooplâncton aderidas ao substrato, assim como bactérias, fungos, entre outros (PANDEY; BHARTI; KUMAR, 2014).

O biofilme é formado seguindo uma sequência dividida em quatro fases principais: (1) adsorção de compostos orgânicos dissolvidos, associado aos processos físico-químicos na água; (2) crescimento bacteriano, com produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a qual protege contra ação de predadores, aumentando a resistência à radiação e desidratação; (3) colonização através de micro-organismos unicelulares eucarióticos, principalmente protozoários, microalgas e cianobactérias e por último (4) estabelecimento de organismos multicelulares eucarióticos (WHAL, 1989; SILVA *et al.* 2008).

As bactérias são invariavelmente os primeiros organismos colonizadores, com o tempo de colonização variando de algumas horas até alguns dias. Após as bactérias, as algas rapidamente aderem-se na bioderme perifítica. A rica camada de bactérias e algas favorece o aparecimento de vários grupos de protozoários (MOSCHINI-CARLOS, 1999) e zooplâncton. Esses micro-organismos são considerados importantes na base alimentar das cadeias tróficas, sendo ricos em proteínas, vitaminas e minerais constituindo um alimento para muitos organismos aquáticos. O período estimado para maturação do perifíton é em torno de quatro semanas (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003).

Experimentos baseados em substratos naturais ou artificiais para desenvolvimento de perifíton empregados no cultivo de diversas espécies identificaram e quantificaram vários micro-organismos pertencentes ao perifíton. No Quadro 1 estão listados alguns trabalhos que identificaram esses micro-organismos.

Quadro 1- Identificação de micro-organismos no perifíton desenvolvido espontaneamente em substratos submersos no cultivo de organismos aquáticos.

<b>Espécies cultivadas</b>	<b>Grupos de fito e zooplâncton no perifíton</b>	<b>Referência</b>
Policultivo de <i>Labeo rohita</i> , <i>Catla catla</i> e <i>L. calbasu</i> com perifíton	Bacillariophyceae (13 gêneros), Chlorophyceae (29 gêneros), Cyanophyceae (10 gêneros) e Euglenophyceae (4 gêneros), Crustáceos (2 gêneros) e Rotíferos (6 gêneros).	AZIM <i>et al.</i> , 2002
Policultivo de <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Macrobrachium rosenberguii</i> com perifíton	Bacillariophyceae (10 gêneros), Chlorophyceae (21 gêneros), Cianofíceae (7 gêneros), Euglenophyceae (2 gêneros), Crustáceos (1 gênero) e Rotíferos (5 gêneros).	HASAN <i>et al.</i> , 2012
Cultivo de <i>Penaeus monodon</i> com perifíton	<i>Bacillariophyceae</i> (13 gêneros) Chlorophyceae (9 gêneros), Cyanophyceae (6 gêneros) e Euglenophyceae (2 gêneros), Protozoários, Anelídeos e Crustáceos.	ANAND <i>et al.</i> 2013b
Policultivo de <i>O. niloticus</i> mais <i>M. rosenberguii</i> com perifíton e relação C/N	Bacillariophyceae (10 gêneros), Chlorophyceae (21 gêneros), Cyanophyceae (7 gêneros) e Euglenophyceae (2 gêneros), Rotíferos (5 gêneros) e Crustáceos (1 gênero).	ASADUZZAMAN <i>et al.</i> (2009a)
Cultivo de juvenis de <i>O. niloticus</i> em tanques-rede com perifíton	Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae e Dinophyceae.	SAKR <i>et al.</i> (2015)
Policultivo de <i>O. niloticus</i> e <i>M. rosenberguii</i> com perifíton e relação C/N	Chlorophyceae (21 gêneros), Bacillariophyceae (10 gêneros), Cyanophyceae (7 gêneros), Euglenophyceae (2 gêneros), Rorífero (5 gêneros) e Crustáceo (1 gênero).	HAQUE <i>et al.</i> (2013)
Cultivo de <i>P. vannamei</i> com perifíton	Bacillariophyceae (14 gêneros), Chlorophyceae (12 gêneros), Cyanophyceae (10 gêneros), Euglenophyceae (3 gêneros), Rotíferos (3 gêneros), Crustaceos (2 gêneros), Anelídeos (1 gênero).	KUMMAR <i>et al.</i> (2017)

Fonte: elaborado pela autor

Os trabalhos realizados com perifíton no cultivo de tilápia do Nilo, na sua grande maioria identificam e classificam comunidades fitoplanctônicas, zooplanctônicas e outros organismos presentes, não levando em consideração a presença dos grupos bacterianos e fúngicos, que possuem grande importância. Pouco se sabe sobre a diversidade, dinâmica e sucessão desses agregados microbianos. Algumas bactérias podem ser patogênicas, o que é um problema durante o cultivo, tornando-se uma ameaça do ponto de vista produtivo.

Assim, faz-se necessário o entendimento desses sistemas biológicos, realizando identificação, não somente dos grupos planctônicos presentes no perifíton, como também das comunidades microbianas, para que se possa desenvolver manejo seguro e de fácil realização para manipulação dos micro-organismos que tragam somente benefícios para melhoria do desempenho zootécnico dos peixes e da qualidade de água.

A identificação de comunidades microbianas já vem sendo estudadas em trabalhos que envolvem os sistemas BFT (*Biofloc Technology*) no cultivo de camarões. Poli *et al.*, (2011) monitoraram a formação de bioflocos no cultivo do camarão marinho em sistema intensivo, e isolaram 76 cepas de bactérias, sendo que 12 dessas foram víbrios. Já Garcia *et al.* (2014) isolaram 87 cepas bacterianas no total, das quais os víbrios foram predominantes.

Já nas pesquisas utilizando perifíton em cultivos, Diringer *et al.* (2010), cultivando camarão marinho *L. vannamei*, identificou um total de 148 cepas de bactérias, 36 grupos de microalgas, 10 ciliados e 3 nematóides. Os resultados indicaram que o perifíton espontâneo foi composto principalmente por espécies bacterianas possivelmente patogênicas para os camarões, sendo identificados: *Vibrio* (41%), *Shewanella* (16%), *Staphylococcus* (10%), bactérias desconhecidas (9%), *Pseudomonas* (5%) e outras, como *Bacillus*.

Shilta *et al.* (2016) ao cultivarem a espécie de peixe *Etroplus suratensis* na presença de substrato natural (palha de arroz e bagaço de cana) e artificial (PVC e folha de plástico), identificaram por ordem de preponderância os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* nos substratos. Os principais representantes do plâncton foram cianofíceas, clorofíceas, diatomáceas, cladóceros, rotíferos, ostracodes e protozoários.

Yu *et al.* (2016) combinaram o sistema de substrato submerso para crescimento do perifíton com a manipulação da relação C/N durante o cultivo da carpa capim. Realizaram a caracterização das bactérias aderidas ao substrato e suspensas na coluna d'água utilizando a tecnologia de sequenciamento Illumina. As proporções dos grupos bacterianos Verrucomicrobiae, *Rhodobacter* e *Emticicia* foram maiores no tratamento que empregou adição de substrato para crescimento do biofilme mais a relação C/N20. Concluíram também que os grupos *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Planctomyces* e

*Cloacibacterium* podem ter sido importantes na colonização dos substratos. E que o incremento da relação C/N diminuiu as proporções de *Bacillus*, *Clavibacter* e *Cellvibro*, e atribuíram que as bactérias pertencentes a Verrucomicrobiae e o gênero *Rhodobacter* presentes na comunidade anexada ao substrato eram potenciais probióticas e auxiliaram no crescimento das carpas.

Silva *et al.* (2016) encontraram maiores proporções do gênero *Pseudomonas* sp., seguido por *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Micrococcus* sp. no perifíton formado espontaneamente durante o cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.

Como pode ser observado, os estudos envolvendo a caracterização do perifíton se restringem a identificação de grupos específicos, seja somente a parte planctônica aderida aos substratos ou grupos bacterianos específicos. Fica clara a necessidade de pesquisas mais abrangentes quanto à diversidade dessa comunidade microbiana criando possibilidades de manipulação e aplicação como ferramenta biotecnológica para melhoria da atividade de cultivo de organismos aquáticos.

#### **2.4 Biofilme perifítico como alimento natural**

A adição de substratos artificiais ou naturais em viveiros de aquicultura estimula o crescimento da biota aquática autotrófica e heterotrófica, como bactérias, fungos, protozoários, fitoplâncton, zooplâncton, organismos bênticos, e uma grande variedade de invertebrados (SAKR *et al.*, 2015). Diversos trabalhos têm comprovado a melhoria dos índices de produção de peixes e de camarões utilizando substrato submerso para crescimento de perifíton nos cultivos (AZIM *et al.*, 2002; BALLESTER *et al.*, 2007; THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002; ZHANG *et al.*, 2016). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) devido à sua dieta onívora e rápido crescimento (ROESELERS; LOOSDRECHT; MUYZER, 2008) assimilam eficientemente o alimento natural. Segundo Dempster, Beveridge e Baird (1993), tilápias jovens ingerem, no mínimo, 10 vezes mais perifíton que fitoplâncton, quando há abundante disponibilidade do primeiro no habitat em que vivem. Huchette *et al.* (2000) cultivaram tilápias do Nilo em gaiolas (tanque-rede) na presença de substratos artificiais, e observaram que o grupo das diatomáceas foram dominantes nas garrafas e nos estômagos desses peixes. Asaduzzaman *et al.* (2009a) observaram diminuição de 52% do número total de perifíton quando as tilápias estavam presentes nos tanques de cultivo comparado ao tratamento sem tilápia.

A composição dos micro-organismos aderidos aos substratos é o principal

determinante no valor nutricional do biofilme para os organismos que irão se alimentar diretamente dele. Silva *et al.* (2008) relataram que é muito provável que a variabilidade do teor proteico e lipídico do perifíton está relacionada com a sucessão microbiana durante a formação do biofilme.

De acordo com Thompson, Abreu e Wasielesky (2002) o biofilme pode fornecer elementos essenciais como ácidos graxos poli-insaturados, esteróis, aminoácidos, vitaminas e carotenoides. De acordo com Azim *et al.* (2003a) o perifíton crescido sobre substrato, durante o cultivo de tilápia do Nilo, apresentou a seguinte composição centesimal: 55% cinza, 17% proteína, 1,6% lipídio e 8,5% energia. Kummar *et al.* (2017), ao cultivar o camarão marinho *P. vannamei* na presença de substratos submersos, encontraram os seguintes constituintes no perifíton: 24,97% de proteína, 2,67% de lipídio e 37,75% de cinzas.

Considerando que a maior parte dos peixes necessita de dietas que contenham 18-50% de proteína, 10-25% de lipídio, 15-30% de carboidratos, valores menores que 8,5% de cinzas e traços de vitaminas e minerais (PANDEY; BHARTI; KUMAR, 2014; CRAIG; HELFRICH, 2002), o perifíton pode ser utilizado como uma fonte suplementar de alimento natural para os organismos cultivados, podendo reduzir a oferta de ração, insumo esse considerado um dos mais onerosos na produção (BALLESTER *et al.*, 2007; UDDIN *et al.*, 2007).

## **2.5 Melhoria na qualidade de água**

Os grupos bacterianos e de microalgas presentes no perifíton são os principais constituintes que transformam e assimilam os compostos nitrogenados presentes nos tanques de cultivo (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002). Presos na camada do perifíton, os detritos e os sólidos suspensos são decompostos mais rapidamente, tornando-se mais acessíveis aos herbívoros. Desta forma, o perifíton aumenta a ciclagem de nutrientes, acelera a decomposição da matéria orgânica e assimilação de amônia e nitrato, aprimorando a nitrificação (AZIM; LITTLE, 2006; MILSTEIN; PERETZ; HARPAZ, 2009).

A introdução de substratos artificiais nos tanques de cultivo estimula o crescimento de bactérias nitrificantes (THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002; SUANTIKA *et al.*, 2012; FURTADO; POERSCH; WASIELESKY, 2015), as quais são responsáveis pela oxidação da amônia até nitrato. Uma vez que os substratos são posicionados na coluna de água onde o oxigênio dissolvido é mais disponível, o processo da nitrificação é

acelerado (ASADUZZAMAN *et al.*, 2008; MILSTEIN; PERETZ; HARPAZ, 2009).

Poucos trabalhos caracterizaram ou identificaram os grupos bacterianos pertencentes ao ciclo do nitrogênio nos ambientes de cultivo na presença de substrato artificial. Os trabalhos realizados com perifíton, que obtiveram efeito positivo na remoção de compostos nitrogenados, baseiam-se apenas na quantificação desses compostos na água dos tanques de cultivo na presença e ausência de substrato (THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002; AUDELO-NAJARO; MARTÍNEZ-CÓRDOVA; VOLTOLINA, 2010; VIAU *et al.*, 2013; VIAU *et al.*, 2016).

Oliveira *et al.* (2006) estudaram alguns aspectos de sucessão microbiana, e estabeleceram a importância das bactérias nitrificantes na ciclagem de nutrientes nitrogenados em tanques de cultivo do camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). Concluíram que a concentração de compostos nitrogenados influenciou a composição da assembléia de bactérias no biofilme e na água e que os processos de nitrificação e desnitrificação tem grande importância na remoção de compostos nitrogenados, retirando cerca de 39% de amônia presente nos tanques.

Dentre os grupos das bactérias participantes do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos, pode-se destacar a importância das *Nitrossomonas*, que oxidam a amônia a nitrito, e das *Nitrobacter*, que oxidam nitrito a nitrato. Esse processo chamado nitrificação, é extremamente eficiente em ambientes bem oxigenados (ARAUJO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Outro processo que ocorre de forma acoplada a nitrificação, é a desnitrificação, a qual ocorre em condições de anaerobiose, transformando nitrato em nitrogênio molecular. Esses processos tem o poder purificador da água, uma vez que compostos tóxicos, como amônia e nitrito, são removidos e transformados em formas atóxicas aos animais cultivados (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Novas tecnologias vêm sendo empregadas para remoção de compostos nitrogenados na aquicultura, como o processo de oxidação anaeróbia de amônia, ou simplesmente ANAMMOX (do inglês anaerobic ammonium oxidation) (SCHEEREN *et al.*, 2011), e a nitrificação heterotrófica com desnitrificação aeróbia simultânea, através do uso de micro-organismos nitrificadores heterotróficos (VELUSAMY; KRISHNANI, 2013; KUMAR *et al.*, 2013).

## 2.6 Domesticação do perifíton

A utilização de perifíton formado espontaneamente nos tanques de cultivo pode trazer alguns problemas, uma vez que a microbiota instalada nos substratos não é controlada. Além disso, a comunidade perifítica formada espontaneamente apresenta variabilidade na sua estrutura, sendo que alguns organismos presentes podem produzir compostos tóxicos, como toxinas de cianobactérias, para os animais cultivados (DIRINGER *et al.*, 2010). Problemas inesperados podem ocorrer, como o aparecimento de bactérias patogênicas que podem desencadear enfermidades aos organismos cultivados. Além disso, a constituição da microbiota do perifíton afeta o conteúdo nutricional do mesmo, o qual varia dependendo dos micro-organismos instalados no determinado período.

Monroy-Dosta *et al.* (2013) identificaram e quantificaram diversos grupos de micro-organismos constituintes do biofilme formado espontaneamente no cultivo de camarão. Identificaram a presença de gêneros potencialmente virulentos para peixes e camarões, como os gêneros *Aeromonas* e *Vibrios*, respectivamente. Além disso, observaram a presença de bactérias degradadoras de compostos nitrogenados como *Nitrospira* sp., *Nitrobacter* sp. e *Bacillus*, as quais são responsáveis pela manutenção da qualidade de água e biocontrole efetivo sobre patógenos.

A identificação da composição dos micro-organismos desenvolvidos no perifíton espontâneo em cultivos de tilápias é necessária, uma vez que não se sabe ao certo a constituição desse biofilme perifítico. A fim de que se possa realizar o isolamento de determinados grupos benéficos, os quais poderiam posteriormente serem aplicados nos sistemas de cultivo. Essa bioprospecção de micro-organismos do perifíton recebeu o nome de domesticação do perifíton, o qual é composto por alguns passos descritos abaixo.

De acordo com Diringer *et al.* (2010), o primeiro passo da domesticação do perifíton consiste em analisar e isolar cepas de micro-organismos nativos que colonizam espontaneamente os substratos instalados em tanques de organismos aquáticos. Esse isolamento inicial deve permitir a obtenção de um inventário abrangente que consista nos diferentes micro-organismos presentes no perifíton. A próxima etapa é realizar o estudo da estrutura espaço temporal dos micro-organismos no biofilme, envolvendo a composição quantitativa e qualitativa. Após isso, deve ser feita a caracterização dos isolados por técnicas fenotípicas e moleculares e, em seguida, a capacidade de serem cultivados em pequena e grande escala. O conjunto de resultados obtidos permite selecionar cepas benéficas para construção do perifíton, a fim de ser empregado na nutrição, regeneração da água e prevenção

de vibrioses, no caso do cultivo de camarões.

A produção de exoenzimas das bactérias isoladas do perifíton é outro ponto a ser acrescentado no estudo da domesticação do perifíton, além da capacidade de agregação nos substratos e produção de exopolissacarídeos (EPS) (DOGAN *et al.*, 2015).

De acordo com Audelo-Naranjo *et al.* (2011) o consumo da biota presente no biofilme melhora a atividade das enzimas digestivas. A produção de celulase, amilase, protease, entre outras enzimas, desempenham importante papel na assimilação de compostos de difícil digestão pelos peixes, uma vez que peixes teleósteos não são capazes de produzir algumas enzimas endógenas, necessitando do auxílio de bactérias presentes no sistema gastro intestinal para digestão e assimilação de certos compostos, como carboidratos (DUTTA; GHOSH, 2015; SAHA *et al.*, 2006). Além disso, as bactérias auxiliam na mineralização de matéria orgânica presente na água de cultivo de organismos aquáticos, melhorando a qualidade da água.

Ramesh *et al.* (2015) ao avaliar o potencial de produção da enzima protease de *Bacillus* sp. isolado do intestino de peixes saudáveis da espécie *Labeo rohita*, afirmaram a importância do uso de bactérias proteolíticas na aquicultura, uma vez que elas auxiliam na digestão de proteínas, as quais melhoram as propriedades funcionais pela produção de peptídeos bioativos, além de reduzir alergênicos proteicos.

A forma de avaliar se o perifíton domesticado trouxe melhorias no cultivo dos animais pode ser realizado mediante o acompanhamento das variáveis de qualidade de água, desempenho zootécnico e sistema imunológico dos animais, como a avaliação dos parâmetros hematológicos, no caso de peixes. Além disso, pode-se realizar o desafio sanitário dos animais após cultivados na presença do perifíton domesticado contra algum patógeno, a fim de determinar a sobrevivência dos mesmos, para saber se o perifíton contribuiu para o fortalecimento do sistema imune.

O uso do perifíton artificial domesticado resultou em dados encorajadores com aumento de 30 a 50 % nas taxas de crescimento de camarão e um aumento de 48% na biomassa (DIRINGER *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo, as cepas potencialmente benéficas de bactérias do grupo *Bacillus* foram selecionadas com base em características como a capacidade de construção de biofilmes que atrai e facilita o estabelecimento de diatomáceas, a capacidade de interromper o processo “*quorum sensing*” de agentes bacterianos patogênicos, através da produção de lactonase, a capacidade de melhorar a digestão do camarão através da atividade da amilase e da protease, e a capacidade de colonizar o trato digestivo de camarão.

Postai *et al.* (2014) avaliaram o potencial de cepas bacterianas isoladas a partir do biofoco com poder probiótico em sistema de engorda de camarão. De 90 cepas bacterianas identificadas e avaliadas, apenas 8 tiveram potencial probiótico para serem aplicadas em sistema BFT (*Biofloc Technology System*). Concluíram que o uso de bactérias probióticas capazes de produzir enzimas poderia diminuir fatores de virulência da população bacteriana presente nos biofocos, aumentando a sobrevivência dos animais durante o cultivo.

Segundo Garcia *et al.* (2014) a caracterização e uso de um conjunto microbiano previamente determinado permitirá colonizar o sistema de biofocos ou biofilmes de forma controlada, contribuindo para a redução da instabilidade do sistema, evitando a ocorrência de patógenos, principalmente vibrioses, no caso de cultivo de camarões.

Ferreira *et al.* (2015) isolaram e identificaram bactérias do gênero *Bacillus* sp. a partir do cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema com flocos microbianos, e avaliaram o seu potencial na melhoria da qualidade da água, desempenho e parâmetros imunológicos quando adicionados à água e dieta. Concluíram que as bactérias Gram-positivas *Bacillus* spp., isoladas dos biofocos, são importantes para o cultivo e manutenção da saúde e crescimento de *L. vannamei*, e pode ser usado como probiótico ou como biocontrole para água em sistemas de cultura superintensivos.

Suantika, Turendro e Situmorang (2017) adicionaram bactérias nitrificantes em sistema de cultivo do camarão *Macrobrachium rosenbergii* na presença de substrato para crescimento de perifíton. Houve melhorias no desempenho zootécnico das pós-larvas, além da manutenção dos parâmetros de qualidade de água desejáveis para a espécie. Enquanto, Suantika *et al.* (2012) verificaram baixos níveis de compostos nitrogenados na água de cultivo do camarão *M. rosenbergii* quando fez uso de substrato vertical têxtil em conjunto de bactérias nitrificantes. Ranjeet e Hameed (2015) testaram, no cultivo juvenis de tilápia do Nilo, três diferentes substratos (bamboo, PVC e redes de nylon) e a adição de *Lactobacillus acidophilus* e *L. sporogenes*. Comprovaram que o uso de tubos de PVC e bambu melhoraram a produção de peixe, e que a adição das bactérias nos tanques de cultivo forneceu crescimento contínuo de bactérias benéficas ao redor do substrato, proporcionando melhorias no desenvolvimento do perifíton. No entanto, esses trabalhos fizeram a adição de bactérias isoladas a partir de sistemas de cultivos comerciais, não sendo isoladas do perifíton.

Dessa forma, são ainda necessárias pesquisas que resultem no conhecimento e caracterização de bactérias pertencentes ao perifíton espontâneo em sistemas de cultivo de animais aquáticos, as quais possibilitará a manipulação (domesticação) desses organismos com ação benéfica para os animais ou o ambiente. O que possibilitará o uso de

bactérias probióticas autóctones, ou seja, isoladas do próprio sistema de cultivo. A adição dessas bactérias aos sistemas com substratos submersos, garantirá maior agregação do perifíton, o que permitirá a presença regular de um determinado biofilme nos tanques de cultivo. Já que grupos totalmente novos de micro-organismos podem surgir após os processos de sucessão, os quais podem não ser consumidos pelos peixes (RANJEET; HAMEED, 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental 1: cultivo e análise da microbiota do perifíton formado naturalmente em sistema de cultivo de Tilápia.

O cultivo dos juvenis de tilápia foi desenvolvido no Laboratório de Ciência e Tecnologia Aquícola-LCTA, unidade de pesquisa do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici, Fortaleza, Ceará).

O trabalho foi realizado em dois grupos experimentais, onde os juvenis de tilápia foram cultivados em tanques com substrato artificial para crescimento do perifíton e em tanques sem substrato. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, fazendo uso de 5 repetições para cada tratamento, totalizando 10 tanques experimentais. Como substrato artificial foi utilizado placas de PVC (FIGURA 1) cobrindo 135% da área do espelho de água (CAVALCANTE *et al.*, 2017a).

Foram utilizados juvenis de tilápia do Nilo com peso corporal inicial de aproximadamente 1,0 g, os quais foram estocados em caixas de polietileno de 250 L em uma densidade de 24 peixes/m<sup>3</sup>. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia nos horários de 8, 11, 14 e 16h. Foram utilizados dois tipos de rações durante o experimento, a primeira foi a ração em pó (farelada) contendo 46,18% de proteína bruta (PB); a segunda ração foi composta por 32,37% de PB com a granulometria de 2-3 mm. A taxa de arraçoamento iniciou com 10%, sendo diminuída de acordo com o aumento de peso dos peixes.

Figura 1 - Visão das estruturas de PVC utilizadas como substrato artificial para crescimento do perifíton.



Fonte: Elaborada pela autora.

##### 3.1.1 Variáveis de qualidade de água

Inicialmente, amostras de água de cada caixa foram coletadas para determinação de indicadores físico-químicos de qualidade de água do cultivo. No decorrer da pesquisa, a

periodicidade do monitoramento dessas variáveis e a metodologia empregada foram realizadas conforme a Tabela 1. O horário das coletas ocorreu sempre às 9:00 h.

Tabela 1 - Variáveis físico-químicas da água de cultivo, metodologia e periodicidade das análises realizadas.

Análise	Método	Periodicidade	Unidade
pH	Portátil	1x semana	-
Temperatura	Portátil	1x semana	°C
O <sub>2</sub>	Portátil	1x semana	mg L <sup>-1</sup>
Alcalinidade	Titulométrico	1x semana	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>
Dureza	Titulométrico	1x semana	mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>
NAT	Indofenol	1x semana	mg L <sup>-1</sup>
Nitrito	Griess-Islova	1x semana	mg L <sup>-1</sup>
Nitrato	Método de redução do cádmio	1x semana	mg L <sup>-1</sup>
Fósforo total	Colorimétrico	1x semana	mg L <sup>-1</sup>

Fonte: elaborada pela autora.

### 3.1.2 Variáveis de desempenho zootécnico

A biometria dos peixes foi realizada a cada quinze dias para obtenção da curva de crescimento e para o ajuste da ração. As seguintes variáveis de desempenho zootécnico foram obtidas: Sobrevivência (S %); Peso final (PF g); Comprimento final (cm); Taxa de Crescimento Específico (TCE %); Produtividade (g m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>); Fator de Conversão Alimentar (FCA); Taxa de Eficiência Proteica (TEP %) e Índice de uniformidade (IU %); de acordo com as seguintes equações descritas abaixo:

$$S (\%) = (100 \times nf / ni) \quad (1)$$

Sendo:

S = taxa de sobrevivência (%);

nf = número final de peixes;

ni = número inicial de peixes.

$$TCE (\% \text{ dia}^{-1}) = [(Ln \text{ pf} - Ln \text{ pi}) / \text{dias de cultivo}] \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

TCE = taxa de crescimento específico (%);

ln = logaritmo neperiano e;

pf = peso médio final;

pi = peso médio inicial;

t = tempo de cultivo (dias).

$$P \text{ (g m}^{-3} \text{ dia}^{-1}) = (\text{biomassa final} / \text{volume} / \text{dia}) \quad (3)$$

Sendo:

P = produtividade (g/m<sup>3</sup>);

Bf = biomassa final no tanque (g);

V = volume do tanque (m<sup>3</sup>).

T = tempo de cultivo (dias)

$$\text{FCA} = \text{Qr} / \text{Gb} \quad (4)$$

Sendo:

FCA = conversão alimentar aparente (g de ração g de peixe<sup>-1</sup>);

Qr = quantidade de ração consumida (g);

Gb = ganho de biomassa (g).

$$\text{TEP} = (\text{GP} / \text{Qr}) \quad (5)$$

Onde:

TEP = taxa de eficiência proteica;

Gp = ganho em peso (g);

Qr = quantidade de ração consumida (g).

$$\text{IU} = 100 - \text{CV} \quad (6)$$

Sendo:

IU = índice de uniformidade (%);

CV = coeficiente de variação

### ***3.1.3 Coletas do perifíton desenvolvido espontaneamente***

A primeira coleta do perifíton desenvolvido espontaneamente nos tanques de cultivo de tilápia foi realizada logo após a observação visual da formação do biofilme nos substratos artificiais (10 dias após o início do cultivo). A amostra de perifíton foi raspada de uma área de 10 cm<sup>2</sup> do substrato, sendo colocada em garrafa de vidro cor âmbar, transportada em caixa isotérmica até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), unidade de pesquisa do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC. Foram realizadas coletas quinzenais após a inicial do perifíton, no período de agosto a outubro de 2015, o que resultou num total de quatro coletas.

### *3.1.3.1 Processamento das amostras de perifíton espontâneo*

Ao chegar ao LAMAP a amostra de perifíton, para ser utilizado na quantificação de grupos bacterianos e fúngicos, foi homogeneizada a 9,0 mL de solução salina 0,85%, formando a diluição 10<sup>-1</sup>, a partir da qual foram realizadas as demais diluições seriadas até 10<sup>-5</sup>. Esse procedimento foi realizado para as demais amostras coletadas quinzenalmente até o final do experimento. Enquanto a amostra destinada para qualificação do plâncton foi raspada e acondicionada em tubo Falcon, e transportada diretamente para o laboratório. Adicionou-se 5,0 mL de formalina a 4% nas amostras para posterior identificação.

### *3.1.3.2 Análise qualitativa do plâncton presente no perifíton espontâneo*

Para qualificação do fitoplâncton e zooplâncton foram empregadas as metodologias de acordo com Asaduzzaman *et al.* (2010) e Viau *et al.* (2013).

### *3.1.3.3 Análise quantitativa dos grupos bacterianos*

#### *3.1.3.3.1 Bactérias Heterotróficas cultiváveis e gênero *Aeromonas* sp.*

No Quadro 2 encontram-se descritas as metodologias empregadas para a quantificação de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e gênero *Aeromonas* sp.

Quadro 2 - Descrição da metodologia empregada para a quantificação dos grupos bacterianos (BHC e gênero *Aeromonas* sp.).

<b>Grupos Bacterianos</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Técnica de inoculação</b>	<b>Incubação</b>	<b>Referência</b>
BHC	Ágar PCA (DIFCO)	<i>Pour plate</i>	35°C/48h	(APHA, 2000)
<i>Aeromonas</i>	Ágar GSP (HIMEDIA) acrescido de 20 µg de ampicilina/mL	<i>Pour plate</i>	35°C/48h	(HUGUET; RIBAS, 1991).

Fonte: elaborado pela própria autora.

Passado o período de incubação, as placas que apresentaram valores de contagens entre 25 e 250 colônias foram contadas. Placas que não apresentarem valores de contagens no intervalo citado foram estimadas. Para o cálculo da Contagem Padrão em Placas (CPP) utilizou-se a expressão: UFC (Unidade Formadora de Colônia) x o inverso do fator de diluição x fator de correção (10) (DOWNES; ITO, 2001).

#### 3.1.3.3.2 Populações bacterianas do ciclo do nitrogênio

Para a estimativa das populações bacterianas fixadoras de nitrogênio, nitrificantes e desnitrificantes foi empregado o método de detecção do Número mais provável (NMP) utilizando a técnica dos tubos múltiplos (APHA, 2000; MARÍN *et al.*, 2012) com modificações.

As composições dos meios de cultura utilizados para a quantificação dos grupos bacterianos envolvidos no ciclo do nitrogênio estão descritas no Quadro 3, de acordo com Marín *et al.* (2012) com algumas modificações, fazendo uso de meios seletivos para cada grupo particular.

A composição da solução de elementos traços utilizados na preparação dos meios, para cada 1 L, foi a seguinte: 0,1 g/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,2 g/L de MnCl<sub>2</sub>.4 H<sub>2</sub>O, 0,002 g/L de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,02 g/L de CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O.

Quadro 3 - Meios seletivos utilizados para quantificação dos grupos de bactérias participantes do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos.

<b>Composto químico (g/L)</b>	<b>Fixadoras de Nitrogênio (g/L)</b>	<b>Meio Nitrificantes (g/L)</b>	<b>Meio Desnitrificantes (g/L)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	0,5	-
KNO <sub>3</sub>	-	-	0,2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,189	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	0,05	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,011	1	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,006	0,03	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	0,3	1
CaCO <sub>3</sub>	-	7,5	1
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02	-	-
SrCl.6H <sub>2</sub> O	0,01	-	-
Elementos traços	1mL	1mL	1mL
pH	7,8	7,8	7,8

Fonte: elaborado pela autora.

De acordo com o Quadro 3, o meio utilizado para as fixadoras de nitrogênio foi composto por: 0,189g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05g de NaHCO<sub>3</sub>; 0,011g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,06g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,02g de CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,01g de SrCl.6H<sub>2</sub>O; 1 mL de elementos traços. Isso para cada 1L de meio, sendo o pH final 7,8. Posteriormente foi distribuído 10 mL em 25 tubos de ensaio, os quais foram autoclavados a 121°C por 15min. Esse procedimento foi realizado para todos os demais meios de cultura utilizados para quantificação das bactérias do ciclo do nitrogênio. Meio para as nitrificantes: 0,5g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,03g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,3g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 7,5g de CaCO<sub>3</sub>. O pH final igual a 7,8. E o meio para as desnitrificantes: 0,2g de NaNO<sub>3</sub>; 1g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1g de CaCO<sub>3</sub>. O pH final de 7,8.

A partir das diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>) da amostra de perifíton, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada e adicionada a uma série de 5 tubos de ensaio contendo 10,0 mL dos meios específicos. Os tubos contendo os meios de fixadoras de nitrogênio e nitrificantes foram incubados por 21 dias a 28°C.

Para a quantificação do grupo das bactérias desnitrificantes, os tubos contendo o meio inoculado foram incubados em jarras de anaerobiose (PROBAC) por 21 dias em temperatura ambiente. Passado o período de incubação, os tubos inoculados foram submetidos aos reagentes reveladores, os quais auxiliaram na obtenção dos resultados, descritos abaixo.

Nos tubos com os meios para as bactérias fixadoras de nitrogênio foram adicionados em uma alíquota 0,5 mL o reagente de Nessler para observar a presença de  $\text{NH}_4^+$ , sendo observado coloração amarelada a esverdeada, em caso positivo.

Para os tubos com os meios para nitrificantes e desnitrificantes, adicionou-se o reagente de Griess-Ilosvay. A presença de uma coloração vermelha indicava a presença de nitrito, sendo o teste positivo para nitrificantes. Se a coloração continuasse transparente adicionava-se uma pitada de zinco, para revelar ou não a presença de nitrito. Afirmando se ocorreu de fato o processo total de nitrificação (MARÍN *et al.*, 2012).

Os tubos positivos foram estriados nos meios dos quais foram retirados para o isolamento e identificação das bactérias fixadoras de nitrogênio, nitrificantes e desnitrificantes

#### 3.1.3.3.3 Fungos

Para a quantificação dos fungos, foi empregado o método Contagem Padrão em Placas (CPP) fazendo uso da técnica *spread plate*, onde alíquota de 100 $\mu\text{L}$  das respectivas diluições foram adicionadas em placas de Petri contendo o meio solidificado de Ágar Dextrose Batata (ADB) (HIMEDIA), acrescido de 10,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de ampicilina e solução de 1,8% de ácido tartárico. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28°C por até 7 dias.

Passado o período de incubação, as placas que apresentaram valores de contagens entre 25 e 250 colônias foram contadas. Placas que não apresentaram valores de contagens no intervalo citado foram estimadas. Para o cálculo da CPP utilizou-se a expressão: UFC (Unidade Formadora de Colônia) x o inverso do fator de diluição x fator de correção (10) (DOWNES; ITO, 2001).

#### 3.1.3.4 Seleção e Isolamento dos micro-organismos

Para o isolamento das BHC e das bactérias pertencentes ao ciclo do nitrogênio foi levado em consideração o tamanho e a coloração das colônias crescidas sob as placas quantificadas. Para as bactérias suspeitas de pertencerem ao grupo das *Aeromonas* sp. foram isoladas colônias pequenas e amareladas crescidas sob o meio ágar GSP.

Foram isoladas 10 colônias de cada meio de cultura utilizado na quantificação dos distintos grupos bacterianos em cada coleta realizada. Essas colônias foram acondicionadas em tubos contendo os respectivos meios dos quais foram isolados.

Os fungos foram isolados a partir das placas de ADB, sendo analisadas as

seguintes características: tamanho, textura, coloração e presença de exsudatos. Os isolados fúngicos foram mantidos em microtubos contendo o meio ADB acrescido de uma solução de 1,8% de ácido tartárico.

### **3.1.4 Identificação dos isolados microbianos**

#### **3.1.4.1 Identificação morfotintorial das bactérias**

A análise da morfologia e da estrutura da parede celular das bactérias isoladas foi realizada pela técnica de coloração de Gram, segundo Tortora, Funke e Case (2012). Através dessa coloração as bactérias foram classificadas em dois grupos, Gram positivas e Gram negativas, de acordo com a reação das paredes celulares aos corantes empregados. As cepas bacterianas foram renovadas no meio Ágar Triptona-Soja (TSA) e incubadas a 35°C por 24h. Passado esse período, foram submetidos à coloração morfotintorial de Gram.

#### **3.1.4.2 Identificação bioquímica das bactérias**

As cepas bacterianas isoladas dos meios PCA e AGSP foram submetidas a testes bioquímicos seguindo metodologia do Manual de Bergey (STALEY *et al.*, 2005). Dentre as provas que foram empregadas, podem ser citadas as seguintes: oxidase; catalase; fermentação de glicose, lactose e sacarose, fazendo uso do Ágar TSI; resistência ao fator vibriostático O/129; citrato, produção de indol e gás sulfídrico; motilidade, entre outros.

#### **3.1.4.3 Identificação genética**

##### **3.1.4.3.1 Extração do DNA total**

A identificação genética foi realizada das cepas pertencentes às bactérias heterotróficas utilizadas para compor o consórcio que iniciará o biofilme, sendo sua seleção baseada nos melhores resultados nos testes enzimáticos e formação de biofilme. Foram identificadas também as bactérias pertencentes ao grupo das nitrificantes.

As cepas bacterianas oriundas das bactérias heterotróficas cultiváveis totais (BHC) e do grupo das nitrificantes foram renovadas em ágar TSA e em ágar BHI, respectivamente. Posteriormente, as cepas foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL

de caldo Luria-Bertani (LB-DIFCO) por 48h a 35°C. Passado esse período, foi retirada uma alíquota de 2 mL e transferida para microtubos para realização da extração do DNA total. Para isso, foi utilizado o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Foi verificada a eficiência da extração do DNA total por eletroforese em gel de agarose 1%. Para isso, um mix foi preparado com a adição de 2 µL do corante Blue Juice, 1 µL do GelRed™ (500x) e 5 µL da amostra de DNA extraído. Posteriormente, cada mix, contendo as amostras, foi colocada nos poços do gel de agarose submetido à corrida a 120 V/cm<sup>2</sup> por 45min. O tampão utilizado foi Tris-EDTA (Tris-HCl 45 mM; EDTA 1 Mm, pH 7,8). Após a corrida, o gel foi fotodocumentado no sistema EDAS 120 (Kodak).

#### 3.1.4.3.2 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S

Após a extração do DNA total, a região V6 e V8 do gene 16S das bactérias foi amplificado por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universais 1401L (5'-CGG TGGT GTA CAA GGC CC-3') e 968U (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') descritos por Pereira *et al.* (2011) e Zhang e Fang (2001). Para a realização da PCR, foi preparado um mix com volume final de 12,5µL, e com o auxílio do termociclador AmpliTherm modelo TX96 as reações foram efetivadas. Na Tabela 2 estão descritos os reagentes utilizados para o mix bem como as condições de termociclagem.

Tabela 2 - Reagentes utilizados na formação do mix para cada amostra e condições de termociclagem.

Composição do mix			Condições de termociclagem
Reagente	Concentração estoque	Concentração final na amostra	
Tampão 10x	5x	0,4 x	94°C/2 min.
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,4 mM	
dNTP	4 mM	0,032 mM	30 ciclos:
Primer L1401	10 mM	0,08 mM	94°C/ 1 min.; 52°C/1 min;
Primer U968	10 mM	0,08 mM	72°C/ 2 min.
Taq polimerase	5 U µL <sup>-1</sup>	0,04 U	
DNA amostra	*	*	72°C/ 8 min.
Água ultrapura	q.s.p 25 µL	q.s.p 25 µL	

Fonte: Elaborada pela autora.

(\*) concentração não padronizada

Ao fim do processo de amplificação, alíquota de 5µL do produto da PCR foi adicionado a 3 µL do mix (2 µL do corante Blue Juice mais 1 µL do GelRed™) e aplicados em gel de agarose 1% nas mesmas condições de corrida citado anteriormente. Amostra de DNA da cepa *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950 pertencente da bacterioteca do laboratório foi utilizada como padrão para a reação, além disso, foi o utilizado o marcador molecular de 1kb ladder (Sigma®). O registro foi feito usando o fotodocumentador digital (Kodak® EDAS290).

Os produtos obtidos da PCR foram sequenciados por ciclagem pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) , com a utilização do Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. Os produtos da reação do sequenciamento foram purificados por precipitação em isopropanol/etanol líquidos em um sequenciador automático capilar ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram alinhadas com sequências previamente publicadas no banco de dados *GenBank* do National Center for Biotechnology Information utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

#### 3.1.4.4 Caracterização dos isolados fúngicos

A partir dos isolados fúngicos, um inóculo foi retirado e estriado em placas de ADB, sendo incubadas a 28°C por 5 a 8 dias. Passado esse período, uma alçada da colônia de fungo crescida na placa foi colocada sobre uma lâmina de vidro, a qual foi corada com adição de uma gota de Lactofenol – Azul de Algodão (BBL – NewProv). Uma lamínula foi posta sobre o esfregaço corado, sendo selada sobre a lamína com o auxílio de um esmalte incolor.

A análise morfológica e das estruturas reprodutoras foi realizada com o auxílio de um microscópio, fazendo uso da metodologia empregada no Módulo VII da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004). Para identificação a título de gênero dos fungos foi consultado o Atlas Micologia (TOMÉ; MARQUES, 2016).

#### 3.1.5 Caracterização das cepas iniciadoras do perifíton

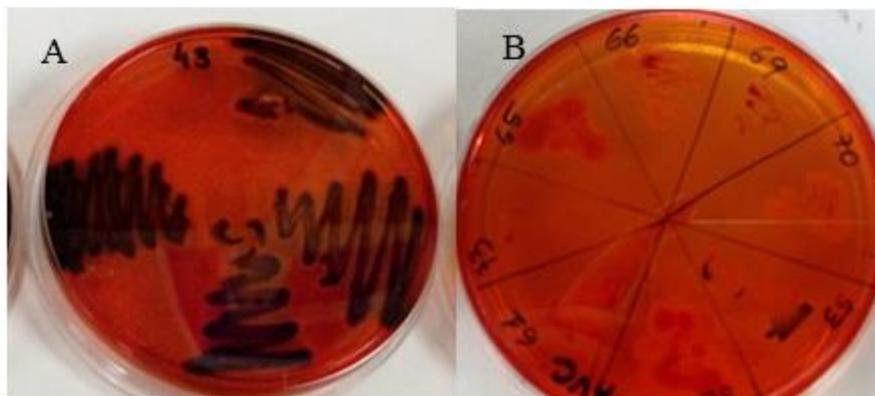
##### 3.1.5.1 Caracterização fenotípica das cepas bacterianas produtoras de biofilme

A caracterização dos grupos bacterianos capazes de formar biofilme foi realizada de acordo com as seguintes metodologias:

###### 3.1.5.1.1 Teste do Vermelho Congo

Para o teste do ágar vermelho congo (AVC), as cepas bacterianas foram inoculadas na superfície das placas com o meio, o qual foi preparado com 0,8g do corante vermelho congo (SIGMA) para 1L de Ágar infusão cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Agar*- Ágar BHI Difco) com adição de 36 g de sacarose, sendo incubadas a 35°C por 24h, seguido de incubação a temperatura ambiente por 48h. As cepas foram consideradas produtoras de biofilme (ou de exopolissacarídeos) quando colônias com coloração preta foram visualizadas sob a placa de AVC, enquanto as cepas não produtoras permanecem sem pigmentação (FIGURA 2). Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Freeman, Falkiner e Keane (1989), com algumas modificações. Uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foi utilizada no teste como controle positivo.

Figura 2 - Imagem da placa de AVC após período de incubação.



Fonte: elaborado pela autora.

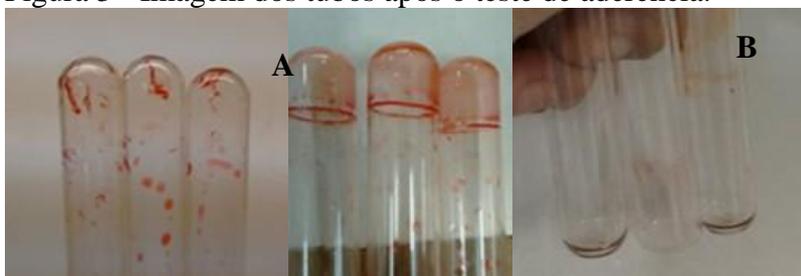
A) Produtora de EPS e B) Não produtora.

### 3.1.5.1.2 Teste de aderência ao vidro

Para a realização do teste de aderência ao vidro foi aplicado o protocolo descrito por Christensen *et al.* (1985) com algumas modificações.

As estirpes bacterianas foram crescidas em TSA por 24h a 35°C. Após o período de incubação, as cepas foram inoculadas em tubos contendo 3,0 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) (Difco) e incubadas por 48h a 35°C. Passado esse período, o conteúdo dos tubos foi descartado, e a superfície interna lavada três vezes com água destilada. Posteriormente, adicionou-se 3,0 mL de safranina 1% nos tubos secos durante 1 minuto, sendo o conteúdo removido com água destilada, e os tubos colocados para secar invertidos durante 30 minutos. O teste foi realizado em triplicata sendo considerado como positivo quando se observou a formação de biofilme nas paredes dos tubos de ensaio (FIGURA 3).

Figura 3 - Imagem dos tubos após o teste de aderência.



Fonte: elaborado pela autora.

A) resultado positivo; B) resultado negativo

### 3.1.5.1.3 Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC)

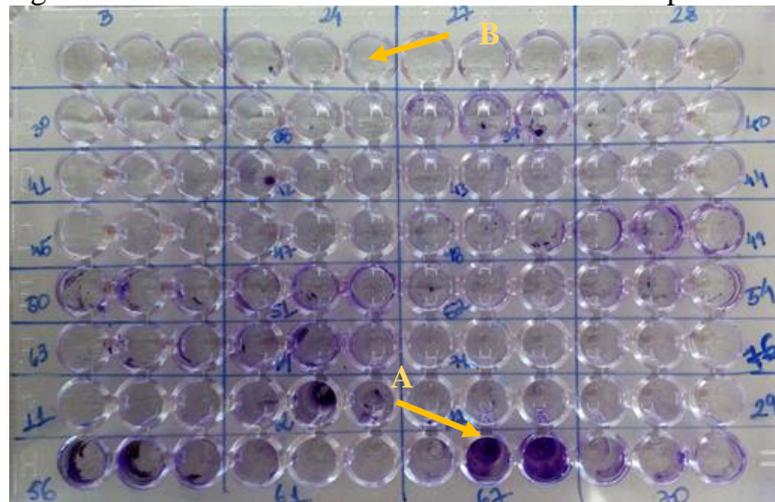
O teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC) foi realizado seguindo protocolo descrito por Christensen *et al.* (1985) com modificações.

As estirpes bacterianas foram crescidas em TSA por 24h a 35°C. Após o período de incubação, as cepas foram inoculadas em tubos contendo 3,0 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) (Difco) e incubadas por 48h a 35°C. Posteriormente, 200µL da suspensão bacteriana crescida no caldo foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços com fundo “u” em triplicata. Foram incubadas a 35° por 48h sem agitação, e após isso, os inóculos foram removidos e os poços lavados com 200µL de água destilada estéril três vezes e secos em estufa a 60° por 1h.

Após a secagem dos poços, foram adicionados 200µL de uma solução de cristal violeta 1% por 1 minuto. Lavagens sucessivas foram realizadas com água destilada e em seguida a placa foi colocada para secar a temperatura ambiente.

A obtenção do resultado foi obtida através da observação visual dos poços após a secagem, onde foi possível observar a presença ou ausência de coloração roxa. No caso as estirpes que apresentavam a capacidade de formar biofilme, foram evidenciadas pela aderência e coloração roxa no poço (FIGURA 4).

Figura 4- Resultado do teste de aderência em microplacas.



Fonte: elaborada pela autora.

A) Coloração roxa e agregados na parede do poço apresenta resultado positivo; B) Poço sem coloração e sem agregados na parede é considerado negativo.

### 3.1.5.2 Detecção da atividade enzimática das bactérias isoladas do perifíton espontâneo

Os isolados bacterianos do biofilme perifítico crescido espontaneamente nas estruturas submersas durante o cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo foram submetidos aos testes da expressão da atividade das exoenzimas: proteases (caseínase, gelatinase e elastase), fosfolipase, lipase, celulase, amilase. Além disso, foi realizada a avaliação da produção de ácido láctico no meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe (MRS), e verificação da produção de  $\beta$  hemólise em sangue de carneiro e de peixe (tilápia).

As bactérias isoladas foram inoculadas em placas contendo os respectivos meios de cultura específicos para a verificação da produção das exoenzimas.

#### 3.1.5.2.1 Caseínase

A detecção da atividade proteolítica foi realizada de acordo com recomendações de Rodrigues *et al.* (1993), com algumas modificações. As culturas bacterianas foram inoculadas em placas contendo ágar nutriente suplementado com 5% de leite em pó desnatado. Passado o período de incubação (35°C por até 5 dias), foi visualizada a formação de um halo translúcido, indicando a positividade do teste (FIGURA 5A).

#### 3.1.5.2.2 Gelatinase

Para a detecção da produção de gelatinase, as culturas bacterianas, previamente crescidas em TSA (35°/24h), foram inoculadas em placas contendo meio ágar TSA acrescida de 0,5% de gelatina, seguindo incubação a 35°C por até 7 dias. Como resultado positivo houve a formação de um halo translúcido ao redor das colônias, sendo utilizada a solução saturada de sulfato de amônio como revelador (FIGURA 5B) (RODRIGUES *et al.*, 1993).

#### 3.1.5.2.3 Elastase

No teste de produção de elastase, as cepas foram inoculadas em placas constituídas por uma camada de 15,0 mL composto por caldo nutriente e ágar Noble (Difco), sendo adicionado 5,0 mL de cobertura constituído de 0,3% de elastina. A positividade do teste foi observada pelo surgimento de um halo transparente ao redor da colônia, após o período de 24h até 48h por 35°C (FIGURA 5C) (RUST; MESSING; IGLEWSKI, 1994).

#### 3.1.5.2.4 Fosfolipase

A produção da fosfolipase foi detectada inoculando-se as cepas nas placas contendo TSA acrescido de 1% de emulsão de gema de ovo. A presença de um halo opalescente ao redor dos inóculos, após o período de incubação (35°C por 24 h), indicou a positividade do teste, com produção das respectivas enzimas (FIGURA 5D), sendo realizado de acordo com Liu, Lee e Chen (1996) com algumas modificações.

#### 3.1.5.2.5 Lipase

A produção da lipase foi detectada inoculando-se as cepas nas placas contendo TSA acrescido de 1% de Tween 80. A presença de um halo opalescente ao redor dos inóculos, após o período de incubação (35°C por 24 h), indicou a positividade do teste, com produção da enzima (FIGURA 5E) (LIU; LEE; CHEN, 1996).

#### 3.1.5.2.6 Celulase

A determinação da produção da celulase seguiu protocolo descrito por Teather e Wood (1982) com modificações. As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas contendo o meio ágar carboximetilcelulose (CMC), com incubação a 35°C por 24h até 48h. Esse meio foi constituído por 3,27g de meio mineral (DIFCO Bushnell-Haas Broth) acrescido de 1% p/v de carboximetilcelulose mais 15g de Agar-agar para cada 1L de meio. Passado o período de incubação, adicionou-se solução de vermelho congo 1% nas placas, a qual apresentando atividade da enzima celulase observou-se a formação de halo ao redor da colônia (FIGURA 5F).

#### 3.1.5.2.7 Amilase

Para determinação da produção de amilase, as estirpes bacterianas foram inoculadas em placas contendo ágar nutriente (AN- Difco) acrescido de 0,1% de amido solúvel, com incubação a 35°C por 24 a 48 h. Passado esse período, adicionou-se lugol 1% nas placas, a qual apresentando atividade da enzima amilase observou-se um halo transparente ao redor da colônia (FIGURA 5G) (RODRIGUES *et al.*, 1993).

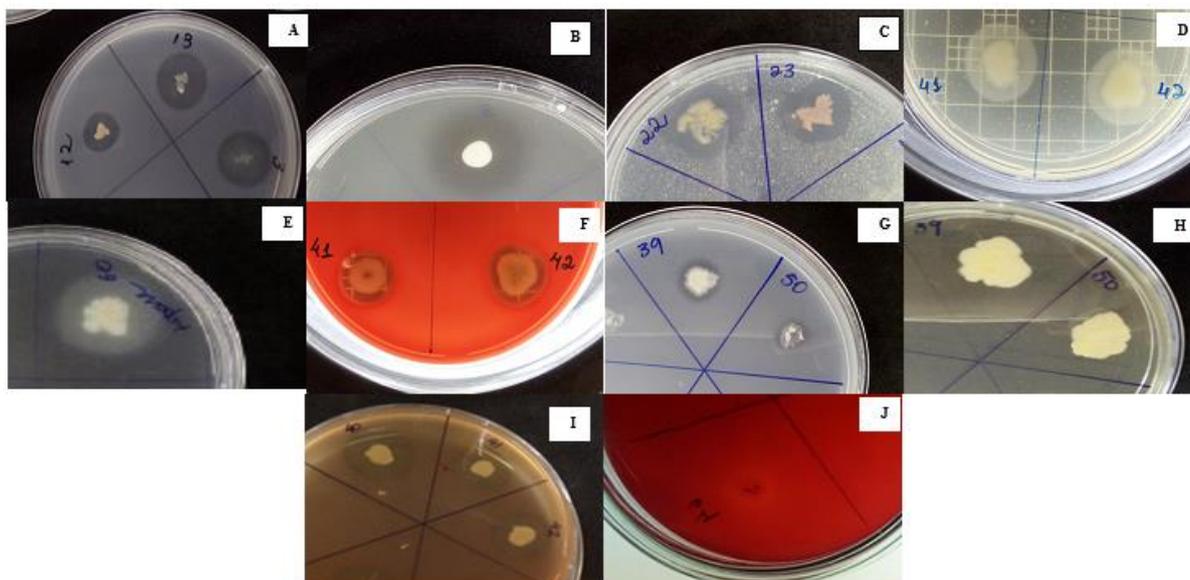
### 3.1.5.2.8 Avaliação da produção de ácido láctico (MRS)

A avaliação da produção de ácido láctico pelas estirpes bacterianas isoladas das BHC foi realizada por meio da inoculação das cepas em placas de Petri contendo o meio Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, DIFCO), sendo incubado a 35°C por 24 a 48h. Após esse período observou-se ou não o crescimento da colônia no meio (FIGURA 5H) (JATOBÁ *et al.*, 2011).

### 3.1.5.2.9 $\beta$ -hemólise

A atividade da  $\beta$ -hemólise foi verificada utilizando o meio base Agar sangue acrescido de 5% de sangue de carneiro, a qual foi inoculada com até 4 cepas, sendo incubadas a 35°C por 24 h. Passado esse período, o surgimento de um halo transparente ao redor do inóculo caracterizou a produção da  $\beta$ -hemólise (FIGURA 5I) (FURNISS; LEE; DONOVAN, 1979). Foi verificada também a produção ou não de  $\beta$ -hemólise utilizando sangue de tilápia em algumas cepas (FIGURA 5J).

Figura 5 - Resultados positivos dos testes enzimáticos representados pela formação de halos ao redor das colônias bacterianas.



Fonte: elaborada pela autora.

(A) halo transparente ao redor do inóculo indicando a hidrólise da caseína; (B) hidrólise da gelatina; (C) expressão da elastase; (D) halo opalescente indicativo da expressão da fosfolipase; (E) expressão da lipase; (F) halo amarelado em torno da colônia indicando a expressão da celulase; (G) expressão da amilase; (H) crescimento do inóculo sob o meio MRS indicando a positividade na produção de ácido láctico; (I) halo característico da atividade de  $\beta$  hemólise em sangue de carneiro; (J)  $\beta$  hemólise em sangue de peixe.

## **3.2 Delineamento experimental 2: Seleção, formação e aplicação dos consórcios bacterianos para formação de perifíton em ambiente de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.**

### **3.2.1 Critérios para a seleção dos isolados bacterianos para compor consórcio iniciador do perifíton no teste *in vivo***

#### **3.2.1.1 Bactérias heterotróficas cultiváveis**

A seleção das cepas de BHCs foi baseada nos melhores resultados do teste de formação de biofilme, testes enzimáticos e teste de antagonismo *in vitro* entre as cepas. Além desses foram realizados testes complementares para determinar se os isolados de BHC, além de serem formadores de perifíton, tinham efeito probiótico para ser testado via ração.

Inicialmente, as cepas pré-selecionadas através da atividade enzimática e formação de biofilme, foram testadas a capacidade de inibição dos patógenos *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Edwardsiella tarda* ATCC 15947, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Streptococcus* sp. oriunda da bacterioteca do LAMAP, reconhecidas por causar patogenicidade em tilápias.

A prova de inibição a patógenos *in vitro* foi realizado através do teste de antagonismo. Para isso, um inóculo central com as bactérias patogênicas foi feito na placa com ágar TSA, e estrias perpendiculares a ela foram feitas com as cepas testes. O resultado do antagonismo foi observado após incubação das placas em estufa a 35°C por 24h, sendo considerado efeito antagônico a inibição do crescimento da estria feita com as bactérias consideradas patogênicas as tilápias.

As cepas que apresentaram maior número de inibição aos patógenos, e principalmente a *A. hydrophila*, foram testadas a eficiência do crescimento em pH 5 e 9, seguindo recomendações de Cai *et al.* (1999) com modificações. Para isso, as bactérias foram renovadas em ágar TSA e depois inoculadas em caldo LB com pH de 5 e de 9, sendo incubadas a 35°C por 24h. Passado esse período, foi observado como resultado positivo a turvação do meio.

Em relação a temperatura, o crescimento das bactérias foi avaliado a 25°C e 40°C. As cepas foram inoculadas em caldo LB e colocadas sob essas duas temperaturas, e após 24h foi visualizado o resultado através da turvação ou não do meio.

Após esses testes, as bactérias foram avaliadas em relação ao efeito antagônico

entre elas usando a técnica de estrias cruzadas, a fim de construir o consórcio microbiano para ser aplicado para formação do biofilme domesticado e para suplementação via ração.

A susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada apenas das cepas escolhidas para o consórcio. A metodologia utilizada seguiu as recomendações do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), fazendo uso dos antimicrobianos Cloranfenicol 30 µg (CLO), Tetraciclina 30 µg (TET), Eritromicina 15 µg (ERI) e Florfenicol 30 µg (FLF). As cepas foram renovadas em agar TSA (35°C/24h), e após incubação, um inóculo foi retirado e adicionado em 9 mL de salina 0,85%. Depois da homogeneização, foi feito o ajuste do inóculo com o auxílio de um espectrofotômetro a fim de deixar a absorbância entre 0,08 a 0,100 nm, equivalendo a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Com o inóculo ajustado foi feito um tapete com *swab* em placas de ágar Muller-Hinton. Posteriormente, foram colocados os antimicrobianos sob as placas, em seguida foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. Passado esse período, foi feita a mensuração dos halos de inibição com o auxílio de um paquímetro digital, e os resultados foram classificados de acordo com as recomendações do CLSI (2010).

As cepas probióticas selecionadas das BHC foram adicionadas na ração, por aspersão. Para isso, as cepas selecionadas foram renovadas em TSA (24h a 35°C), posteriormente foi feito ajuste de cada cepa em salina 0,85%, a fim de atingir a concentração celular igual a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Foi utilizada a proporção de 100 mL de salina ajustada para cada 1Kg de ração. Fazendo uso de alíquotas de igual volume para cada cepa utilizada no consórcio. Após o processo de aspersão, a ração era colocada para secagem e posteriormente era feita a suplementação de 2% de óleo vegetal. A ração foi armazenada em recipiente fechados, sendo preparada quinzenalmente, a cada biometria realizada.

### 3.1.1.2 Bactérias nitrificantes

A seleção das cepas nitrificantes foi baseada nos resultados do teste de formação de biofilme, testes enzimáticos e teste de antagonismo *in vitro* entre as cepas. Para isso, foi feita a escolha de um representante de cada grupo bacteriano identificado que apresentaram os melhores resultados.

O teste de antagonismo *in vitro* entre as cepas selecionadas foi realizado através da técnica de estrias cruzadas (*Cross streak*) (YOSHIDA *et al.*, 2009), com adaptações. Esse teste é realizado com o intuito de investigar se existe a possibilidade de utilizar diferentes cepas na formação de um consórcio microbiano. Para isso, as cepas foram renovadas em ágar TSA (35°C por 24h). Uma estria central, contendo o inóculo da cepa testada, foi feita em

placas de ágar TSA. Posteriormente, as demais bactérias em teste foram inoculadas perpendiculares a primeira estria, mantendo uma distância de 0,5 cm. Foram feitas no máximo 5 estrias perpendiculares por placa. Após 24h do período de incubação a 35°C, foi observado o resultado. A atividade antagônica entre as bactérias foi verificada através da inibição ou não do crescimento da estria central feita com os demais inóculos.

### **3.1.2 Formação do perifíton domesticado (bactérias iniciadoras do perifíton)**

As bactérias selecionadas para serem as iniciadoras do perifíton (ou para serem adicionadas no sistema de cultivo) foram renovadas em TSA a 35°C por 24h. Após esse período foram repassadas, individualmente, para salina 0,85% e ajustadas à Escala de MacFarland 0,5, fazendo uso de espectrofotômetro na faixa de absorbância de 625 nm, a fim de obter culturas no intervalo entre 0,08 a 0,100 nm (concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente, alíquotas de 1,0 mL de salina ajustada foi retirada e adicionada a tubos tipo falcons contendo caldo TSB. Um pedaço de substrato artificial (PVC) nas dimensões de 3x6 cm foi adicionado a esse sistema, sendo incubado a 35°C por 48h. Ao todo foram utilizados para cada lado do substrato duas placas (3x6 cm) contendo as bactérias iniciadoras.

Posteriormente, esse pedaço de substrato foi levado e colocado sobre os substratos submersos no cultivo dos juvenis de tilápia, a fim de favorecer o crescimento do biofilme domesticado sobre toda a estrutura do substrato artificial.

O substrato para crescimento do perifíton, no caso as placas de pvc de 3x6 cm, foi lavado com detergente livre de fósforo, secos e esterilizado com UV, para posterior uso, seguindo recomendações de Khatoon *et al.* (2007).

### **3.1.3 Aplicação dos consórcios bacterianos no ambiente de cultivo**

O experimento *in vivo* foi realizado na Estação de Piscicultura do departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará.

O trabalho foi realizado em 5 grupos experimentais, como pode ser visto na Tabela 3, com delineamento inteiramente casualizado, fazendo uso de 4 repetições para cada tratamento, totalizando 20 tanques experimentais. Para desenvolvimento do perifíton foram utilizados como substrato artificial placas de PVC cobrindo 135% da área do espelho de água.

Juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso corporal inicial de aproximadamente 1,0 g foram adquiridos com um produtor local, os quais foram estocados

em caixas de polietileno de 250 L em uma densidade de 24 peixes/m<sup>3</sup>. Os peixes foram alimentados 4 vezes ao dia nos horários de 8:00, 11:00, 14:00 e 16:00hrs com uma ração comercial para peixes. A taxa de arraçoamento inicial foi de 10% do peso corporal total, sendo ajustada de acordo com o aumento de peso dos peixes.

Tabela 3 - Delineamento experimental do teste *in vivo* do cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema com perifíton espontâneo, domesticado e cultivo sem perifíton.

Tratamentos	Descrição	Repetições
<b>T1</b>	Cultivo de tilápia sem biofilme perifítico, sem estrutura de PVC.	4
<b>T2</b>	Cultivo de tilápia com biofilme crescido espontaneamente em substrato submerso.	4
<b>T3</b>	Semente de bactérias iniciadora do perifíton com potencial probiótico (mix <i>Bacillus</i> sp.) crescido em substrato submerso.	4
<b>T4</b>	Semente de bactérias iniciadoras do perifíton com potencial biorremediador de compostos nitrogenados crescido em substrato submerso.	4
<b>T5</b>	Cultivo de tilápia com uso de ração adicionada de bactérias probióticas (mix <i>Bacillus</i> sp.); sem substrato.	4
Total de caixas de 250 L		20

Fonte: elaborada pela autora.

Foi realizado o acompanhamento semanal, às 9:00hs, dos seguintes parâmetros de qualidade de água empregando as seguintes metodologias: Nitrogênio amoniacal total (NAT) (método do indofenol); Nitrito (método de Griess-Ilosva); Nitrato (método da coluna redutora de cádmio) e fósforo reativo (método azul de molibdênio). Já as variáveis de oxigênio dissolvido (medidor de oxigênio marca e modelo), pH e temperatura (medidor de pH KL-009 com sonda de temperatura integrada) foram mensurados semanalmente, duas vezes ao dia (9:00 e 16:00hrs). Quinzenalmente foi realizada a análise da alcalinidade total (método titulométrico com solução padrão de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e dureza total (método titulométrico com solução padrão de EDTA). As análises foram realizadas de acordo com Clesceri, Greenberg e Eaton (1998) e Sá (2012).

Biometrias quinzenais foram realizadas para avaliação do desempenho zootécnico, e ajuste da ração.

O presente projeto foi aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), protocolo nº 94/2017. Estando de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de

2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 3.2 Análise hematológica dos peixes

Ao fim do período experimental foi feita a seleção de forma aleatória de 6 peixes de cada tratamento empregado. Esses animais passaram por um jejum de 24 horas. Passado esse período foram capturados de forma rápida e cuidadosa para não causar estresse, e passaram por um banho anestésico com solução eugenol na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foi preparada a partir de uma solução estoque constituída por 1 mL do anestésico diluído em 10 mL de etanol absoluto PA (99,9%) (DELBON; RANZANI PAIVA, 2012). As normas para a colheita do sangue e eutanásia dos peixes foram realizadas de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as Diretrizes de Prática de Eutanásia do CONCEA (2013).

Foi feita a colheita do sangue por meio da punção caudal, fazendo uso de agulhas hipodérmicas banhadas com solução de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (ácido etilenodiaminotetraacético) a 10% (RANZANI PAIVA *et al.*, 2013). O sangue foi homogeneizado e transferido para microtubos de polipropileno contendo a mesma solução anticoagulante para posterior análise dos parâmetros hematológicos.

Extensões sanguíneas foram confeccionadas em lâminas de vidro limpas e desengorduradas. A partir da deposição de uma gota de sangue livre de anticoagulante na lâmina, um esfregaço foi feito com uma lâmina guia formando um ângulo de  $45^\circ$ . Posteriormente, as extensões confeccionadas passaram pelo processo de coloração, utilizando o kit Panótico rápido LB (Laborclin), para realização da contagem diferencial das células sanguíneas por microscopia.

A determinação do eritograma consistiu na contagem dos eritrócitos ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ ), determinação do hematócrito (%), taxa de hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ ) e dos índices hematimétricos Volume corpuscular médio (VCM- fL), Hemoglobina corpuscular média (HCM- pg) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM-  $\text{g dL}^{-1}$ ).

O hematócrito foi realizado logo após a colheita do sangue, preenchendo  $2/3$  de um microcapilar heparinizado com sangue devidamente homogeneizado tendo uma das extremidades vedada com parafina. Em seguida, foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. Após o processo, foi feita a leitura do resultado com o auxílio de uma régua específica, sendo

o resultado expresso em percentagem (%) de células vermelhas em relação ao sangue total (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

A contagem de eritrócitos seguiu a metodologia do hemacitômetro (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013), sendo realizada a partir da diluição de 10 $\mu$ L de sangue em 2 mL da solução de formol citrato. A contagem foi feita em câmara de Neubauer através de um microscópio no aumento de 400x. O resultado foi obtido por meio da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de eritrócitos (células x } 10^6 \mu\text{L}^{-1}) = \text{n}^\circ \text{ de glóbulos contados x } 200 \times 10 \times 5 \quad (7)$$

A dosagem da taxa de hemoglobina foi determinada por espectrofotometria de acordo com o método cianometahemoglobina descrito por Collier (1944), com modificações. Uma alíquota de 10 $\mu$ L do sangue foi diluída em 2mL da solução Drabkin (DINÂMICA), e posteriormente foi feita a leitura no espectrofotômetro (marca e modelo) na absorvância de 540nm, usando a solução de Drabkin como branco.

$$\text{Taxa de Hemoglobina (g dL}^{-1}) = \text{Absorbância da amostra x Fator de correção} \quad (8)$$

Os índices hematimétricos foram determinados após a obtenção da contagem total dos eritrócitos, dosagem da taxa de hemoglobina e hematócrito. As seguintes fórmulas foram aplicadas:

$$\text{VCM (fL)} = (\text{Ht x } 10 / \text{n}^\circ \text{ de eritrócitos}) \times 10 \quad (9)$$

Onde:

VCM: Volume corpuscular médio

Ht: hematócrito (%)

$$\text{HCM (pg)} = (\text{Hb x } 10) / \text{n}^\circ \text{eritrócitos} \quad (10)$$

Onde:

HCM: Hemoglobina corpuscular média

Hb: taxa de hemoglobina (g dL<sup>-1</sup>)

$$\text{CHCM (g dL}^{-1}) = (\text{Hb x } 100) / \text{Ht} \quad (11)$$

Onde:

CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média

A obtenção da proteína plasmática foi realizada através da diluição de 20µL do plasma sanguíneo, após centrifugação a 10.000 rpm por 5 min, em 1mL do reagente Biureto (DINÂMICA). Posteriormente, foi feita a leitura no espectrofotômetro (marca e modelo) na absorvância de 545nm.

$$\text{PPT (g dL}^{-1}\text{)} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{Fator de correção} \quad (12)$$

O leucograma foi determinado através da contagem total e diferencial das células leucocitárias a partir da metodologia indireta (HRUBEC; SMITH, 1998; PEREIRA *et al.*, 2015). Nesse método, as extensões sanguíneas foram coradas pela coloração panótica (LABORCLIN) e em seguida foi feita a contagem de 2000 células (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos) e dentre estas se registram quantos leucócitos apareceram. Para a obtenção do número total de células leucocitárias foi aplicada a Fórmula (7), considerando os eritrócitos contados na câmara de Neubauer.

$$\text{Leucócitos (células} \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}\text{)} = (\text{n}^\circ \text{ de leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ de eritrócitos})/2000 \quad (13)$$

A contagem diferencial dos leucócitos, de acordo com Ranzani-Paiva (2013) consiste em determinar a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, célula granulocítica especial, linfócitos, monócitos e outros elementos da série leucocitária. Para isso, foi realizada a contagem das lâminas através de microscopia, fazendo uso da objetiva de imersão (100x), inicialmente, para classificar, no mínimo 200 leucócitos. Posteriormente, com a objetiva no aumento de 400x, percorre-se todo o corpo da extensão em movimento de “zig-zag”, anotando-se o número de cada célula aparecia. Os valores de cada variedade de célula leucocitária foram obtidos em percentual.

### 3.3 Desafio *in vivo*

Ao final do segundo período experimental foi realizado um teste desafio dos peixes por exposição ao patógeno *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, reconhecido por causar enfermidades nas tilápias. Seis peixes de cada tratamento foram infectados com 0,1 mL de inóculo bacteriano, na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, por meio de uma injeção

intraperitoneal. Durante 96 horas os peixes foram monitorados em relação à mortalidade e aparecimento de sinais clínicos.

### **3.4 Análise Estatística**

Os resultados de qualidade de água, desempenho zootécnico e parâmetros hematológicos foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados. Quando houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, as suas médias foram comparadas duas a duas, utilizando teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos softwares *BioStat* (5.0) e Excel 2010 (Microsoft Corp.®).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Delineamento experimental 1: cultivo e análise da microbiota do perífíton formado naturalmente em ambiente de cultivo de tilápia do Nilo

#### 4.1.1 Qualidade de água

Os valores de temperatura e de pH da água de cultivo foram similares entre os tratamentos empregados, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ), sendo em média igual a 27,5°C e 8,1, respectivamente, como pode ser observado na Tabela 4. Os valores estão dentro do intervalo aceitável para o crescimento das tilápias (EL-SHERIF; EL-FEKY, 2009 a, b).

Tabela 4 - Variáveis de qualidade de água do cultivo de juvenis de tilápia do Nilo na presença e ausência de substrato para desenvolvimento de biofilme perifítico espontâneo.

Variável	Substrato para crescimento de Perífíton		p valor
	Ausente	Presente	
Temperatura (°C)	27,4 ± 0,1	27,7 ± 0,3	0,09
pH	8,1 ± 0,07	8,2 ± 0,2	0,65
Alcalinidade Total (mg L <sup>-1</sup> eq. CaCO <sub>3</sub> )	159,1 ± 4,7	165,2 ± 9,5	0,185
Dureza Total (mg L <sup>-1</sup> eq. CaCO <sub>3</sub> )	185,4 ± 5,5 a	171,2 ± 9,5 b	<0,01
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	9,86 ± 0,4 b	10,9 ± 0,7 a	<0,01
NAT <sup>1</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	4,005 ± 0,084 a	1,20 ± 0,35 b	<0,01
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0,0002 ± 0,0001	0,0002 ± 0,00001	0,892
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	1,358 ± 0,18 a	0,003 ± 0,0002 b	<0,01
Ortofosfato (mg L <sup>-1</sup> )	0,694 ± 0,0001	0,689 ± 0,005	0,749

Fonte: elaborada pela autora.

Para cada variável, letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Ausência de letras falta de significância estatística (ns:  $p > 0,05$ ).

A alcalinidade total não variou entre os tratamentos empregados, apresentando concentrações superiores a  $150 \text{ mg L}^{-1} \text{ eq. CaCO}_3$ , valores esses superiores a faixa de recomendação para os cultivos que é  $20\text{-}120 \text{ mg L}^{-1} \text{ eq. CaCO}_3$  (BOYD, 2003). Viveiros de aquicultura com alcalinidade elevada mantêm estável o pH durante todo o dia, não havendo oscilações (MERCANTE *et al.*, 2011), evitando que ocorra algum estresse aos organismos cultivados. Em concordância com o presente estudo, Asaduzzaman *et al.* (2009a) encontraram alcalinidade acima de  $140 \text{ mg L}^{-1} \text{ eq. CaCO}_3$  no cultivo de tilápia na presença de perifíton.

A concentração de dureza total apresentou diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos empregados, a água dos tanques que não receberam substrato artificial para crescimento de biofilme apresentou maior dureza sendo igual a  $185,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ eq. CaCO}_3$ . No entanto, ambos os tratamentos apresentaram valores superiores a faixa de referência para aquicultura compreendida entre  $60 - 150 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  (SÁ, 2012). Contrário ao presente estudo, Duque *et al.* (2012) não encontraram diferenças entre a dureza total da água nos tanques com substrato e sem substrato no cultivo de tilápia.

A concentração de oxigênio dissolvido foi significativamente maior ( $p < 0,01$ ) nos tanques onde se tinha a presença do perifíton, apresentando valores superiores a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  durante o período do dia. Enquanto as concentrações de oxigênio dissolvido na água de cultivo dos tanques sem substratos submersos foram iguais a  $9,86 \text{ mg L}^{-1}$ . Esses elevados valores de oxigênio durante o dia, em ambos os tratamentos, podem sofrer quedas no período noturno e ao amanhecer (SÁ, 2012), podendo causar estresses as tilápias cultivadas. No entanto, na presente pesquisa não foi realizada análise nictimeral para tal afirmação.

Cavalcante *et al.* (2017b) observaram maior variação nictimeral das concentrações do oxigênio da água dos tanques controle (águas verdes) e Perifíton do que nos tratamentos com Bioflocos e Biofíton (integração bioflocos mais perifíton), ao cultivarem juvenis de tilápia. Encontraram valores menores que  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , as 23:00hrs, e maiores que  $16 \text{ mg L}^{-1}$ , 15:00hrs, nos tanques do Controle e Perifíton. Enquanto nos tanques com Bioflocos e Biofíton, as concentrações permaneceram em torno de  $8 \text{ mg L}^{-1}$ , durante todo o período experimental. E isso foi devido a contínua aeração mecânica empregada nesses tratamentos. Richard *et al.* (2010) encontraram valores de oxigênio iguais a  $6,1$  a  $10,9 \text{ mg L}^{-1}$  durante cultivo do peixe *Liza aurata* na presença de substrato de PVC para desenvolvimento de perifíton. Corroborando com a presente pesquisa, Azim *et al.* (2003b) constataram que a inclusão de substrato submerso nos tanques de cultivo de organismos aquáticos aumentou os níveis de oxigênio dissolvido. Já Duque *et al.* (2012) ao realizar o policultivo de *O. niloticus* e *Prochilodus magdalenae* na presença de perifíton não encontraram efeito significativo sobre a

concentração de oxigênio nos tanques de cultivo.

Os valores médios de nitrogênio amoniacal total (NAT) e de nitrato na ausência de perifíton (4,005 e 1,358 mg L<sup>-1</sup>) foi significativamente ( $p < 0,01$ ) maiores que na presença (1,20 e 0,003 mg L<sup>-1</sup>), enquanto a concentração de nitrito não variou significativamente na água de cultivo independente do tratamento empregado. Viau *et al.* (2013) também observaram diminuição significativa da concentração de amônia e nitrito no cultivo do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* quando empregou o tratamento com biofilme perifítico mais alimento artificial.

A presença de biofilme perifítico na água de cultivo auxilia na remoção dos compostos nitrogenados por causa da presença dos grupos de bactérias nitrificantes e heterotróficas fixas aos substratos, e comunidade algal (THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002; EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; ANAND *et al.*, 2013b). Esses micro-organismos, além de serem responsáveis pela mineralização, incorporam esses nutrientes na biomassa, aumentam a quantidade de alimento natural nos viveiros.

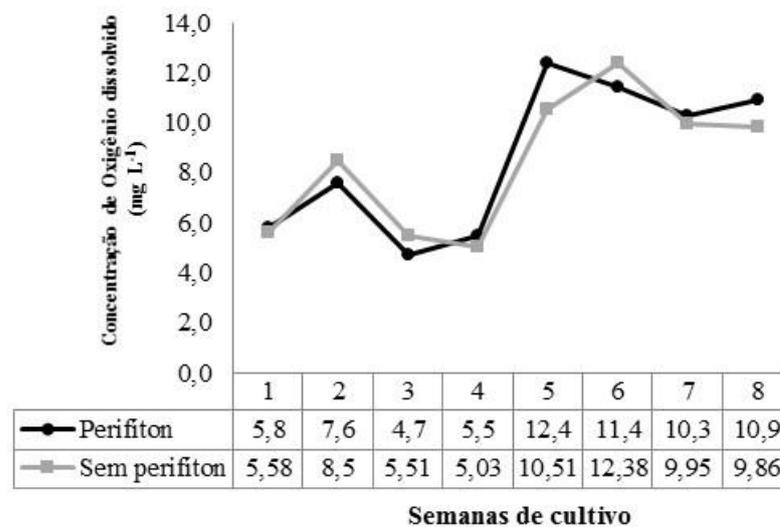
Diversos autores relatam a importância da adição de substratos nos viveiros, a fim de estimular o crescimento de bactérias nitrificantes (THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002; SUANTIKA *et al.*, 2012; FURTADO; POERSCH; WASIELESKY, 2015). Uma vez que os substratos ao serem adicionados nos tanques, ficam posicionados na coluna de água onde o oxigênio dissolvido é mais disponível, acelerando o processo da nitrificação (MILSTEIN; PERETZ; HARPAZ, 2009; ASADUZZAMAN *et al.*, 2008).

Não se observou diferença significativa na concentração de ortofosfato na água entre os tratamentos empregados. Os valores registrados foram maiores que 0,6 mg L<sup>-1</sup>, concentração maior que a máxima aceitável para aquicultura que é de 0,2 mg L<sup>-1</sup> (BOYD; TUCKER, 1998). A presença do perifíton nos tanques de cultivo não foi efetivo para remoção de fósforo reativo, uma vez que não reduziu as concentrações desse composto da água. As concentrações elevadas de ortofosfato levaram às altas de oxigênio dissolvido, uma vez que cargas elevadas desse composto ocasiona aumento da densidade algal (EGNA; BOYD, 1997), a qual é a principal responsável pela produção desse gás durante o período do dia, e depleção do mesmo durante a noite. Corroborando com a presente pesquisa, Cavalcante *et al.* (2011) não constataram diminuição de fosfato na água de tanques de juvenis de tilápia do Nilo quando cultivadas na presença de substratos submersos (garrafas plásticas) para desenvolvimento do perifíton. Enquanto Thompson, Abreu e Wasielesky (2002) constataram redução de 33% desse composto na água de cultivo do camarão *Farfantepenaeus paulensis* quando o biofilme perifítico esteve presente.

#### 4.1.2 Acompanhamento semanal das variáveis de qualidade de água

A concentração de oxigênio dissolvido apresentou um padrão estável nos tanques para os dois tratamentos empregados, sempre acima de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  (FIGURA 6). Entretanto, na oitava semana, a concentração de oxigênio na água dos tanques com adição de substrato apresentou um maior valor, sendo igual a  $10,9 \text{ mg L}^{-1}$ . Essa concentração elevada de oxigênio na água é devido à presença do fitoplâncton tanto na coluna de água como fixa ao substrato, auxiliando na incorporação desse gás na água durante o dia. Viau *et al.* (2016) também detectaram elevada concentração de oxigênio dissolvido ( $7,8$  a  $9,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) quando empregou o tratamento com adição de substrato artificial no cultivo do camarão de água doce *Neocaridina heteropoda heteropoda*.

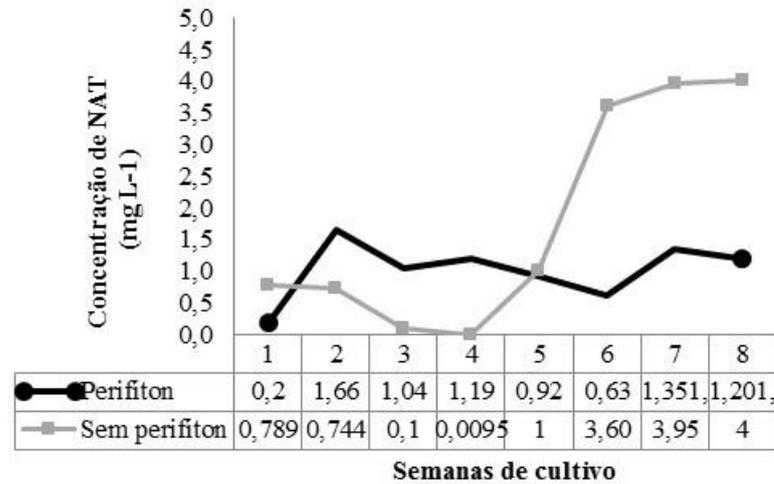
Figura 6 - Concentração de oxigênio dissolvido ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborada pela autora.

A concentração de amônia (FIGURA 7) no decorrer das semanas de cultivo apresentou dois picos máximos nos tanques com perifiton, segunda e sétima semanas.

Figura 7 - Concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborada pela autora.

Na Tabela 7 (PÁGINA 74), pode-se observar que na primeira coleta do perifíton, houve uma quantidade considerável de bactérias nitrificantes, as quais são responsáveis pela redução de NAT a partir da segunda semana. Passado esse período, pode-se observar um padrão estável na concentração desse composto, não sendo detectadas grandes oscilações. No entanto, na sétima semana houve um pico com concentração de  $1,35 \text{ mg L}^{-1}$ , o qual pode ser explicado pelo menor valor do Número Mais Provável (NMP) para as bactérias nitrificantes. Na última semana pode-se observar uma queda na concentração de NAT coincidindo com o aumento do NMP das nitrificantes.

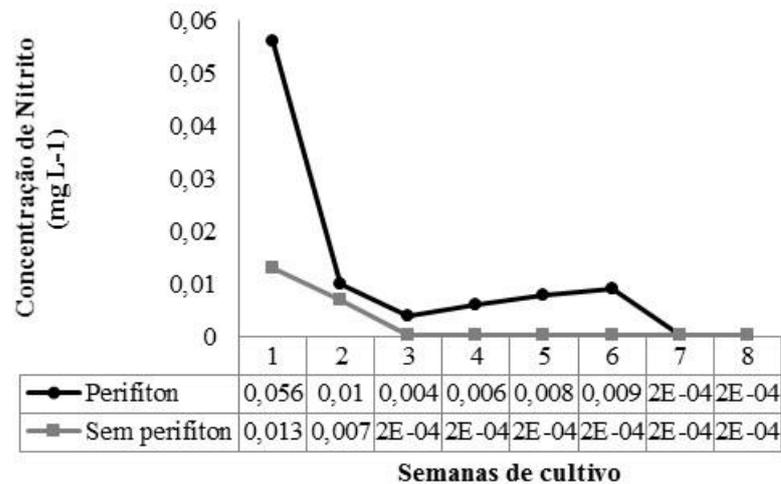
Nos tanques sem perifíton houve um padrão de aumento de NAT a partir da quarta semana, alcançando valores máximos na penúltima semana, sendo igual a  $3,95 \text{ mg L}^{-1}$ .

A presença de substrato nos tanques de cultivo de tilápia proporcionou menores concentrações de nitrogênio amoniacal total (NAT) e uma maior estabilidade desse composto, uma vez que não houve grandes variações. Ao contrário do que ocorreu com os tanques sem substrato artificial, onde os valores de NAT iniciaram baixos, mas no decorrer dos dias de cultivo, onde se tem cada vez mais a entrada de matéria orgânica por meio da oferta de ração, houve incremento desse composto na água.

A concentração de nitrito (FIGURA 8) nos tanques com perifíton alcançou valor máximo na primeira semana, seguido de uma diminuição acentuada. Essa queda coincidiu com a diminuição da concentração de NAT (FIGURA 7), demonstrando a ação das bactérias nitrificantes. Nos tanques sem substrato, a concentração de nitrito não variou, mantendo-se estável a partir da terceira semana até o fim do cultivo. Os elevados valores de nitrito nos

tanques de cultivo com perífiton demonstram a presença e a contínua atividade dos grupos nitrificantes no biofilme.

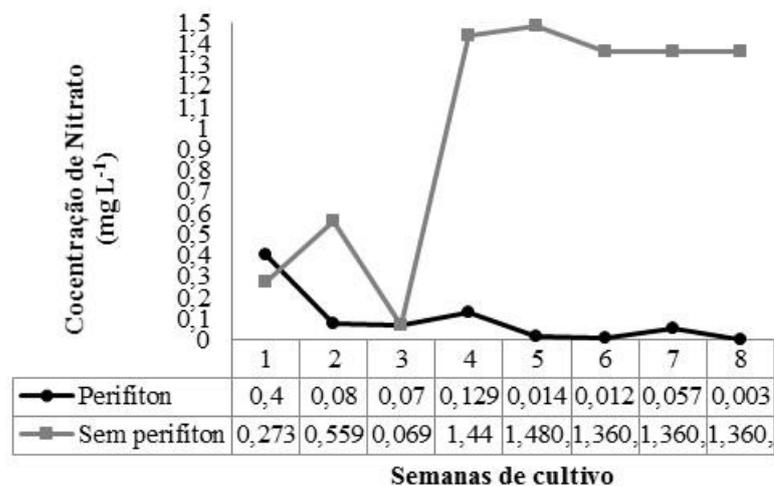
Figura 8 - Concentração de nitrito ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia.



Fonte: elaborada pela autora.

A concentração de nitrato na água dos tanques com perífiton (FIGURA 9) apresentaram baixos valores em comparação com a água do tratamento sem substrato. Sustentando a ideia de que o processo de nitrificação foi realizado completamente, havendo a transformação da amônia para nitrito, por meio do grupo das *Nitrossomonas*, e nitrito para nitrato, pelas *Nitrobacter* (SINHA; ANNACHHATRE, 2007).

Figura 9 - Concentração de nitrato ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.



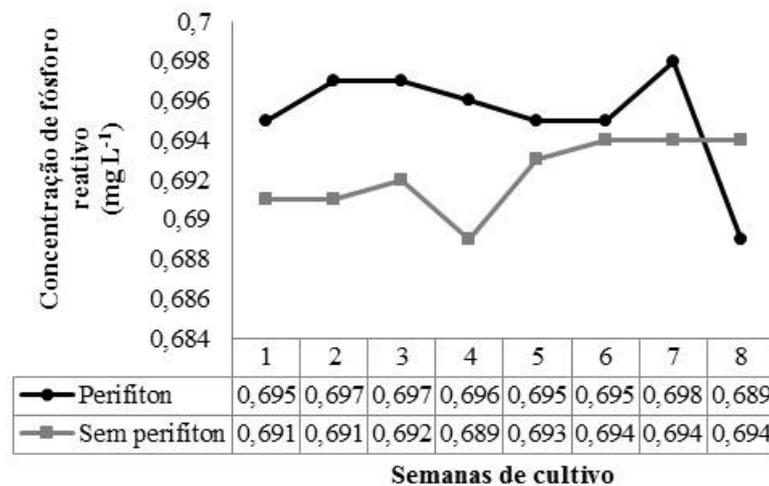
Fonte: elaborada pela autora.

No caso dos tanques com perífiton, pode ter ocorrido o consumo de nitrato pela

comunidade fitoplanctônica presente na coluna de água e aderidas ao substrato (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011), e transformação bacteriana, convertendo nitrato em nitrogênio molecular. Pelo menos duas vias de transformação bacteriana do nitrato são possíveis, ocorrendo por anaerobiose através da desnitrificação (ESTEVES, 1998), ou por meio da nitrificação heterotrófica associada a desnitrificação aeróbia simultaneamente (VELUSAMY; KRISHNANI, 2013; FAN *et al.*, 2015), realizada por alguns grupos bacterianos heterotróficos. Esses micro-organismos transformam simultaneamente amônia em nitrato, e nitrato em nitrogênio molecular de forma aeróbia. Isso é a explicação para as baixas concentrações de nitrato na água durante o período experimental.

A concentração de fósforo nos tanques com substrato artificial manteve-se estável durante seis semanas de cultivo, apresentando um pico na sétima semana com posterior queda na última semana. Já nos tanques sem substrato, pode-se observar uma diminuição na quarta semana, com posterior aumento e estabilidade até o final do cultivo, como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Concentração de fósforo reativo ao longo das semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborado pela autora.

Na presente pesquisa a principal fonte de fósforo foi o alimento artificial ofertado aos peixes. De acordo com Lazzari e Baldisserotto (2008) os peixes incorporam apenas 20% de fósforo da ração e convertem em biomassa, e cerca de 69 a 86% é excretado na água. Anand *et al.* (2013b) afirmaram que as algas perifíticas presentes nos substratos utilizam o fosfato, fazendo com que haja diminuição desse nutriente na coluna de água. No entanto, não foi possível observar isso na presente pesquisa

### 4.1.3 Desempenho zootécnico

A adição de substrato artificial, utilizado como indutor do desenvolvimento de biofilme perifítico, nos tanques de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo influenciou positivamente o crescimento dos peixes, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia do Nilo cultivados na presença e ausência de biofilme perifítico.

Variável	Perifiton		p valor
	Ausente	Presente	
<b>Sobrevivência (%)</b>	97 ± 7,47	97 ± 7,47 <sup>4</sup>	0,995
<b>Peso corporal inicial (g)</b>	0,89 ± 0,18	1,2 ± 0,37	0,126
<b>Peso corporal final (g)</b>	15,74 ± 2,09 <b>b</b>	38,48 ± 2,49 <b>a</b> <sup>5</sup>	<0,01
<b>Comprimento final (cm)</b>	9,76 ± 0,29 <b>b</b>	10,37 ± 0,32 <b>a</b>	<0,05
<b><sup>1</sup>TCE (% dia<sup>-1</sup>)</b>	4,9 ± 0,36 <b>b</b>	5,53 ± 0,35 <b>a</b>	<0,01
<b>Produtividade (g m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>)</b>	6,28 ± 0,83 <b>b</b>	15,39 ± 0,99 <b>a</b>	<0,01
<b><sup>2</sup>FCA</b>	1,32 ± 0,16 <b>b</b>	0,80 ± 0,05 <b>a</b>	<0,01
<b><sup>3</sup>TEP</b>	1,74 ± 0,19 <b>b</b>	2,86 ± 0,20 <b>a</b>	<0,01
<b>Índice de Uniformidade (%)</b>	75,04 ± 10,27	71,22 ± 7,04	0,767

Fonte: elaborada pela autora.

<sup>1</sup>Taxa de crescimento específico (TCE) = [(Ln peso final - Ln peso inicial)/dias de cultivo] x 100; <sup>2</sup> Fator de conversão alimentar aparente(FCA) = ração ofertada (g)/ganho em peso corporal (g); <sup>3</sup> Taxa de eficiência proteica (TEP) = ganho em peso (g)/proteína consumida (g); <sup>4</sup>Para cada variável, letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p<0,05); <sup>5</sup>Ausência de letras representa falta de significância estatística (ns;p>0,05).

A sobrevivência dos peixes não foi afetada pelos tratamentos empregados, não havendo diferença significativa entre os mesmos (p>0,05), os quais apresentaram resultados superiores a 90%. Resultado semelhante foi observado por Asaduzzman *et al.* (2009b), enquanto Uddin *et al.* (2009) encontraram valores inferiores, com taxa de sobrevivência de

76% em cultivo de tilápia, com adição de substratos mais oferta de alimento artificial.

Os juvenis de tilápia foram adicionados aos tanques com peso corporal inicial, em média, igual a 1,0 g ( $p > 0,05$ ). Ao final do período experimental, as tilápias cultivadas na presença de perifíton apresentaram peso corporal final maior que os juvenis cultivados sem perifíton ( $p < 0,01$ ). Resultados semelhantes também foram encontrados nos trabalhos de Sakr *et al.* (2015) e Uddin *et al.* (2007). Esse efeito positivo do perifíton sobre o peso final dos peixes demonstra que a matéria orgânica particulada (bactéria fixadas, microalgas, protozoários, *etc*) aderida ao substrato contribuiu para o crescimento dos organismos confinados (ARNOLD *et al.* 2006), sendo considerado uma fonte suplementar de alimento natural (UDDIN *et al.*, 2009).

Os valores de TCE e de TEP foram maiores nas tilápias confinadas nos tanques com a presença de perifíton, enquanto o FCA foi menor, havendo diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos. A adição de substrato aos tanques influencia diretamente o desempenho e a eficiência da conversão dos nutrientes (SAKR *et al.* 2015), havendo maior aproveitamento alimentar refletindo diretamente no desempenho dos peixes. Os microorganismos presentes nos tanques de cultivo convertem o nitrogênio inorgânico presente na água e disponibilizam aos peixes na forma de proteína microbiana, aumentando a conversão proteica de 20-25% para 45%. Alguns estudos sugerem que a ingestão do perifíton aumenta a atividade de enzimas intestinais, suplementando maior quantidade de proteína disponível para os peixes (MRIDULA *et al.*, 2005).

A ideia da redução da oferta de ração em sistemas de cultivo com adição de substrato indutor de perifíton foi comprovada na presente pesquisa, uma vez que valores de FCA menores que 1 foram obtidos aliados a taxas de crescimento acima da média no experimento controle.

Na análise de produtividade, uma das variáveis de maior interesse para os aquicultores, foi significativamente ( $p < 0,01$ ) maior nos tanques com perifíton. Mostrando a eficiência da adição de substratos aos tanques, os quais fornecem fonte extra de alimento para os peixes. Uddin *et al.* (2009) obtiveram melhores resultados de produtividade quando aliaram oferta de alimento artificial mais presença de substrato no cultivo de tilápia. Alcançaram uma produtividade 59% maior em relação a produtividade dos demais tratamentos, os quais não adicionaram substratos para crescimento de perifíton.

Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para o índice de uniformidade dos peixes entre os tratamentos empregados, o qual apresentou valores acima de 70%. Isso comprova que a adição das placas de pvc não influenciou de forma negativa o desempenho

zootécnico das tilápias, ao contrário, beneficiou provavelmente a redução da competição entre os animais por alimento (MARQUES *et al.*, 2003), contribuindo para o crescimento uniforme.

As tilápias apresentaram comprimento maior quando cultivadas na presença de perifíton, sendo significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do tratamento sem perifíton. Então, a presença de alimento natural extra nos tanques proporcionou maior ganho em peso e em comprimento das tilápias. Milstein, Peretz e Harpaz (2009) concluíram que a aquicultura baseada em perifíton é uma tecnologia apropriada para a redução de custos, permitindo uma produção economicamente viável de tilápia orgânica.

#### ***4.1.4 Acompanhamento do plâncton presente no Perifíton***

Na Tabela 6 estão os principais gêneros e/ou espécies de fitoplâncton e zooplâncton identificadas no perifíton durante as coletas. Foi possível identificar 4 grupos pertencentes ao fitoplâncton (Chlorophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae e Bacillariophyceae) e ao zooplâncton (Protozoa, Rotifera, Gastrotricha e Crustacea).

Tabela 6 - Identificação qualitativa das principais famílias e respectivas espécies de plâncton identificadas no perifíton presente no cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.

Fitoplâncton	Períodos de coletas			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
<b>Chlorophyceae</b>				
<i>Coelastrum proboscideum</i>	x			
<i>Coelastrum</i> sp.			x	
<i>Chlorococcales</i>	x	x		x
<i>Chlorella</i> sp.			x	x
<i>Desmodesmus sempervirens</i>	x	x	x	
<i>Desmodesmus</i> sp.	x	x	x	x
<i>Golenkinia radiata</i>	x	x	x	x
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	x			
<i>Scenedesmus</i> sp.			x	x
<i>Coelastrum reticulatum</i>		x		
<i>Oedeogonium</i> sp.		x		x
<b>Cyanophyceae</b>				
<i>Leptolyngbya</i> sp.	x	x		
<i>Nostoc</i> sp.	x	x		
<i>Phormidium</i> sp.	x			x
<i>Calothrix</i> sp.		x		x
<i>Oscillatoria</i> sp.				x
<b>Euglenophyceae</b>				
<i>Euglena</i> sp.		x		
<b>Bacillariophyceae</b>				
<i>Chaetoceros</i> sp.			x	
<i>Navicula</i> sp.				x
<b>Zooplâncton</b>				
<b>Protozoa</b>				
<i>Coleps</i> sp.	x			
Ciliado não identificado	x	x		
Flagelado não identificado	x	x		
Heliozoário não identificado	x			
<i>Vorticella</i> sp.	x	x		
<b>Rotifera</b>				
<i>Philodina</i> sp.	x	x		
<i>Brachionus</i> sp.			x	x
<b>Gastrotricha</b>				
Gastrotríquio não identificado	x			
<b>Crustacea</b>				
Copepóde não identificado				x

Fonte: elaborada pela autora.

Corroborando com os resultados encontrados, Asaduzzaman *et al.* (2009a) identificaram 4 grupos de fitoplâncton (Chlorophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae e Bacillariophyceae) presentes no perifíton durante o cultivo de tilápia do Nilo na presença de substrato. Enquanto o zooplâncton, esses autores encontraram apenas 2 grupos (Rotifera e Crustacea). Sakr *et al.* (2015) identificaram 5 famílias pertencentes ao fitoplâncton, desse total apenas 1 grupo foi diferente do presente trabalho que foi Dinophyceae. Pandey, Laxmi e Kumar (2014) avaliando a formação de biofilme em diferentes substratos encontraram a dominância de apenas dois grupos de fitoplâncton, Bacillariophyceae e Chlorophyceae.

Foi possível observar sucessão de algumas espécies de plâncton ao longo das

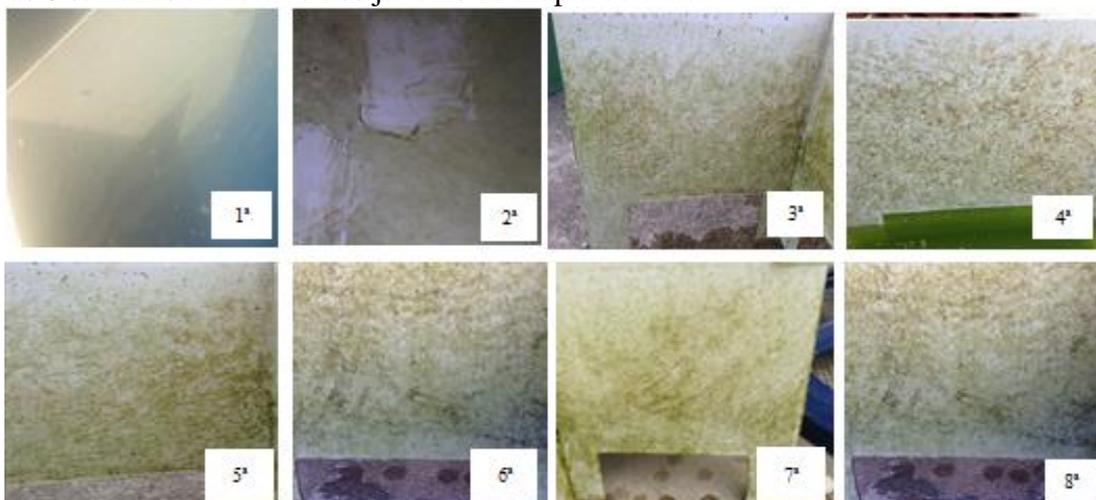
coletas. Na 1ª coleta, a qual ocorreu 10 dias após o início do cultivo, não foi identificada a presença da família Euglenophyceae, a qual só apareceu na 2ª coleta, já os representantes da família Bacillariophyceae passaram a ocorrer na terceira e quarta coleta. Pode-se observar a importância do grupo das clorofíceas e cianofíceas na colonização inicial do perifíton, uma vez que foram os primeiros grupos a se instalarem no substrato.

No zooplâncton a família Gastrotricha só apareceu na 1ª coleta, e Crustacea na última. A diferenciação do plâncton no perifíton ao longo do cultivo pode ser explicada pela sucessão que pode ocorrer por diferentes fatores, seja abiótico ou biótico (CAVATI; FERNANDES, 2008). De acordo com Zorzal-Almeida e Fernandes (2014) a predação dos peixes na comunidade perifítica causa diminuição na densidade total e alteração na composição e renovação da comunidade.

De acordo com Monroy-Dosta *et al.* (2013) a identificação dos principais grupos de microalgas, ciliados e rotíferos ao longo do período experimental permite reconhecer a contribuição dos mesmos como fonte de alimento natural para dieta de peixes e camarões.

Na Figura 11 tem-se o acompanhamento do perifíton formado espontaneamente sobre o substrato artificial adicionado nos tanques do cultivo de tilápia do Nilo durante as 8 semanas de cultivo, através de registro fotográfico.

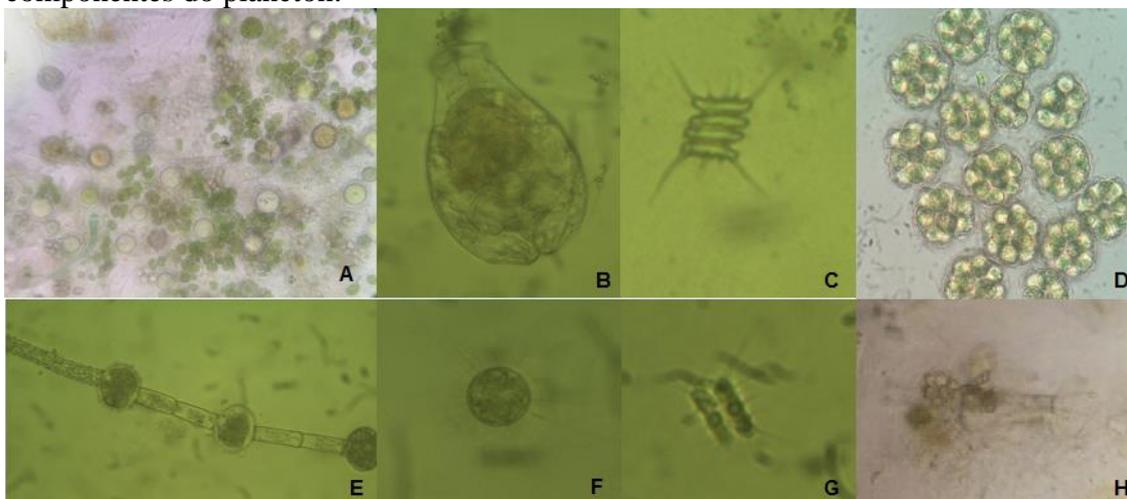
Figura 11 - Acompanhamento visual do perifíton formado espontaneamente durante as 8 semanas de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborada pela autora.

A imagem microscópica de alguns micro-organismos identificados no perifíton espontâneo encontra-se na Figura 12.

Figura 12 - Imagens de microscopia optica do perifíton espontâneo e alguns componentes do plâncton.



Fonte: elaborada pela autora.

(A) imagem do perifíton; (B) Rotífero (*Brachionus* sp); (C) *Scenedesmus* sp.; (D) *Coelastrum* sp. (E) *Odeogonium* sp. (F) *Golenkina radiata* (G) (H) Copepóde.

#### 4.1.5 Quantificação dos grupos microbianos do perifíton espontâneo

Na Tabela 7 têm-se os resultados da quantificação pela técnica de contagem padrão em placas dos principais grupos bacterianos estudados. Pode-se observar uma quantidade expressiva de unidades formadoras de colônias para o grupo das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) no período inicial de cultivo ( $425,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Tabela 7 - Quantificação dos grupos de bactérias heterotróficas cultiváveis totais (BHC), *Aeromonas* spp, fixadoras de nitrogênio, nitrificantes, desnitrificantes e de fungos presentes no perifíton oriundo do cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Grupos	Unidade	Coletas			
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
<b>BHC</b>	UFC mL <sup>-1</sup>	$425,0 \times 10^3$	$88,0 \times 10^3$	$250,0 \times 10^3$ est	$800,0 \times 10^3$
<b><i>Aeromonas</i> sp.</b>	UFC mL <sup>-1</sup>	$9,5 \times 10^3$	60 est	35 est	<10 est
<b>Fungos</b>	UFC mL <sup>-1</sup>	420,0	$135,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
<b>Fixadoras de N<sub>2</sub></b>	NMP mL <sup>-1</sup>	11	240	<1,8	<1,8
<b>Nitrificantes</b>	NMP mL <sup>-1</sup>	$13,0 \times 10^2$	79,0	38,0	470,0
<b>Desnitrificantes</b>	NMP mL <sup>-1</sup>	<1,8	<1,8	<1,8	<1,8

Fonte: elaborado pela autora.

Ocorrendo uma diminuição na segunda coleta ( $88,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>), voltando a aumentar na terceira e última coleta, sendo igual a  $250,0 \times 10^3$ est e  $800,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Esse incremento de BHC ao longo do cultivo é um aspecto importante e

relevante para o cultivo de tilápia, uma vez que esse grupo bacteriano possui rápido crescimento, sendo uma importante fonte de nutrientes para espécies omnívoras (MCGRAW, 2002). De acordo com Asaduzzman *et al.*, (2009a) a carga elevada de BHC leva ao aumento da decomposição da matéria orgânica, contribuindo para a liberação de nutrientes inorgânicos que estimulam o desenvolvimento bacteriano. Com isso, pode-se observar um efeito positivo na qualidade de água do cultivo, além de fonte extra de alimento proteico para os organismos cultivados. Esses mesmos autores quantificaram valores de BHC igual a  $3,06 \times 10^7$  UFC/g. Anand *et al.* (2013b) detectaram aumento gradual da concentração de BHC no perifíton ao longo do período experimental.

A quantificação do grupo das *Aeromonas* declinou com o passar dos dias de cultivo (TABELA 7) apresentando valor inicial de  $9,5 \times 10^3$  e  $<10$  est UFC mL<sup>-1</sup> no último período de coleta. A diminuição desse grupo bacteriano no biofilme é vantajosa para o cultivo de tilápias, uma vez que essas bactérias são reconhecidas por abrigarem diversas espécies potencialmente virulentas (HU *et al.*, 2012), causadoras de diversos quadros infecciosos. A presença de biofilme perifítico em ambientes de cultivo reduz a ocorrência de patógenos (THOMPSON; ABREU; WASIELESKY, 2002), sendo comprovado na presente pesquisa.

A presença de fungos no perifíton aumentou até a segunda coleta, alcançando valor de  $135,0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> (TABELA 7). Após esse período as contagens foram diminuindo até o fim do cultivo, sendo igual a  $1,3 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> (TABELA 7). De acordo com Tant *et al.* (2015), os fungos aquáticos são importantes no processamento da matéria orgânica, influenciando na via de transformação e conversão de frações da matéria orgânica particulada em dissolvida. Anand *et al.* (2014a) observaram incremento de fungos no bioflocos durante cultivo do camarão *Penaeus monodon*, onde a contagem inicial foi igual a  $1,33 \times 10^2$  UFC/mL e a final foi  $526,67 \times 10^2$  UFC/mL. Uma das explicações prováveis para a diminuição de fungos no perifíton pode ser a diminuição de oxigênio no biofilme, uma vez que esse grupo microbiano tem exigência por elevados teores de oxigênio. Diferente no cultivo com bioflocos que se tem aeração contínua por 24h.

Pode-se observar uma diminuição, ao longo dos dias de cultivo, da concentração de bactérias nitrificantes, em contraste da BHC. As bactérias heterotróficas apresentam taxas de crescimento e produção de biomassa bacteriana 10 vezes mais do que aquelas do grupo das bactérias nitrificantes (FURTADO; POERSCH; WASIELESKY, 2015). Esse padrão de competição no ambiente faz com que as BHCs estejam em maior abundância e, portanto, sejam dominantes no microambiente tanto no consumo de nutrientes como na ocupação de espaços. Dessa forma, a adição de substrato para desenvolvimento de perifíton estimula o

crescimento das bactérias nitrificantes por disponibilizar uma maior área e matéria orgânica fixa. A importância da adição de substratos nos viveiros, a fim de estimular o crescimento de bactérias nitrificantes já foi afirmada por diversos autores (ASADUZZAMAN *et al.*, 2010; FURTADO; POERSCH; WASIELESKY, 2015).

As bactérias fixadoras de nitrogênio apresentaram maiores valores na primeira e segunda coleta. A atividade dessas bactérias contribuiu para o incremento dos níveis de amônia na água dos tanques de cultivo.

O grupo das bactérias nitrificantes, responsáveis pela oxidação da amônia em nitrito, e posteriormente nitrito a nitrato (PEREIRA; MERCANTE, 2005) apresentou um elevado valor na primeira coleta, sendo igual a  $13,0 \times 10^2$  NMP/mL, diminuindo na 2ª e 3ª coletas, voltando a aumentar no último período de amostragem para 470 NMP/mL. Observando a figura 7, o aumento da biomassa de nitrificantes inicial (1ª coleta) coincidiu com a diminuição da concentração desse composto na água no mesmo período. Esse resultado é um indicativo da presença dos dois principais grupos responsáveis pelo processo da nitrificação, *Nitrossomonas* e *Nitrobacter*, ou pela ação de bactérias nitrificantes heterotróficas presentes no biofilme.

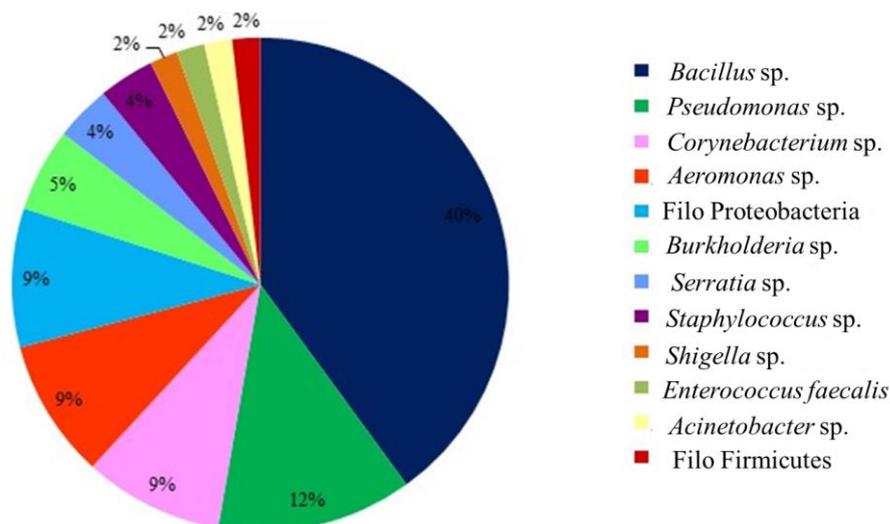
Os valores de NMP para as bactérias desnitrificantes foram constantes, sendo  $<1,8$  NMP/mL durante todo o período de cultivo (TABELA 7). Uma vez que esse grupo bacteriano transforma nitrito ou nitrato em nitrogênio molecular na ausência de oxigênio, pode-se afirmar que a estrutura do biofilme perifítico apresentou-se bem oxigenada, o que dificultou o crescimento mais evidente desse grupo.

A partir do isolamento e caracterização dos micro-organismos presentes no perifíton, pode-se observar a contribuição que o mesmo exerce na alimentação dos peixes cultivados, servindo como fonte de alimento natural.

#### ***4.1.6 Identificação dos grupos bacterianos do perifíton espontâneo***

No gráfico 1 estão dispostos os percentuais dos principais grupos bacterianos identificados a partir de isolamentos dos meios de cultivo para BHCs.

Gráfico 1 - Percentual de grupos bacterianos isolados do perifíton formado espontaneamente na superfície dos substratos submersos durante cultivo de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborado pela autora.

No total, 76 estirpes foram isoladas, sendo que 21 mostraram características de estarem no estado de “viáveis mas não cultiváveis” (VBNC- Viable But Nonculturable), e por isso não foram identificadas fenotipicamente.

De acordo com Oliver (2005), no estado de VBNC, as bactérias não são capazes de crescer nos meios de cultura bacteriológicos rotineiramente utilizados, no entanto, a atividade metabólica permanece ativa, mesmo que em baixos níveis. E de acordo com esse mesmo autor, as bactérias entram nesse estado em resposta a algum fator de estresse natural, como exposição a diferentes faixas de temperatura ou de oxigênio considerado ideal ao crescimento.

As Bactérias Heterotrófica Cultiváveis foram agrupadas em três filos, Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, sendo identificado as seguintes linhagens bacterianas: *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Burkholderia* sp., *Serratia*, *Staphylococcus* sp., *Shigella*, *Acinetobacter*, Filo Proteobacteria, Filo Firmicutes e a espécie *Enterococcus faecalis*.

O gênero *Bacillus* foi o grupo que teve um maior percentual de isolamento representando 40% do total, seguido por *Pseudomonas* sp. (13%), *Corynebacterium*, *Aeromonas* e o Filo Proteobacteria com 9%, e *Burkholderia* sp. apresentou 5%. Enquanto, *Serratia* e *Staphylococcus* representaram 4%. Os grupos com menor percentual foram *Shigella*, *Acinetobacter*, *Enterococcus faecalis* e o Filo Firmicutes com 2% cada.

Semelhante ao encontrado na presente pesquisa, Shilta *et al.* (2016) observaram

dominância do gênero *Bacillus* seguido por *Pseudomonas* e *Micrococcus* no perifíton durante o cultivo da espécie de peixe *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790), independente do tipo de substrato utilizado (artificial ou natural). Já Silva *et al.* (2016) encontraram maior predominância no biofilme do gênero *Pseudomonas* sp. acompanhado por *Bacillus* sp. e *Micrococcus* ao fim do cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.

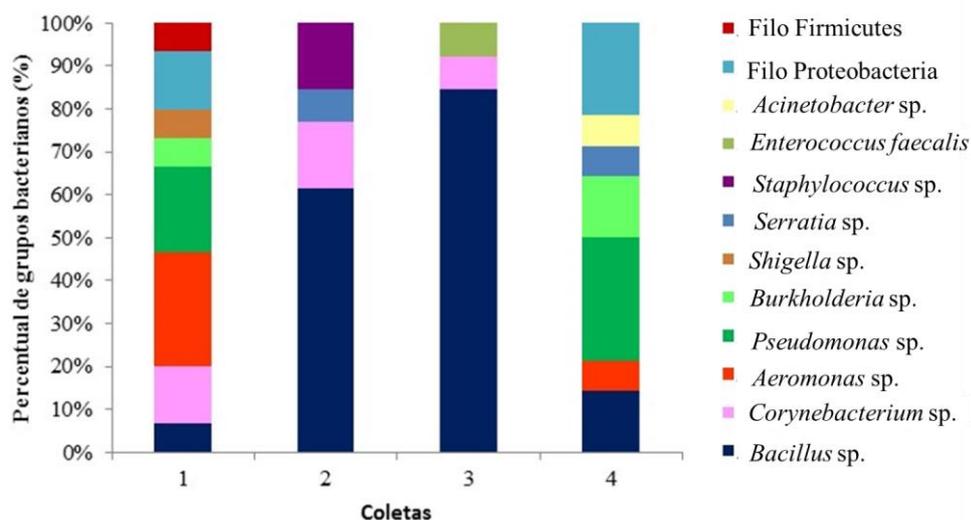
Enquanto Diringer *et al.* (2010) ao cultivar a espécie de camarão *Litopenaeus vannamei* na presença de substrato submerso para o desenvolvimento do biofilme, encontraram uma composição da microbiota diferenciada, onde o perifíton espontâneo foi composto por bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* (41%), apresentando o maior percentual de isolamento, seguido por *Shewanella* (16%), *Staphylococcus* (10%), *Pseudomonas* (5%), *Bacillus* (3%), *Enterococcus* (3%) e outros com menor percentual de isolamento.

Yu *et al.* (2016) encontraram maior abundância do Filo Proteobacteria no substrato artificial durante cultivo da carpa capim a medida que aumentou a relação C:N da água, no entanto a proporção do Filo Firmicutes e Nitrospirae diminuiu.

Essa diferenciação na microbiota do perifíton no cultivo de peixe e de camarão pode ser explicada pela especificidade da microbiota nos ambientes. A microbiota de um ambiente aquático salino será diferente de um ambiente aquático dulcícola ainda mais quando não é uma água natural (WONG; RAWLS, 2012). A água utilizada no cultivo de tilápias em nossa pesquisa foi originária do sistema de abastecimento público, tendo sido submetida a processos para redução da carga microbiana.

O percentual de representatividade das cepas isoladas ao longo do cultivo (por coleta) das BHCs pode ser visualizado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Percentual dos grupos bacterianos de BHC isolados do perifíton espontâneo ao longo do tempo do cultivo de tilápias.



Fonte: elaborado pela autora.

A primeira coleta apresentou uma maior diversidade de grupos bacterianos, apresentando predominância de alguns em detrimento de outros, como foi o caso da *Aeromonas* que apresentou uma frequência de isolamento de 27%, seguida pelas *Pseudomonas* sp. com 20%, *Corynebacterium* e Filo Proteobacteria com 13%. Enquanto *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Shigella* e o Filo Firmicutes representaram 7%.

Alguns autores sugerem que a diversidade bacteriana durante a formação inicial do biofilme é mais elevada tendendo a diminuir à medida que o biofilme progride como resultado dos efeitos combinados de disponibilidade de nicho e competição (JACKSON; CHURCHILL; RODEN, 2001).

Na segunda e terceira coleta houve uma diminuição na abundância dos grupos bacterianos, tendo uma predominância de *Bacillus* sp. com mais de 60%, acompanhado da presença de *Corynebacterium* nos dois períodos. *Staphylococcus* e *Serratia* foram encontradas na segunda coleta, enquanto a espécie *Enterococcus faecalis* esteve presente somente na terceira coleta.

Durante a formação do biofilme pode haver mudanças dos grupos funcionais bacterianos crescidos no substrato, havendo diminuição de grupos estabelecidos inicialmente, seja pela disponibilidade ou escassez de um determinado nutriente, além disso, segundo Jackson, Churchill e Roden (2001) as populações bacterianas podem simplificar-se quando competidores superiores passam a dominar.

Na última coleta houve um reestabelecimento do número de linhagens bacterianas, observando uma maior abundância do gênero *Pseudomonas* acompanhado pelo Filo Proteobacteria. Nesse período foi encontrado o grupo *Acinetobacter*.

De acordo com Jackson, Churchill e Roden (2001) à medida que o biofilme amadurece, o número de microhabitats podem aumentar (por exemplo, a partir da formação de bolsas anaeróbicas dentro do biofilme), apoiando um maior número de populações bacterianas, as quais passam a utilizar recursos diferentes e habitar em diferentes regiões.

O gênero *Aeromonas* é formado por diversas espécies potencialmente patogênicas para animais aquáticos e terrestres, bem como para os seres humanos. Podem causar grandes perdas econômicas quando se instalam em cultivos de organismos aquáticos (HU *et al.*, 2012).

*Staphylococcus*, *E. faecalis* e *Corynebacterium* são bactérias Gram positivas presentes naturalmente na microbiota humana (KAUSHAL; GUPTA; VAN HOEK, 2016; RIBOLDI *et al.*, 2009). São patógenos oportunistas, apresentando algumas espécies com potencial de causar enfermidades em humanos imunocomprometidos e em peixes (AUSTIN; AUSTIN, 2007; CARVALHO; BELÉM-COSTA, PORTO, 2015; BIAVASCO *et al.*, 2007). A espécie *E. faecalis*, no entanto, está sendo utilizada como probiótico em cultivos de peixes (ALLAMEH *et al.*, 2015; RODRIGUEZ-ESTRADA *et al.*, 2009).

O gênero *Bacillus* foi encontrado em todos os períodos de coleta, estando presente no perifíton desde o início até o fim do cultivo dos peixes. Isso pode ser explicado pela capacidade que esse grupo tem de se adaptar a condições ambientais adversas, por causa da constituição da parede celular e da capacidade em formar endósporo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2002; NAYAK, 2010). É um dos grupos bacterianos mais utilizados como probióticos na aquicultura, agindo como promotores de crescimento através da melhoria do desempenho zootécnico, com produção de enzimas extracelulares, como celulasas, proteases e amilases que desempenham importância nutricional para diversas espécies cultivadas, além da produção de diferentes substâncias imunoestimulantes e antimicrobianas, com efeito inibitório a diversos patógenos causadores de enfermidades na aquicultura (ALY; MOHAMED; JOHN, 2008; DUTTA; GOSH, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2016; NAKANDAKARE *et al.*, 2013; DHANALAKSHMI; RAMASUBRAMANIAN, 2017).

Pode-se observar que quando o gênero *Bacillus* esteve em maior abundância não foi possível observar a presença de *Aeromonas*, grupo composto por diversas espécies patogênicas aos peixes, podendo inferir sobre a possível capacidade de inibição dos *Bacillus* sobre esse grupo. Diversas espécies desse gênero possuem capacidade de produção de

diferentes bacteriocinas (SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005), substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de bactérias patogênicas.

Monroy-Dosta *et al.* (2013), observaram que o incremento de bactérias heterotróficas no biofilme durante cultivo de tilápia possivelmente impediram a proliferação dos gêneros patogênicos *Aeromonas* e *Vibrio*.

A presença de *Acinetobacter* no último período de coleta, ou seja, já no fim do cultivo, pode estar relacionada com o maior teor de nutrientes na água, uma vez que foi demonstrado que a presença desse grupo em biofilmes está relacionada à abundância e disponibilidade de substratos ricos em fontes de carbono, os quais favorecem seu crescimento. Esse grupo bacteriano também foi encontrado em maior abundância no biofilme do que na água de cultivo de juvenis de carpa capim (YU *et al.*, 2016).

As linhagens *Shigella* e *Serratia* pertencem à família Enterobacteriaceae. Estão distribuídas em diversos nichos ambientais e podem ser isoladas da mucosa ou do conteúdo intestinal de peixes, ocorrendo de forma transitória nesses organismos aquáticos, não causando infecções verdadeiras (GAUTHIER, 2015). No entanto, merece atenção à presença desse grupo no perifíton por incluírem vários gêneros com potencial zoonótico (LOWRY; SMITH, 2007), o qual pode ocasionar enfermidades aos humanos que consumirem o peixe que não for processado corretamente.

Já foi constatado em diversos estudos que a presença de perifíton durante o cultivo de peixes e camarões incrementa a taxa de crescimento e atividade das enzimas digestivas, além da melhoria do sistema imune e efeito probiótico (ANAND *et al.*, 2013a; KUMAR *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2016).

Os complexos microbianos crescidos no substrato funcionam como suplemento dietético para os organismos aquático. Por isso a importância do melhor entendimento e caracterização da estrutura da comunidade microbiana nos substratos, a fim de determinar que bactérias podem ser utilizadas como possíveis candidatas a probióticos em cultivos de tilápia. Uma vez que foi identificada no perifíton espontâneo a presença de alguns grupos bacterianos que podem trazer enfermidades aos peixes cultivados.

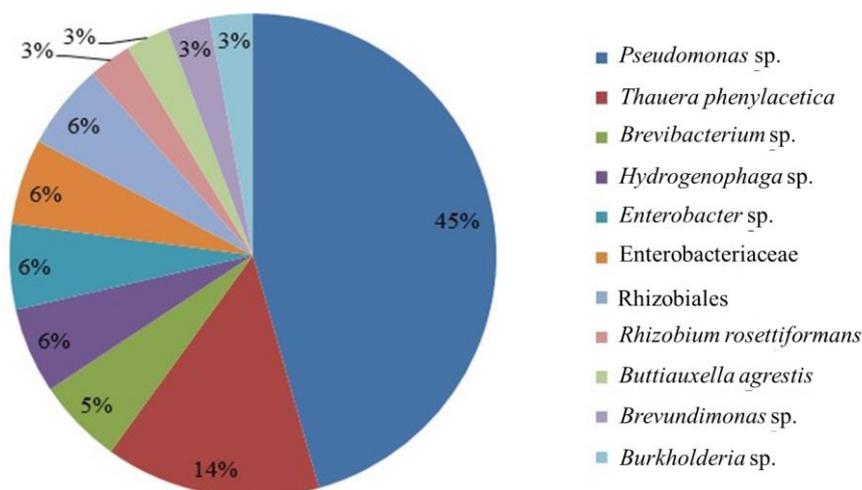
As bactérias identificadas na presente pesquisa estão distribuídas em dois filos, Proteobacteria e Actinobacteria. O filo Proteobacteria teve o maior número de representantes, ocorrendo nas classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria.

Essas classes do filo Proteobacteria abrigam diversas espécies bacterianas responsáveis pelos processos de nitrificação e desnitrificação (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os principais grupos bacterianos identificados do meio utilizado para isolamento

das nitrificantes estão representados no gráfico 3, sendo identificadas as seguintes linhagens: *Thauera phenylacetica*, *Rhizobium rosettiformans*, *Buttiauxella agrestis*, *Pseudomonas* sp., *Brevundimonas* sp., *Burkholderia* sp., *Hydrogenophaga* sp., *Enterobacter* sp., Família Enterobacteriaceae e a ordem Rhizobiales.

Gráfico 3 - Percentual de grupos bacterianos isolados do meio de cultura seletivo para nitrificantes.

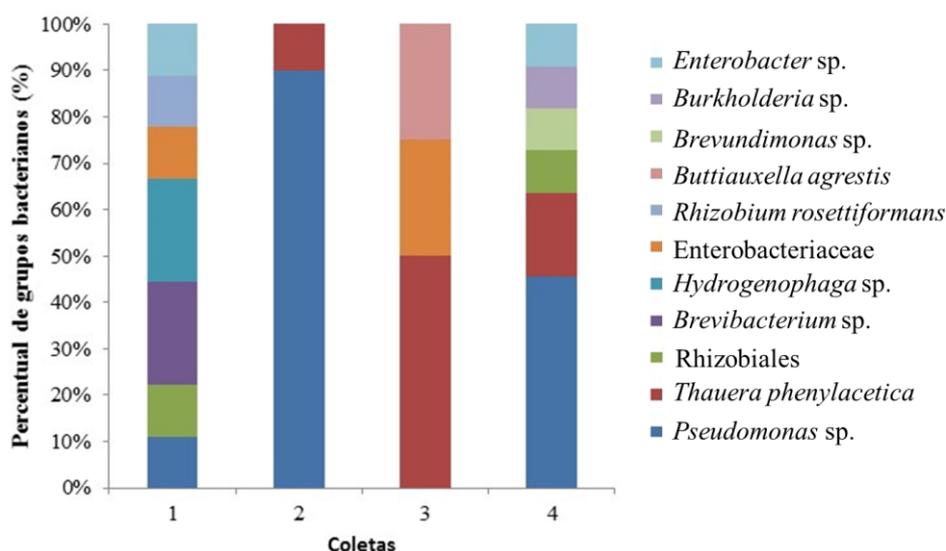


Fonte: elaborado pela autora.

As bactérias mais abundantes foram pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. predominando em 45% dos isolados, seguido pela espécie *Thauera phenylacetica* com 14%. Os gêneros *Hydrogenophaga* sp. e *Enterobacter* sp. representaram 6% cada, assim como a família Enterobacteriaceae e a ordem Rhizobiales. Já *Brevibacterium* sp. foi encontrada em 5% dos isolados. E as linhagens menos representativas com 3% foram: *Rhizobium rosettiformans*, *Buttiauxella agrestis*, *Brevundimonas* sp. e *Burkholderia* sp.

No Gráfico 4 estão ilustrados os percentuais de representatividade das cepas isoladas por coleta das nitrificantes.

Gráfico 4 - Frequência de isolamento dos grupos bacterianos nitrificantes a partir da formação espontânea de perifíton ao longo do cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: elaborado pela autora.

O desenvolvimento do biofilme das bactérias nitrificantes seguiu o mesmo padrão das BHC, estando de acordo com Jackson, Churchill e Roden (2001) que descreveram três etapas durante o desenvolvimento do biofilme: estágio inicial, caracterizado por colonização de diferentes populações e falta de ordem na estrutura da comunidade; estágio intermediário, caracterizado por um número limitado de populações dominantes utilizando recursos similares; e estágio final ou tardio, caracterizado por um biofilme maduro com estrutura espacial complexa, que facilita maior diversidade através do aumento variação no habitat e recursos disponíveis.

Na primeira coleta pode-se observar que os grupos *Hydrogenophaga* sp. e *Brevibacterium* sp. foram mais abundantes. Seguido pela ordem Rhizobiales juntamente com a espécie *Rhizobium rosettiformans*, família Enterobacteriaceae e seu gênero *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp.

O gênero *Hydrogenophaga* sp. pertence à família Comamonadaceae, são bactérias Gram negativas, quimiorganotróficos ou quimiolitotrófico (SPRING *et al.*, 2004; KAMPFER *et al.*, 2005). Algumas espécies desse grupo foram isoladas de lodos ativados, sendo responsáveis pela remoção de determinados nutrientes, como o fósforo (CHUNG *et al.*, 2007). Li *et al.* (2017) identificaram que a família Comamonadaceae foi um dos grupos mais abundantes em um biofilme crescido sob substrato adicionado em tanques de policultivo de carpa capim e tilápia. Concluíram que o crescimento dessas bactérias pode trazer melhorias na

qualidade de água nos tanques de cultivo. Yu *et al.* (2016) constataram que houve incremento de *Hydrogenophaga* sp. no substrato submerso, durante cultivo de carpa capim, à medida que a relação C/N da água foi aumentada.

As Brevibactérias, segundo grupo com maior abundância na primeira coleta, pertencem ao gênero *Brevibacterium* sp. membros da classe Actinobacteria, são bastonetes Gram positivos, não produzem esporos, sendo quimiorganototróficos. São utilizadas em diversos processos industriais, como produtores de substâncias antimicrobianas, carotenoides e enzimas (ONRAEDT; SOETAERT; VANDAMME, 2005). São relatadas no processo de desnitrificação, sendo isolados de águas marinhas e salobras, além de serem formadoras de biofilme (PREENA *et al.*, 2017; METCALF; EDDY, 1991; LEE, 2003; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010). Além disso, foi constatado a atividade antibiofilme de *Brevibacterium* spp. contra o biofilme formado por *Vibrio*, grupo reconhecido por causar enfermidade em camarões (KIRAN *et al.*, 2014).

Já a espécie *Rhizobium rosettiformans* é uma espécie pertencente a ordem *Rhizobiales*, são bastonetes Gram negativos, heterotróficos, aeróbios, e reduzem nitrato (KAUR; VERMA; LAL, 2011; HUNTER; KUYKENDALL; MANTER, 2007). São bactérias isoladas de solo, estando envolvidas no processo de fixação de nitrogênio (ERLACHER *et al.*, 2015).

Na segunda e terceira coletas houve uma diminuição da diversidade bacteriana. Sendo possível constatar, na segunda coleta, que os representantes do gênero *Pseudomonas* sp. foram mais abundantes do que a espécie *Thauera phenylacetica*.

O gênero *Pseudomonas* é amplamente conhecido por estarem presentes na formação de biofilmes em diversos ambientes e substratos (DOUTERELO *et al.*, 2017; LUO, 2017). Essa capacidade é devida a produção de substâncias poliméricas extracelulares, como os exopolissacarídeos, que possibilitam a sua aderência bem como facilita a ligação de outros micro-organismos ao biofilme pré-formado (MA *et al.*, 2009; GHAFOR; HAY; REHM, 2011; IRIEA *et al.*, 2012).

Esse gênero inclui algumas espécies causadoras de patogenia em peixes. No entanto, por causa de sua versatilidade metabólica diversas espécies vêm sendo utilizadas como biorremediadores de compostos nitrogenados na aquicultura, podendo realizar a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica de forma separada ou acoplada (TRIPATHY *et al.*, 2007; FAN *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015).

Na terceira coleta houve o estabelecimento e uma maior abundância da *Thauera phenylacetica*, em contrapartida as cepas de *Pseudomonas* não foram detectadas. Nesse

mesmo período foi identificada a família Enterobacteriaceae juntamente com a espécie *Buttiauxella agrestis*.

A espécie *Thauera phenylacetica* pertence à família Zoogloeaceae da Ordem Rhodocyclales (WANG *et al.*, 2017). São bastonetes pequenos, Gram negativas, móveis, apresentando catalase e oxidase positiva. Reduzem nitrato e nitrito, mas não fixam nitrogênio (MECHICHI *et al.*, 2002). Em sistemas de lodos ativados, esse gênero foi identificado como formador de aglomerados zoogleias, através da produção de exopolissacarídeos (LAJOIE *et al.*, 2000). Na formação do biofilme perifítico é importante à presença de espécies com essa capacidade, a fim de estabilizar e manter a estrutura da comunidade aderida ao substrato.

A família Enterobacteriaceae inclui espécies heterotróficas, podendo ser encontradas em diversos ambientes e habitam o trato gastrointestinal de vertebrados. Padhi (2017) identificaram uma espécie pertencente ao gênero *Enterobacter* capaz de realizar nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia simultaneamente. Diversas espécies desse gênero são produtoras de exopolissacarídeos (EPS), conseqüentemente são formadores de biofilme (LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015).

A espécie *Buttiauxella agrestis* é um membro da família Enterobacteriaceae, encontrada em solo, água, peixes, moluscos (MULLER *et al.*, 1996). Shi *et al.* (2008) isolaram uma cepa de *Butiauxella* produtora de fitase, a partir do intestino de carpa capim. Demonstrando a importância biotecnológica desse grupo, o qual deve possuir outras enzimas importantes a serem descobertas e utilizadas.

Na última coleta pode-se observar a maior abundância da família Comamonadaceae, sendo representada pelos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp., seguido pela família Zoogloeaceae por meio da espécie representante *Thauera phenylacetica*. A ordem Rhizobiales juntamente com o gênero *Brevudimonas* sp. e *Enterobacter* sp. também estavam presentes nesse período.

O gênero *Brevudimonas* sp. pertence à família Caulobacteraceae são bactérias em forma de bastão, Gram negativas. Já foram isoladas de ambientes aquáticos, solo e de lodos ativados (RYU *et al.*, 2007; YOON *et al.*, 2007).

Um estudo da comunidade bacteriana do biofilme desenvolvido em instalações de abastecimento de água observou maior dominância dos grupos bacterianos *Rhizobiales* e *Burkholderiales* (LIU *et al.*, 2012).

No presente trabalho, pode-se determinar que as bactérias isoladas do meio de cultura seletivo para nitrificantes foram classificadas, de acordo com a literatura, como heterotróficas na sua maioria. Assim o perifíton desenvolvido espontaneamente no cultivo de

juvenis de tilápia do Nilo em sistemas de água verde é formado basicamente por espécies bacterianas heterotróficas.

As bactérias nitrificantes heterotróficas receberam recentemente uma atenção maior devido ao seu papel de nitrificação heterotrófica, associada à desnitrificação aeróbia (VELUSAMY; KRISHNANI, 2013). Assumindo uma grande importância, por causa da sua maior taxa de crescimento em relação as autotróficas, além de tolerar alta carga de matéria orgânica e realizar nitrificação e desnitrificação simultaneamente (LIN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2015).

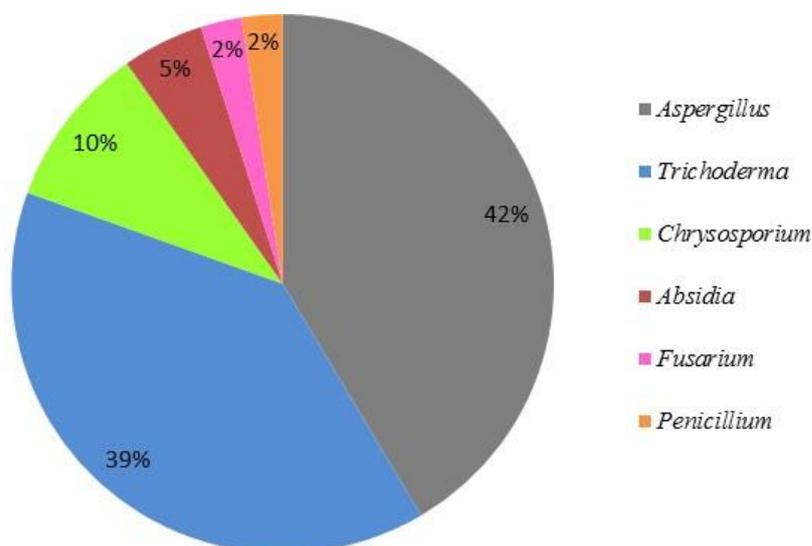
Dessa forma, as bactérias heterotróficas crescidas sob substrato além de contribuir na mineralização da matéria orgânica auxiliando na purificação da água de cultivo, desempenham importante papel como alimento natural extra, uma vez que assimilam os compostos nitrogenados da água e convertem em proteína microbiana, aumentando a biomassa fixada no substrato.

#### ***4.1.7 Identificação dos grupos fúngicos no perifíton espontâneo***

No Gráfico 5 estão representados os valores percentuais dos principais grupos de fungos encontrados no perifíton desenvolvido espontaneamente.

Os fungos identificados, a partir do perifíton espontâneo crescido sob substrato imerso nos tanques de cultivo dos juvenis de tilápia do Nilo, foram classificados em dois filos, Ascomiceto (Ascomycota) e Zigomiceto (Zygomycota). Sendo que o primeiro filo foi mais representativo, apresentando uma maior quantidade de gêneros isolados.

Gráfico 5 - Percentual de grupos fúngicos identificados no perifíton desenvolvido espontaneamente em substrato submerso durante cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborado pela autora.

No total foi possível identificar seis gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Absidia*, *Fusarium* e *Penicillium*. O gênero *Aspergillus* teve um maior percentual de isolamento representando 42%, seguido por *Trichoderma* com 39% e *Chrysosporium* com 10%. Os grupos fúngicos com menor representatividade foram *Absidia*, com 5%, seguido por *Fusarium* e *Penicillium*, os dois, com 2 %.

Os gêneros isolados no perifíton são todos produtores de esporos, sendo classificados como anemófilos. Estudos relatam que os esporos fúngicos transportados pelo ar possuem uma superfície hidrofóbica que ajuda a dispersão, impede a dessecação e pode fornecer uma barreira a entrada de substâncias tóxicas (SINGH *et al.*, 2004; SIQUEIRA; LIMA, 2013).

Biofilmes fúngicos, assim como os biofilmes bacterianos, possuem fases de desenvolvimento que incluem a chegada a um substrato, adesão, colonização, produção de polissacarídeos, maturação e dispersão do biofilme (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

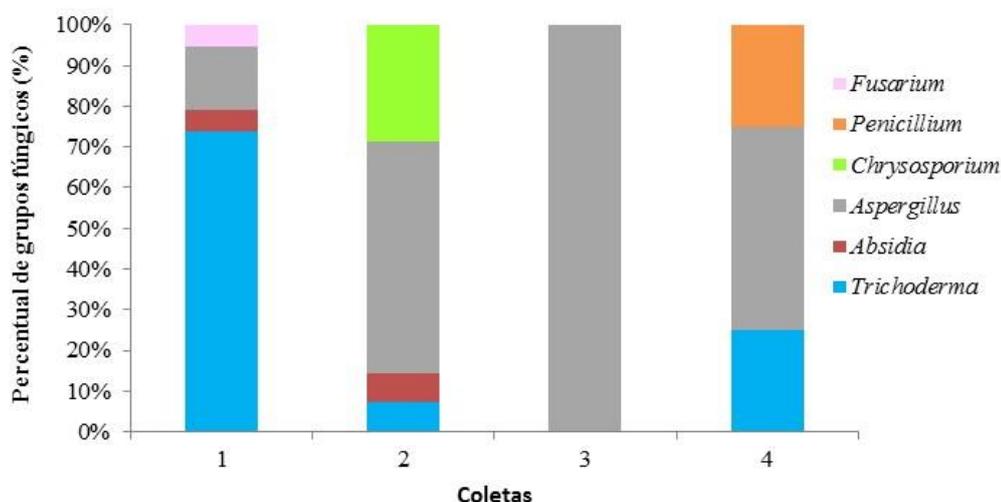
Características do esporo, tais como tamanho, podem influenciar o desenvolvimento do biofilme fúngico (SIQUEIRA; LIMA, 2013).

Em sistemas de abastecimento de água potável foi identificada a colonização de fungos em biofilmes bacterianos pré-estabelecidos. Sugeriram que essa relação é positiva entre esses micro-organismos, uma vez que apresentam diferentes requerimentos ecológicos (DOGGET, 2000; DOUTERELO *et al.*, 2016).

Os fungos encontrados no perifíton desenvolvido espontaneamente apresentaram diferenciação no percentual de isolamento quanto ao período de coleta. No Gráfico 6 pode ser observado esse padrão.

Na primeira coleta houve uma dominância do fungo *Trichoderma* seguido por *Aspergillus*, em detrimento do gênero *Absidia* e *Fusarium*, os quais apresentaram menor abundância.

Gráfico 6 - Abundância relativa dos gêneros fúngicos isolados por coleta no perifíton espontâneo.



Fonte: elaborado pela autora.

O gênero *Trichoderma* é um representante saprófito, interagindo em ambientes de raiz e solo (WANG; HASHIMOTO; HASHIDOKO, 2013). Foi isolado e identificado em amostras de pele de peixes (PINHEIRO *et al.*, 2015). As espécies desse gênero são as mais utilizadas no controle de fitopatógenos, possuindo um ou mais mecanismo de ação, como antibiose, parasitismo, competição e promoção de crescimento (MACHADO *et al.*, 2012). Além disso, são reconhecidos por formar biofilme (TRIVENI *et al.*, 2012).

O gênero *Fusarium* tem sido isolado de ambientes aquáticos, assim como de pele e brânquias de peixes (MACHADO *et al.*, 2012). Esse gênero também foi isolado da superfície corporal de pós-larvas do camarão *Penaeus monodon*, e de acordo com os mesmos autores, esse fungo subsiste nos tecidos corporais de peneídeos podendo afetar todos os estágios larvais, causando problemas na osmorregulação (KUSUMANINGRUM; ZAINURI, 2015). Vale ressaltar, que esses fungos só agem causando patologia quando a qualidade de água é precária ou quando ocorrem mudanças bruscas na temperatura, por exemplo.

Na segunda coleta o gênero *Aspergillus* foi mais abundante, seguido por

*Chrysosporium*, o qual não foi constatado inicialmente no biofilme perifítico. *Absidia* e *Trichoderma* foram menos representativos. A partir dessa coleta, o grupo *Aspergillus* se estabeleceu no biofilme, tornando-se cada vez mais expressiva a sua colonização, onde na terceira coleta 100% dos isolados pertenceram esse grupo. Esse gênero parece ser um dos mais importantes para o biofilme perifítico, uma vez que esteve presente em todas os períodos de coleta.

O biofilme formado por *Aspergillus* possui uma grande utilidade na produção de enzimas extracelulares utilizadas na indústria para diversos fins (RAMAGE *et al.*, 2011).

Algumas das enzimas produzidas por *Aspergillus* como celulase (GAMARRA; VILLENA; GUTIÉRREZ-CORREA, 2010) e a fitase, por exemplo, podem ser adicionadas as rações de peixes a fim de aumentar a digestibilidade, melhorando o desempenho zootécnico, e contribuindo na redução de excreção de nutrientes no ambiente aquático, contribuindo para a melhoria da qualidade de água dos sistemas de produção aquícola (GOMES *et al.*, 2016). Dessa forma, a presença desse fungo no biofilme perifítico é de grande valia, uma vez que podem contribuir de forma positiva na digestibilidade dos peixes, já que esses consomem ativamente o biofilme contendo esses micro-organismos.

Na quarta coleta, foram identificados *Aspergillus*, sendo mais abundante com mais de 50% de isolamento, seguido por *Trichoderma* e *Penicillium*.

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são conhecidos por produzirem uma grande variedade de compostos com atividades biológicas e farmacológicas (DEBBAB *et al.*, 2010). Ozkaya *et al.* (2017) constataram que os extratos fúngicos da espécie *Penicillium canescens* foram mais efetivos contra quatro bactérias causadoras de patologia na aquicultura (*Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Vagococcus salmoninarum*), apresentando forte inibição com valores de MIC iguais a 1280, 160, 320 e 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

Um dos problemas associados a presença dos fungos no cultivo de peixes são as micotoxinas produzidas por alguns gêneros. Dos gêneros fúngicos mais conhecidos em produzirem micotoxinas, três deles foram encontrados no perifíon espontâneo presente no cultivo de juvenis de tilápia, que foram *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (PINHEIRO *et al.*, 2015; SWEENEY; DOBSON, 1998).

No interior do biofilme perifítico existem interações entre as comunidades microbianas estabelecidas. E de acordo com Elvers *et al.* (1998) existem seis tipos de interações entre os micro-organismos presentes no biofilme, podendo ser neutralismo, mutualismo, comensalismo, amensalismo, relação presa-predador e competição. Esses

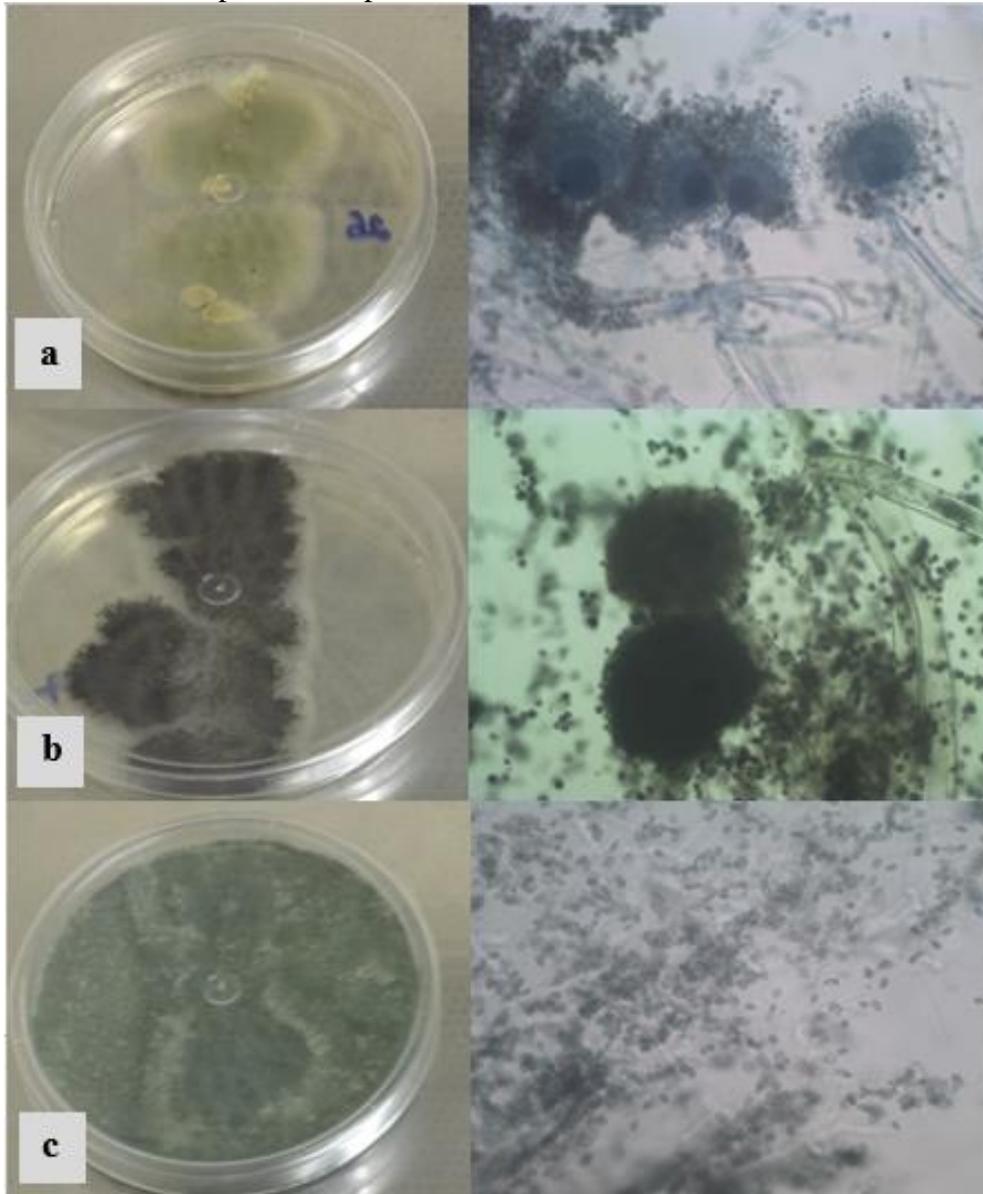
mesmos autores, relatam que o número de interações aumenta significativamente quando se tem um aumento no número de espécies dentro da população mista. Algumas espécies têm aumento significativo no crescimento quando cultivadas em consórcio, como cultura mista, enquanto outras mostram uma taxa de crescimento reduzida ou não sofrem qualquer alteração.

Essas informações mostram claramente os eventos de interações que acontecem nos biofilmes, com presença de espécies que contribuem para a promoção do crescimento de outras, ou então competindo pelos mesmos nutrientes, ocorrendo exclusão de uma das partes. Essas relações que ocorrem entre as espécies microbianas no biofilme, podem contribuir para a eliminação de espécies que possam trazer prejuízos a saúde dos peixes cultivados, ou então podem transformar os compostos, como as micotoxinas, em produtos nocivos aos peixes que vão se alimentar desse perifíton.

Alguns grupos de bactérias e leveduras contribuem para a biotransformação de micotoxinas em metabólitos não prejudiciais aos peixes (PINHEIRO *et al.*, 2015). Bactérias Gram positivas, como a espécie *Bacillus subtilis*, podem ser usadas no controle biológico de fungos micotoxigênicos e na inibição de micotoxinas, assim como bactérias Gram negativas, como a *Pseudomonas fluorescens* (HAN *et al.*, 2015; AL-SAAD *et al.*, 2016). Nos biofilmes, os fungos podem favorecer o crescimento bacteriano por meio da produção de micélio que geram substratos favoráveis para a adesão e crescimento, além de disponibilizar nutrientes (DOUTERELO *et al.*, 2017).

Na Figura 13 encontram-se as imagens da morfologia macroscópica e microscópica de alguns gêneros fúngicos isolados do perifíton desenvolvido espontaneamente no substrato submerso durante o cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.

Figura 13 - Macroscopia e microscopia de alguns grupos fúngicos identificados no perifíton espontâneo.



Fonte: elaborada pela autora.  
a e b) *Aspergillus* sp.; c) *Trichoderma* sp.

#### 4.1.8 Caracterização enzimática dos grupos bacterianos

Na Tabela 8 encontra-se a caracterização enzimáticas das bactérias heterotróficas cultiváveis isoladas do perifíton espontâneo desenvolvido no substrato submerso em tanques de cultivo de tilápia do Nilo.

Tabela 8 - Caracterização enzimática das bactérias heterotróficas cultiváveis totais isoladas do perifíton espontâneo durante cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Cepa	n	Caseínase		Gelatinase		Elastase		Lipase		Fosfolipase		Celulase		Amilase		MRS		β-Hemólise	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	Sangue Carneiro	Sangue Tilápia
<i>Bacillus</i> sp.	24	24	0	1	23	0	24	11	12	13	9	16	7	22	2	16	8	18	21
<i>Corynebacterium</i> sp.	5	3	2	0	5	2	3	2	3	1	4	2	3	1	4	1	4	0	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	2	0	1	1	0	2	0	2	1	1	1	1	0	2	0	2	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
Filo Firmicutes	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	NI	NI
<i>Pseudomonas</i> sp.	7	5	2	1	6	0	7	2	5	2	5	2	5	3	4	2	5	0	0
<i>Burkholderia</i> sp.	2	2	0	0	2	0	2	2	0	2	0	0	2	0	2	1	1	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	NI
<i>Aeromonas</i> sp.	5	4	0	0	4	0	4	4	0	0	4	0	4	0	4	0	4	1	1
<i>Serratia</i> sp.	2	1	1	0	2	0	2	0	2	0	2	1	1	1	1	0	2	0	0
<i>Shigella</i> sp.	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
Filo Proteobacteria	3	2	1	0	3	0	3	1	2	1	2	1	2	0	3	0	3	1	NI

Fonte: elaborada pela autora.

n: Número de cepas; +: Reação enzimática positiva ; -: Reação enzimática negativa; NI: Não identificado

A atividade das proteases (caseínase, gelatinase e elastase) pelos micro-organismos isolados do perifíton espontâneo, na presente pesquisa, foi elevada. Com exceção o representante do Filo Firmicutes e *Acinetobacter* sp. que não apresentaram expressão proteolítica. Os demais grupos microbianos apresentaram pelo menos um representante capaz de produzir uma das proteases.

O gênero *Bacillus* sp. apresentou 100% dos isolados (n=24) capazes de hidrolisarem a caseínase. Além disso, apresentou elevada atividade celulolítica (n=16; 66,7%), lipolítica (n=11; 45,8%) e amilolítica (n=22; 91,7%). Exibiram um número considerável de estirpes com capacidade de crescerem no meio MRS (n=16; 66,7%), o qual é destinado a bactérias ácido-láticas.

Representantes do gênero *Bacillus* possuem elevado potencial de produção de proteases e celulases extracelulares (ZHANG; LYND, 2004). Askarian *et al.* (2012) isolaram cepas de *Bacillus* sp. do trato intestinal de salmão, constataram a produção das exoenzimas proteases, amilases, lipases e celulases. Ray *et al.* (2010) detectaram que as cepas de *Bacillus* sp. isoladas do intestino de três espécies de carpas exibiram elevada atividade proteolítica, amilolítica e celulolítica. Concluíram que essas bactérias podem contribuir para uma melhor utilização de alimentos ricos em proteínas e carboidratos. A espécie *Bacillus circulans* isolada a partir do trato intestinal da tilápia (*Oreochromis mossambica*) apresentou atividade celulolítica através de teste *in vitro* (SAHA *et al.*, 2006). Os autores afirmaram que essa espécie contribuiu para a produção de celulase nesses peixes.

Por ordem de recorrência, cepas do gênero *Bacillus* sp. apresentou a seguinte caracterização enzimática, incluindo a capacidade de produção de ácidos orgânicos no meio MRS: caseínase, amilase, MRS, celulase, fosfolipase, lipase, gelatinase e elastase.

Esse grupo apresentou também a capacidade em produzir  $\beta$ -hemólise tanto no sangue de carneiro (n=18; 75%) como no sangue de tilápia (n=21; 87,5%). Esse é um marcador de potencial patogênico em bactérias. Cerca de 62,5% (n=15) das cepas apresentaram expressão simultânea de  $\beta$ -hemólise nos sangues utilizados, 8,3% (n=2) não apresentaram produção de nenhum tipo de hemólise e 20,8% (n=5) foram capazes de hemolisar pelo menos um dos sangues testados. No entanto, a capacidade de causar algum dano as tilápias quando cultivadas na presença dessas bactérias pode ou não vir a acontecer.

Micro-organismos que apresentam elevada produção de enzimas extracelulares são candidatos desejáveis para serem utilizados como probióticos, por exemplo, nos cultivos de organismos aquáticos a fim de induzir a melhor utilização dos nutrientes, auxiliando na obtenção de resultados zootécnicos satisfatórios (DUTTA; GHOSH, 2015). A ação enzimática

das bactérias promove a quebra de grandes moléculas tornando-as disponíveis aos organismos cultivados, como proteínas, lipídios, celulose, dentre outras. Por exemplo, peixes teleósteos não possuem a capacidade de produzir celulase endógena, necessitando das enzimas bacterianas presentes no trato intestinal, as quais auxiliam na digestão do material vegetal (SAHA *et al.*, 2006).

Dessa forma, a presença de grupos microbianos que apresentem elevada atividade enzimática no perifíton é de grande valia, uma vez que os peixes se alimentam diretamente desse biofilme. Ao ingerirem as bactérias aderidas nos substratos estarão assimilando microorganismos capazes de degradar diversos compostos, tornando-os biodisponíveis.

Os representantes cocos Gram positivos isolados do perifíton, *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus faecalis* apresentaram o seguinte perfil enzimático: cas-gel-fosf-cel e cas-βhem, respectivamente. Silva *et al.* (2016) não detectaram atividade enzimática de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas do perifíton e nem produção de beta hemólise. Representantes de *Enterococcus* são definidos como pertencentes a bactérias ácido lácticas (RINGO; GATESOUBE, 1998) capazes de crescerem no meio MRS. No entanto, o representante encontrado na presente pesquisa não cresceu no meio MRS.

O gênero *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. apresentaram estirpes com elevada capacidade de hidrolisar a caseína, 71,4% (n=5) e 100% (n=2), respectivamente. Já em relação a expressão das demais exoenzimas, pode-se observar um menor número de cepas. Com exceção da expressão da lipase e fosfolipase por *Burkholderia* sp., a qual todas as cepas apresentaram 100% de atividade. Esses dois gêneros não apresentaram atividade β-hemólise.

Pesquisa realizada por Silva *et al.* (2016) detectaram que as *Pseudomonas* sp. isoladas do perifíton durante cultivo de tilápia expressaram somente atividade proteolítica, apresentando o seguinte perfil enzimático: cas-gel-elas e produção de beta hemólise. Diferindo dos resultados encontrados no presente estudo, o qual foram encontradas cepas de *Pseudomonas* sp. com perfil enzimático cas-gel-lip-fosf-cel-ami e produção de ácidos orgânicos através do crescimento no meio MRS.

O grupo das *Aeromonas* sp. expressou 80% (n=4) de atividade lipolítica e proteolítica. E 50% dos isolados expressaram a produção de β-hemólise tanto no sangue de carneiro como no sangue de tilápia.

Diferindo do resultado encontrado na presente pesquisa, Jiang *et al.* (2011) detectou que o gênero *Aeromonas* foi capaz de produzir celulase, sendo o grupo com maior número de espécies dominantes no trato intestinal da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*).

As linhagens *Serratia* sp. e *Shigella* sp., membros da família Enterobacteriaceae,

apresentaram a capacidade de hidrolisar a caseína. E um dos dois representantes isolados de *Serratia* sp. foram positivos para expressão da amilase e celulase.

Na Tabela 9 encontra-se a caracterização fenotípica das bactérias heterotróficas capazes de produzirem biofilme, através do teste de aderência ao vidro (TAV), teste de aderência a microplaca (TMC) e produção de exopolissacarídeo em placas contendo o ágar vermelho congo (AVC).

Tabela 9 - Caracterização fenotípica das cepas bacterianas produtoras de biofilme através do Teste de aderência ao vidro (TAV), Teste de aderência na microplaca (TMC) e produção de exopolissacarídeo nas placas de ágar vermelho congo (AVC).

Cepa	n	TAV				TMC				AVC
		+++	++	+	-	+++	++	+	-	
<i>Bacillus</i> sp.	24	0	0	0	24	14	1	1	8	17
<i>Corynebacterium</i> sp.	5	0	0	0	5	5	0	0	0	1
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	0	1	0	1	0	0	0	2	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Filo Firmicutes	1	#				#				#
<i>Pseudomonas</i> sp.	7	0	0	3	4	4	0	0	3	3
<i>Burkholderia</i> sp.	2	0	0	0	2	1	1	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>Aeromonas</i> sp.	5	0	0	0	5	1	2	0	2	0
<i>Serratia</i> sp.	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0
<i>Shigella</i> sp.	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
Filo Proteobacteria	3	0	0	0	1	0	0	0	1	1

Fonte: elaborada pela autora.

n: Número de cepas; +++: Aderência forte: bactérias aderiram nos três tubos ou poços; ++: Aderência média, dois tubos; +: Aderência fraca, um tubo; -: Ausente; #: não identificado.

Para o teste de aderência, pode-se observar que as espécies *E. faecalis*, *Acinetobacter* sp., *Serratia* sp. e um representante do Filo Proteobacteria não aderiram aos materiais utilizados no teste. Já os demais representantes bacterianos isolados apresentaram agregação positiva em pelo menos um dos dois testes realizados.

Representantes de *Bacillus* sp. e de *Corynebacterium* sp. apresentaram agregação positiva somente na microplaca de poliestireno. Quatorze cepas de *Bacillus* sp. exibiram agregação forte, uma agregação média e uma fraca, e oito apresentaram resultado negativo.

No teste de aderência ao vidro (TAV), três cepas de *Pseudomonas* sp. exibiram

aderência fraca. Já no teste de aderência a microplaca (TMC), quatro cepas apresentaram forte agregação e três foram negativas.

As estirpes de *Burkholderia* sp., *Aeromonas* sp. e *Shigella* sp. apresentaram positividade somente no TMC.

A produção de exopolissacarídeos no AVC foi mais evidente nos isolados do grupo *Bacillus* sp., os quais apresentaram 70% de produtores de EPS. De acordo com Orsod, Joseph e Huyop (2012) a espécie *Bacillus cereus*, isolado a partir do peixe *Lates calcarifer*, produziu EPS, o qual apresentou potencial atividade antimicrobiana contra cepas Gram positivas e Gram negativas.

Os representantes de *Pseudomonas* sp. apresentaram 42% (n=3) de cepas produtoras de EPS. Ghafoor, Hay e Rehm (2011) detectaram três tipos de exopolissacarídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* envolvidos no processo de formação e arquitetura do biofilme produzido por essa espécie.

As linhagens *Burkholderia* sp., *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp. e *Serratia* sp. não expressaram capacidade de produção de EPS, quando crescidos em placas de ágar vermelho congo.

Silva *et al.* (2016) constataram a produção de EPS pelos isolados do gênero *Aeromonas* sp. oriundos do perifíton durante o cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.

A produção de EPS pelas bactérias tem apresentado múltiplas funções incluindo a aderência inicial das células as superfícies sólidas, formação e manutenção de agregados microbianos no biofilme, absorção de compostos orgânicos e nutrientes, resistência a condições estressantes do ambiente, e potencial atividade antimicrobiana (DOGAN *et al.*, 2015; CZACZYK; MYSZKA, 2007; ORSOD; JOSEPH; HUYOP, 2012). Dessa forma, as bactérias formadoras de perifíton devem produzir EPS e ter a capacidade de agregação a substratos.

Na Tabela 10 estão os resultados da caracterização enzimática das cepas isolados do meio seletivo para bactérias nitrificantes.

Tabela 10 - Caracterização enzimática das bactérias do grupo do nitrogênio isoladas do perifiton formado espontaneamente em tanques de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Cepa	n	Caseínase		Gelatinase		Lipase		Fosfolipase		Celulase		Amilase		β-hemólise
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
Rhizobiales	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
<i>Rhizobium rosettiformans</i>	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Brevibacterium</i> sp.	2	0	2	2	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	15	10	5	0	15	11	4	12	3	0	15	3	12	1
<i>Burkholderia</i> sp.	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
Enterobacteriaceae	2	0	2	0	2	1	1	1	1	0	2	0	2	0
<i>Enterobacter</i> sp.	2	1	1	0	2	2	0	2	0	0	2	1	1	0
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
<i>Thauera phenylacetica</i>	5	0	5	1	4	3	2	2	3	1	4	1	4	0
<i>Brevundimonas</i> sp.	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0

Fonte: elaborada pela autora.

n: Número de cepas; +: Reação enzimática positiva; -: Reação enzimática negativa; NI: Não identifica

Representantes da ordem Rhizobiales, entre elas a espécie *Rhizobium rosettiformans* não apresentaram as atividades enzimáticas testadas, assim como os membros do grupo *Hydrogenophaga* sp.

As duas estirpes identificados como pertencentes a família Enterobacteriaceae apresentaram expressão da exoenzima lipase (n=1) e fosfolipase (n=1). O gênero *Brevudimonas* sp. apresentou esse mesmo perfil enzimático (Lip-Fosf). Já a espécie *Butiauxella agrestis*, que pertence à família Enterobacteriaceae, expressou a produção de caseínase, fosfolipase e amilase.

Os isolados de *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. apresentaram com maior frequência o seguinte perfil enzimático: Cas-Lip-Fosf-Ami.

Ray *et al.* (2010) detectaram atividade proteolítica, amilolítica e celulolítica de duas estirpes de *Enterobacter* sp. isoladas do intestino de três espécies de carpas (*Catla catla*, *Cirrhinus mrigala* e *Labeo rohita*).

A atividade amilolítica foi expressa por um menor número de cepas das *Pseudomonas* sp. (n=3), e um representante produziu beta hemólise.

Diferindo dos resultados encontrados na presente pesquisa, alguns autores constataram que os grupos *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, isoladas do sistema gastrointestinal de peixes herbívoros, são responsáveis pela produção de enzimas celulolíticas, além de degradarem diversos tipos de substratos, incluindo dietas ricas em fibras (LIU *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2014).

Os micro-organismos apresentam diferentes mecanismos de ação e expressão de exoenzimas, por exemplo, que vai depender do nicho onde se encontram. Podendo variar de acordo com o tipo de substrato, nutrientes disponíveis, variáveis ambientais, além do seu fenótipo e genótipo que se adaptam ao longo do tempo por pressões seletivas (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

A estirpe de *Burkholderia* sp. apresentou positividade somente na produção das proteases, caseínase e gelatinase.

Dentre as espécies de *Thauera phenylacetica* isoladas, pelo menos uma estirpe exibiu o seguinte perfil enzimático: gel-lip-fosf-cel-ami.

Na Tabela 11 encontra-se a caracterização das bactérias nitrificantes em relação aos testes de agregação (TMC) e a produção de EPS em placas de ágar vermelho congo (AVC).

Tabela 11 - Caracterização fenotípica das cepas bacterianas nitrificantes produtoras de biofilme através do Teste de aderência na microplaca (TMC) e produção de exopolissacarídeo nas placas de ágar vermelho congo (AVC).

Cepa	n	TMC				AVC
		+++	++	+	-	
Rhizobiales	2	0	0	0	2	0
<i>Rhizobium rosettiformans</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Brevibacterium</i> sp.	2	1	1	0	0	1
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	2	0	0	1	1	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	15	4	1	7	3	8
<i>Burkholderia</i> sp.	1	0	0	1	0	1
Enterobacteriaceae	2	1	0	0	1	1
<i>Enterobacter</i> sp.	2	0	1	0	1	1
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1	1	0	0	0	1
<i>Thauera phenylacetica</i>	5	0	2	0	3	3
<i>Brevundimonas</i> sp.	1	0	1	0	0	1

Fonte: elaborada pela autora.

n: Número de cepas; +++: Aderência forte: bactérias aderiram nos três tubos ou poços; ++: Aderência média, dois tubos; +: Aderência fraca, um tubo; -: Ausente.

Exceto os representantes da ordem Rhizobiales, todos os demais isolados apresentaram alguma capacidade de aderência. Aderência forte foi visualizado para 100% da estipe *Rhizobium rosettiformans* e *Buttiauxella agrestis* (n=1), 50 % para *Brevibacterium* sp. e Enterobacteriaceae (n=1), e 26,7% para *Pseudomonas* sp. (n=4).

Os seguintes isolados apresentaram aderência média nos poços de poliestireno: *Enterobacter* sp. (n=1), *Thauera phenylacetica* (n=2) e *Brevundimonas* sp. (n=1).

Cerca de 50% dos representantes do grupo *Hydrogenophaga* sp. e *Burkholderia* sp. (n=1) aderiram fracamente aos micropoços de poliestireno, juntamente com 46,7% dos isolados de *Pseudomonas*.

Com exceção dos representantes da ordem Rhizobiales e *Hydrogenophaga* sp., todos os demais grupos de isolados bacterianos apresentaram produção de EPS.

A produção de EPS é um dos fatores que facilitam a adesão das células microbianas aos substratos. Dessa forma, pode-se observar, na presente pesquisa, que os grupos bacterianos que não apresentaram positividade para a produção de EPS se agregaram de forma fraca ou não apresentaram qualquer agregação, como foi o caso do

isolado da ordem Rhizobiales e do *Hydrogenophaga* sp.

Torres *et al.* (2012) constataram produção máxima de produção de EPS por uma estirpe de *Enterobacter* A47 e concluíram que essa cepa apresentou o mesmo padrão de produção de substâncias exopoliméricas dos grupos *Rhizobium* e *Pseudomonas* (REHM, 2009).

A capacidade de adesão, estabilidade e formação de agregados microbianos, assim como características de hidrofobicidade e hidrofília da célula são fatores influenciados pelo EPS (LIANG *et al.*, 2010; SHENG; YU; LI, 2010). Além disso, as bactérias produtoras de EPS podem usá-lo como fonte de carbono e energia, uma vez que são constituídos por carboidratos e proteínas, assim como outros micro-organismos presentes no biofilme também podem biodegradar essas substâncias, utilizando para atividades metabólicas (SHENG; YU; LI, 2010; ZHANG; BISHOP, 2003).

Um dos pré-requisitos exigidos na seleção de bactérias iniciadoras na formação do biofilme é a capacidade de aderência a superfícies e produção de EPS.

#### ***4.1.9 Seleção das bactérias para a construção do consórcio iniciador do perifíton***

##### ***4.1.9.1 Bactérias heterotróficas cultiváveis***

Na Tabela 12 encontram-se as estirpes isoladas a partir das BHC e seus resultados enzimáticos e de formação de biofilme.

Tabela 12 - Caracterização das cepas bacterianas heterotróficas cultiváveis pré-selecionadas para compor consórcio microbiano a ser aplicado no cultivo de tilápia, seja como iniciador do perifíton ou como probiótico adicionado via ração.

Cepas	Identificação	Gram	Enzimas	Agregação	EPS
24	<i>Bacillus</i> sp.	+	MRS-Gel-Cas	-	+
27	<i>Bacillus</i> sp.	+	MRS-Fosf-Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	-	+
30	<i>Bacillus</i> sp.	+	Fosf-Lip-Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	-	+
42	<i>Bacillus</i> sp.	+	MRS-Fosf-Lip-Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	+	+
43	<i>Bacillus</i> sp.	+	Fosf- Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	+	+
44	<i>Bacillus</i> sp.	+	Fosf- Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	-	+
47	<i>Bacillus</i> sp.	+	MRS-Cas-Ami	-	-
48	<i>Bacillus</i> sp.	+	MRS- Lip-Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	+	+
51	<i>Bacillus</i> sp.	+	MRS- Lip-Cas-Cel-Ami- $\beta$ hem	+	+
54	<i>Bacillus</i> sp.	+	Cas-Ami- $\beta$ hem	-	+
31	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	Gel-Fosf-Cas-Cel	+	+
53	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Cas- $\beta$ hem	-	+
57	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	Cas-Cel-Ami	+	+
67	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	MRS-Cas-Ami	+	-
70	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	Gel-Cas-Ami	+	+

Fonte: elaborada pela autora.

Cas=Caseínase; Lip=Lipase; Gel=Gelatinase; Fosf=Fosfolipase; Cel=Celulase; Ami=Amilase;  $\beta$ hem=beta hemólise; MRS=meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe.

Foram escolhidas quinze cepas de BHC que apresentaram melhor desempenho na expressão de exoenzimas e produção de biofilme, além de já terem sido reportados na literatura como bactérias com potencial probiótico. Desse total, dez são *Bacillus* sp., três *Pseudomonas* sp., um *Staphylococcus* sp. e um *Enterococcus faecalis*.

Na Tabela 12 pode-se observar que 100% dos isolados de *Bacillus* sp. (bastonetes Gram positivos produtores de esporos) apresentaram atividade da enzima caseínase, 90% para amilase, 70% para celulase, 60% para produção de ácido láctico através do crescimento no meio MRS, 40% para lipase e 80% para  $\beta$ -hemólise. As cepas com morfologia de cocos Gram positivas, *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus faecalis*, apresentaram o seguinte perfil de expressão enzimática, respectivamente: Gel-Fosf-Cas-Cel e Cas-  $\beta$ hem. Os representantes do grupo das *Pseudomonas* sp. apresentaram por ordem de ocorrência as seguintes enzimas: caseínase, amilase, celulase, Lipase, gelatinase, fosfolipase e MRS.

A produção de enzimas exógenas por bactérias é de grande importância para o setor aquícola, a fim de serem utilizadas como suplementos na alimentação de peixes. Espécies de peixes herbívoras a omnívoras, como as tilápias, não aproveitam de forma satisfatória as rações oferecidas no mercado (VIEIRA; PEREIRA, 2016).

Bactérias probióticas que possuam atividade proteolítica podem ajudar na digestão de proteínas, que melhoram as propriedades funcionas pela produção de peptídeos bioativos, além de reduzir alérgenos proteicos (RAMESH *et al.*, 2015).

De acordo com Vieira e Pereira (2016) as rações são ricas em fibras celulósicas alimentares, e assim são de difícil digestão pelos peixes, visto que não produzem enzima celulase endógena, necessitando de uma fonte externa para produzir. Dessa forma, a ingestão de bactérias que tenham a capacidade de produção dessa enzima, assim como de outras exoenzimas, é importante para assimilação eficiente dos nutrientes ofertados no alimento artificial. Com isso, ocorre a diminuição de perdas de ração não consumida para a água, conseqüentemente, gerando efluentes menos poluentes, além da diminuição de gastos com ração, visto que o alimento pode ser aproveitado de forma mais satisfatória pelos peixes.

A produção de biofilme, verificada a partir dos testes de agregação e produção de EPS, são provas importantes que mostram a capacidade das bactérias se aderirem a substratos, sendo formadores eficientes de biofilmes, demonstrando também a capacidade *in vitro* da colonização do trato intestinal. As bactérias pré-selecionadas para compor o consórcio a ser aplicado no cultivo de tilápia apresentaram pelo menos positividade em um dos testes de produção de biofilme, como pode ser observado na Tabela 12.

Após a verificação da produção enzimática e formação de biofilme, as cepas foram testadas frente a quatro bactérias consideradas patogênicas para o cultivo de tilápia do Nilo, como pode ser visto na Tabela 13.

Tabela 13 - Teste de antagonismo (*Cross streak*) das cepas isoladas das BHC contra *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Edwardsiella tarda* ATCC 15947, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 37853 e *Streptococcus* sp. pertencente a bacterioteca do LAMAP.

Cepas	Identificação Molecular	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>E. tarda</i> ATCC 15947	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Streptococcus</i> sp.
24	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-
27	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	+	-
30	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	-
42	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	-
43	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	-
44	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	+	-
47	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	-
48	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-	-
51	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-	-
54	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-	-
31	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-
53	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-
57	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	-	-
67	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	-	-
70	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

Através dessa técnica foi evidenciado o poder de inibição das cepas selecionadas frente as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* sp., bactérias reconhecidas como patógenos oportunistas em cultivos de peixes.

As linhagens de *Bacillus* sp. apresentaram o seguinte resultado: a cepa 24 não inibiu nenhuma das bactérias; 27 inibiu *E. tarda* e *P. aeruginosa*; duas (30 e 42) inibiram *A. hydrophila* e *P. aeruginosa*; três cepas (41, 38 e 54) foram antagonistas a *A. hydrophila* e *E. tarda*, e as estirpes 42 e 47 inibiram apenas *A. hydrophila*. Corroborando com a presente pesquisa, Chen *et al.* (2016) detectaram efeito inibitório da espécie *Bacillus amyloliquefaciens* N004, isolada do sistema gastrointestinal do peixe *Paralichthys lethostigma*, contra *E. tarda* e *Streptococcus* sp. E concluíram que essa espécie poderia ser uma boa candidata no biocontrole de bactérias patogênicas na aquicultura.

As cepas de *Pseudomonas* sp. (57, 67) foram capazes de inibir *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, apresentando resultado negativo para as demais estirpes patogênicas, enquanto a cepa representante identificada com o código 70 não inibiu nenhum patógeno.

*Enterococcus faecalis* apresentou inibição apenas a *A. hydrophila*. E a espécie *Staphylococcus* sp. não foi capaz de inibir nenhuma espécie.

Probióticos com capacidade de inibição de patógenos causadores de doenças em peixes, são usados na aquicultura a fim de reduzir o risco de infecções e mortalidades dos animais (RAMESH *et al.*, 2015). Além de ser um dos requisitos essenciais para a escolha de cepas probióticas.

De acordo com Guo *et al.* (2016) a formação de biofilme por bactérias probióticas traz muitos benefícios para a saúde dos organismos cultivados, por meio da produção de metabólitos secundários, proteção do epitélio intestinal através da competição com patógenos por locais de adesão, além de induzir reações imunes do hospedeiro a patógenos.

As bactérias que apresentaram inibição aos patógenos, principalmente a *Aeromonas hydrophila* que foi a bactéria usada no teste desafio, prosseguiram para o teste de antagonismo entre elas, a fim de formar o consórcio utilizado no tratamento T3 e T5.

Na Tabela 14 estão os resultados do teste de antagonismo entre os isolados de BHC escolhidos nos testes realizados anteriormente.

Tabela 14 - Resultado do teste de antagonismo entre os isolados das bactérias heterotróficas selecionadas.

Cepas	57	67	70	30	42	43	44	48	47	51	54	27	24	31	53	
<i>Pseudomonas</i> sp.	57	*	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	
<i>Pseudomonas</i> sp.	67		*	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	
<i>Pseudomonas</i> sp.	70			*	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
<i>Bacillus</i> sp.	30				*	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	
<i>Bacillus</i> sp.	42					*	+	+	+	-	-	+	+	-	-	
<i>Bacillus</i> sp.	43						*	+	+	+	-	-	+	-	-	
<i>Bacillus</i> sp.	44							*	+	+	+	-	+	+	-	
<i>Bacillus</i> sp.	48								*	-	+	+	+	+	-	
<i>Bacillus</i> sp.	47									*	+	+	-	-	-	
<i>Bacillus</i> sp.	51										*	+	-	+	+	
<i>Bacillus</i> sp.	54											*	+	-	-	
<i>Bacillus</i> sp.	27												*	+	+	
<i>Bacillus</i> sp.	24													*	+	
<i>Staphylococcus</i> sp.	31														*	
<i>E. faecalis</i>	53															*

Fonte: elaborada pela autora.

(+) Efeito antagonístico positivo; (-) Sem antagonismo.

Após esses testes descritos acima, as cepas escolhidas para compor o consórcio que foi aplicado no tratamento T3 e T5 foram: 27, 30, 43 e 51, todas identificadas como *Bacillus* sp.

O desempenho desses isolados frente a eventos de estresses ambientais também é um determinante da maior eficiência de colonização das populações bacterianas. Assim capacidade de suportar variações drásticas do pH e temperatura são também importantes na escolha de estirpes.

Os resultados da eficiência do crescimento das mesmas cepas nos diferentes valores de pH e de temperatura estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultado teste de crescimento em diferente pH e temperatura dos *Bacillus* sp. selecionados para composição do consórcio.

Cepa	Identificação	Temperatura		pH	
		25° C	40°C	5	9
27	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+
30	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+
43	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+
51	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+

Fonte: elaborada pela autora.

Em ambientes de cultivo de organismos aquáticos ocorre variação nictimeral das variáveis de qualidade de água, dentre elas o pH e a temperatura (SÁ, 2012). Dessa forma, faz-se necessário o estudo da tolerância do crescimento das bactérias que serão adicionadas ao

cultivo em relação a variação dessas variáveis. Além disso, um dos requisitos da seleção de bactérias probióticas é que apresentem resistência as condições gástricas, como valores baixos de pH (VIEIRA; PEREIRA, 2016). Pode-se observar, na presente pesquisa, que todas as cepas cresceram bem nas condições testadas.

Uma das vantagens do uso de bactérias esporogênicas, é sua capacidade de sobreviver a diversos estresses e posteriormente voltar ao seu estado vegetativo, com atividade biológica plena. Guo *et al.* (2016) verificaram a alta sobrevivência dos esporos de *Bacillus* sp. após terem testados a condições de baixos valores de pH e de temperatura.

Outras questões de segurança ambiental e do cultivo devem ser consideradas na manipulação da microbiota como a resistências a substâncias antimicrobianas como uma fonte de genes que possam ser disseminados entre outras bactérias no ambiente, incluindo patógenos potenciais para os animais cultivados.

Na Tabela 16 encontram-se os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos *Bacillus* sp.

Tabela 16 - Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das cepas de *Bacillus* sp. selecionados para composição do consórcio.

Cepas	Identificação	Cloranfenicol (30 µg)*	Tetraciclina (30 µg)	Eritromicina (15 µg)	Florfenicol (30 µg)
27	<i>Bacillus</i> sp.	S	S	S	S
30	<i>Bacillus</i> sp.	S	S	S	S
43	<i>Bacillus</i> sp.	S	I	S	S
51	<i>Bacillus</i> sp.	S	S	S	S

Fonte: elaborada pela autora.

\*: Concentração do disco de antibiótico utilizado; S: sensível e I: intermediário (Zona de inibição-mm).

Para os antimicrobianos testados, as cepas selecionadas apresentaram sensibilidade (susceptíveis), com exceção da cepa 43 que se mostrou intermediário a tetraciclina.

A realização da susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos é necessária a fim de garantir que as bactérias selecionadas não transmitirão genes de resistência a patógenos presentes nos cultivos.

O uso de cepas bacterianas benéficas, como iniciadoras do perifíton ou adicionada via ração como probiótico, podem auxiliar na melhor conversão alimentar e na melhoria da qualidade de água, contribuindo para um ambiente de cultivo mais seguro e estável.

Alguns estudos propõem que a microbiota gastrointestinal de peixes é originária do ambiente em que vivem, refletindo a comunidade bacteriana encontrada na água e no

sedimento, além disso, a alimentação também influencia significativamente na composição da microbiota (WU *et al.*, 2012; GHANBARI; KNEIFEL; DOMING, 2015). Sendo assim, o uso de uma microbiota benéfica crescida nos substratos ou adicionadas via ração pode auxiliar no melhor desempenho dos peixes.

Após a seleção das bactérias através dos testes descritos acima, foram montados dois consórcios: o primeiro foi constituído pelas bactérias nitrificantes, que foi utilizado no tratamento T4; e o segundo foi formado por bactérias pertencentes as BHC, constituídos por *Bacillus* sp. Esse consórcio foi empregado no tratamento T3, como iniciador do perífiton, e no tratamento T5 adicionado via ração. A seguir estão os resultados do teste *in vivo* utilizando esses consórcios bacterianos.

#### 4.1.9.2 Bactérias nitrificantes

Na Tabela 17 encontram-se os resultados enzimáticos e de formação de biofilme dos representantes das bactérias nitrificantes selecionadas para a realização do teste de antagonismo.

Tabela 17 - Caracterização das cepas bacterianas nitrificantes selecionadas para o teste de antagonismo.

Cepas	Identificação	Gram	Enzimas	Agregação	EPS
N02	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	-	-	+	-
N03	<i>Brevibacterium</i> sp.	+	Lip-Fosf-Gel-Cel	+	+
N04	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	-	-	-	-
N07	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	Cas-Lip-Fosf	+	+
N14	<i>Thauera phenylacetica</i>	-	-	-	-
N21	<i>Thauera phenylacetica</i>	-	Ami-Lip-Fosf-Cel	+	+
N25	<i>Buttiauxella agrestis</i>	-	Ami-Lip-Fosf-Cel	+	+
N28	<i>Enterobacter</i> sp.	-	Cas-Ami-Lip-Fosf	+	+
N36	<i>Brevundimonas</i> sp.	-	Lip-Fosf	+	+
N40	<i>Burkholderia</i> sp.	-	Cas-Lip-Fosf-Gel	+	+

Fonte: elaborada pela autora.

Cas = Caseínase; Lip = Lipase; Gel = Gelatinase; Fosf = Fosfolipase; Cel= Celulase

Na Tabela 18 estão os resultados do teste de antagonismo *in vitro* entre as cepas nitrificantes. A partir desse teste várias combinações podem ser feitas.

Tabela 18 - Resultado do teste de antagonismo entre as cepas de bactérias representantes das nitrificantes.

Cepas	N02	N03	N04	N07	N14	N21	N25	N28	N36	N40
<i>R. rosettiformans</i>	N02	*	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacterium</i> sp.	N03		*	-	+	-	-	-	-	-
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	N04			*	-	+	+	-	-	+
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	N07				*	-	+	-	-	-
<i>T. phenylacetica</i>	N14					*	+	-	+	+
<i>T. phenylacetica</i>	N21						*	-	-	-
<i>B. agrestis</i>	N25							*	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	N28								*	-
<i>Brevundimonas</i> sp.	N36									*
<i>Burkholderia</i> sp.	N40									

Fonte: elaborada pela autora.

-: Antagonismo negativo; +: Antagonismo positivo.

De acordo com os resultados do teste de antagonismo foram eleitas as seguintes cepas para compor o consórcio: *Rhizobium rosettiformans* (N2), *Brevibacterium* sp. (N3), *Thauera phenylacetica* (N21), *Buttiauxella agrestis* (N25), *Enterobacter* sp. (N28) e *Brevundimonas* sp. (N36).

Os critérios adotados para a construção do consórcio, além do resultado negativo de antagonismo, foram os resultados obtidos no teste enzimático e formação de biofilme (TABELA 17). Sendo eleito o máximo de cepas possíveis que apresentaram os melhores resultados enzimáticos, para serem aplicados no cultivo de tilápia do Nilo como iniciadoras do perifíton, formando o tratamento T4.

A produção de enzimas extracelulares pelas bactérias, como as proteases, tem sido relatada como sendo promissor nos processos de biorremediação (ALY; MOHAMED; JOHN, 2008).

O uso de consórcio de bactérias nitrificantes tem sido relatado como sendo mais eficiente do que o uso de culturas puras, além de formarem biofilmes mais estáveis (STEINMULLER; BOCK, 1976; KUMAR *et al.*, 2013).

## 4.2 Delineamento experimental 2

### 4.2.1 Qualidade de água

As variáveis físico-químicas da água não variaram significativamente entre os tratamentos ao longo do período de cultivo (TABELA 19). Os valores médios de temperatura ( $29,1 \pm 0,18^\circ\text{C}$ ), pH ( $8,67 \pm 0,2$ ) e oxigênio dissolvido ( $6,6 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) de todos os

tratamentos estão dentro da faixa adequada para o crescimento de tilápia do Nilo (REBOUÇAS *et al.*, 2016; HAQUE *et al.*, 2013). A introdução de substratos para o desenvolvimento do perifíton espontâneo, assim como a inclusão de bactérias no sistema de cultivo não alterou a qualidade de água, mantendo estáveis os parâmetros.

Tabela 19 - Variáveis de qualidade de água dos tanques de cultivo de tilápia do Nilo nos diferentes tratamentos empregados ao longo do período experimental.

Variável	T1	T2	T3	T4	T5
Temp. (°C)	29,1 ± 2,9	29,4 ± 2,9	29,0 ± 2,9	29,3 ± 2,7	29,0 ± 2,9
pH	8,69 ± 1,31	8,41 ± 1,34	8,89 ± 1,25	8,55 ± 1,28	8,85 ± 1,19
Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )	6,92 ± 3,02	6,84 ± 2,75	5,68 ± 3,05	6,45 ± 2,75	7,14 ± 3,10
Alcalinidade total (mg L <sup>-1</sup> eq. CaCO <sub>3</sub> )	126,67 ± 16,58	129,81 ± 10,46	124,90 ± 12,15	131,36 ± 3,87	123,08 ± 14,59
Dureza total (mg L <sup>-1</sup> eq. CaCO <sub>3</sub> )	146,97 ± 34,34	151,94 ± 41,62	143,16 ± 37,44	150,52 ± 45,19	140,81 ± 32,39
NAT (mg L <sup>-1</sup> )	0,059 ± 0,024	0,055 ± 0,025	0,057 ± 0,037	0,061 ± 0,015	0,053 ± 0,031
Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )	0,006 ± 0,002 <b>b</b>	0,002 ± 0,001 <b>c</b>	0,018 ± 0,006 <b>a</b>	0,013 ± 0,008 <b>ab</b>	0,05 ± 0,002 <b>b</b>
Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	0,0003 ± 0,0001	0,00114 ± 0,0001	0,00 ± 0,00	0,0032 ± 0,0002	0,00 ± 0,00
Ortofosfato (mg L <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,07	0,18 ± 0,08	0,19 ± 0,13	0,22 ± 0,12	0,18 ± 0,10

Fonte: elaborada pela autora.

Para cada variável, letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Ausência de letras representa falta de significância estatística ( $ns; p > 0,05$ ).

A alcalinidade total variou de 123 a 131 mg L<sup>-1</sup>, no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos. O mesmo padrão foi observado para dureza total, a qual variou de 140 a 151 mg L<sup>-1</sup>. Tanto a alcalinidade da água como a dureza total permaneceram sempre acima do mínimo recomendado para o cultivo de tilápias, não sofrendo influência em relação à presença de perifíton (CAVALCANTE *et al.*, 2014).

Os compostos nitrogenados, nitrogênio amoniacal total (NAT) e nitrato, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Enquanto, as concentrações de nitrito foram maiores no tratamento T3 (0,018 mg L<sup>-1</sup>), diferindo significativamente dos tratamentos T1, T2 e T5. O uso dos consórcios bacterianos como iniciador do perifíton domesticado, nos tratamentos T3 e T4, também contribuíram para a manutenção dos

compostos nitrogenados na água, não trazendo prejuízos para o cultivo. Esses resultados vão de acordo com os apresentados por Suantika *et al.* (2012) que verificaram baixos níveis de compostos nitrogenados na água de cultivo do camarão *M. rosenbergii* quando fez uso de substrato vertical têxtil em conjunto de bactérias nitrificantes.

A aplicação de bactérias probióticas via ração também é reconhecida na literatura em auxiliar na redução de matéria orgânica na água de cultivo (HAROUN; GODA; KABIR, 2006). O tratamento T5, o qual foi constituído pela adição de consórcio de *Bacillus* sp. na ração, também não trouxe prejuízos a qualidade de água. De acordo com Tuan, Duc e Hatai (2013) bactérias do gênero *Bacillus* sp. tem sido utilizado eficientemente na conversão de matéria orgânica da água de cultivo em biomassa microbiana, a qual é disponibilizada e pronta para ser consumida pelos animais do cultivo. Ferreira *et al.* (2015) não observaram diferença significativa nos parâmetros de qualidade de água, quando cultivaram a espécie *Penaeus vannamei* em sistema de bioflocos alimentados com ração adicionada de um mix de *Bacillus* sp. probióticos isolados dos flocos microbianos.

Haque *et al.* (2013) em sistema de policultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e camarão (*Macrobrachium rosenberguii*) na presença de substrato para desenvolvimento de perifíton espontâneo observaram baixas concentrações dos compostos nitrogenados na água.

O mesmo foi observado pelos autores Suantika, Turendro e Situmorang (2017), o qual estudaram o efeito da adição de bactérias nitrificantes combinado com uso de substrato tridimensional de bambu no cultivo do camarão *Macrobrachium rosenberguii* em sistema de cultivo *indoor*, e constataram que houve redução do acúmulo de nitrogênio inorgânico tóxico em nitrato, mantendo baixos níveis de amônia e nitrito.

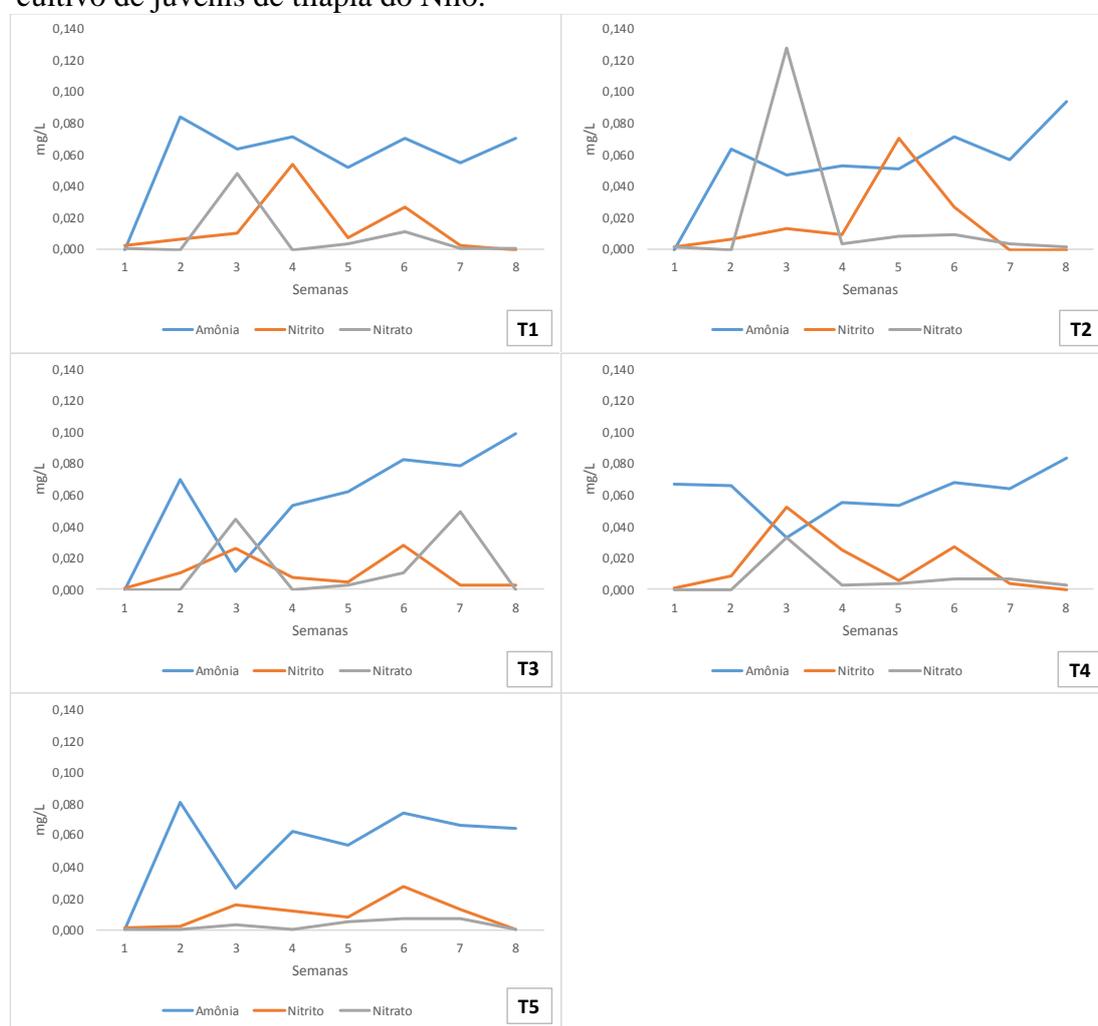
A concentração de ortofosfato também se manteve estável independente do tratamento utilizado, não havendo diferença significativa. No entanto, pode-se observar que os valores de ortofosfato foi numericamente maior no tratamento T4 (0,22 mg L<sup>-1</sup>), onde o perifíton foi iniciado pelo consórcio de bactérias nitrificantes. Esse resultado sugere que nesses tanques havia uma maior taxa de mineralização de matéria orgânica pelas bactérias heterotróficas, liberando mais ortofosfato para a água.

De acordo com Hasan *et al.* (2012) a qualidade de água em corpos hídricos naturais lênticos é fortemente influenciado pelos processos autotróficos e heterotróficos. Nos sistemas baseados em perifíton, a estreita ligação entre os processos autotróficos e heterotróficos nos substratos perifíticos aceleram o ciclo dos nutrientes, influenciando positivamente a qualidade de água.

De acordo com o Gráfico 7, o primeiro pico de amônia na água de cultivo dos

juvenis de tilápia ocorreu na segunda semana, em todos os tratamentos empregados. No entanto, os maiores valores foram observados nos tratamentos T1 e T5, sendo iguais a 0,084 e 0,081 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesses tratamentos não havia a presença de substratos para o desenvolvimento do perifíton (espontâneo ou domesticado). No decorrer do experimento, as concentrações de NAT seguiram padrão semelhante de variação entre os tratamentos, e na última semana foi observado aumento em todos os tratamentos, com exceção do T5, o qual apresentou menor valor (0,064 mg L<sup>-1</sup>), entretanto, as diferenças não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 7 - Acompanhamento semanal dos compostos nitrogenados na água de cultivo de juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborado pela autora.

Enquanto a concentração de nitrito, entre a primeira e segunda semana, foi maior no tratamento T4 (0,052 mg L<sup>-1</sup>), indicando a atividade do consórcio bacteriano nitrificante adicionado como iniciador do perifíton. A quantidade de amônia presente no cultivo

provavelmente era convertida rapidamente em nitrito pelas bactérias presentes no perifíton domesticado. Alguns autores relatam que o crescimento das bactérias nitrificantes é mais lento em comparação ao das heterotróficas (FURTADO; POERSCH; WASIELESKY, 2015). Dessa forma, pode-se observar que a adição de bactérias nitrificantes nos sistemas baseado em perifíton oferece vantagens ao cultivo de peixes, uma vez que o processo de nitrificação já é iniciado logo nas primeiras semanas, diferente dos demais tratamentos que dependem do desenvolvimento das bactérias nitrificantes para que ocorra o processo.

O pico da concentração de nitrato foi observado na terceira semana em todos os tratamentos, com exceção do T5. As concentrações de nitrato na água em todos os tratamentos sempre ficaram abaixo das recomendações para o cultivo de tilápia. Isso pode ter ocorrido, provavelmente, por causa do processo de desnitrificação que estava ocorrendo em todos os tanques, independente do tratamento empregado. Assim, o nitrato formado era logo transformado em nitrogênio gasoso. Outra possibilidade era a assimilação pela biomassa fitoplanctônica presente na água e nos substratos, uma vez que essa é a forma nitrogenada rapidamente assimilada pelos vegetais.

#### ***4.2.2 Desempenho zootécnico***

A sobrevivência dos peixes não apresentou diferença significativa entre os tratamentos empregados, no entanto, o tratamento T3 apresentou, numericamente, a menor taxa de sobrevivência em relação aos demais tratamentos.

Os peixes dos tratamentos T2 e T4 apresentaram peso médio final significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que os demais tratamentos (TABELA 20),  $39,24 \pm 0,95$  e  $39,48 \pm 11,19$  g, respectivamente.

Tabela 20 - Desempenho zootécnico dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nos diferentes tratamentos empregados ao longo do período experimental.

Variável	T1	T2	T3	T4	T5
Sobrevivência (%)	75,00 ± 16,6	74,99 ± 12,5	62,50 ± 6,25	72,00 ± 5,7	70,83 ± 6,7
Peso médio (g)	33,18 ± 4,17 <b>b</b> <sup>1</sup>	39,24 ± 0,95 <b>a</b>	31,84 ± 7,72 <b>b</b>	39,48 ± 11,19 <b>a</b>	33,68 ± 2,92 <b>b</b>
Produtividade (g m <sup>-3</sup> dia <sup>-1</sup> )	8,38 ± 1,98 <b>ab</b>	9,91 ± 2,38 <b>a</b>	6,69 ± 1,13 <b>b</b>	7,75 ± 3,59 <b>b</b>	8,10 ± 1,54 <b>ab</b>
FCA	1,10 ± 0,09 <b>b</b>	1,01 ± 0,13 <b>c</b>	1,32 ± 0,12 <b>a</b>	1,19 ± 0,25 <b>b</b>	1,14 ± 0,07 <b>b</b>
TEP	2,41 ± 0,20 <b>ab</b>	2,60 ± 0,37 <b>a</b>	2,00 ± 0,20 <b>b</b>	2,33 ± 0,48 <b>ab</b>	2,32 ± 0,21 <b>ab</b>
TCE (% dia <sup>-1</sup> )	4,41 ± 0,34 <b>a</b>	4,64 ± 0,36 <b>a</b>	4,16 ± 0,19 <b>b</b>	4,17 ± 0,54 <b>b</b>	4,34 ± 0,30 <b>ab</b>
Comprimento final (cm)	11,78 ± 0,54	12,74 ± 1,01	12,18 ± 1,20	12,89 ± 1,04	12,16 ± 0,41
Índice de uniformidade (%)	51,39 ± 9,96 <b>b</b>	59,87 ± 14,79 <b>b</b>	70,63 ± 18,09 <b>a</b>	68,87 ± 9,56 <b>a</b>	67,06 ± 12,75 <b>a</b>

Fonte: elaborada pela autora.

Para cada variável, letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Ausência de letras representa falta de significância estatística ( $ns: p > 0,05$ ).

A presença de placas para desenvolvimento do perifíton se mostrou eficiente como suplemento para o crescimento dos peixes nos tratamentos T2 e T4, porém não foi eficiente no tratamento T3.

Diversos autores relatam que a presença de bactérias crescidas nos substratos submersos é a responsável pelo aumento do crescimento dos organismos cultivados, seja peixe ou camarão, e que o perifíton funciona como suplemento dietético, aumentando o desempenho zootécnico e a produção de enzimas digestivas (ANAND *et al.*, 2013b). Suantika, Turendro e Situmorang (2017) conseguiram maior crescimento e desempenho do camarão *Macrobrachium rosenbergii* ao fazer adição de bactérias nitrificantes combinado com uso de substrato tridimensional de bambu no cultivo.

O peso final dos peixes do tratamento T5, o qual foi alimentado com ração adicionada de cepas probióticas, foi numericamente maior do que os do T1 e T3, apesar de não apresentarem diferença estatística. O consórcio microbiano adicionado na ração aplicada no tratamento T5 foi o mesmo utilizado para a formação do perifíton do T3. Pode-se inferir que o consórcio bacteriano trouxe mais benefícios quando administrado na ração como probiótico, do que quando adicionado para formação do perifíton. A oferta de ração foi feita diariamente, enquanto para a formação do perifíton esse consórcio foi adicionado em um

único momento no cultivo, que foi no início para a formação do perifíton. Provavelmente, se a adição desse consórcio nos tanques do tratamento T3 tivesse sido realizado diariamente ou semanalmente, teria ocasionado efeito positivo sobre o desempenho dos peixes.

Ferreira *et al.* (2015) ao cultivar a espécie de camarão *Penaeus vannamei* alimentados com ração adicionada de *Bacillus* sp. oriundos de flocos microbianos em sistema com bioflocos, não encontraram diferença significativa no desempenho zootécnico dos animais em relação ao controle. Relacionaram esse resultado com a baixa concentração do probiótico adicionada na ração ( $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>) e as boas condições de cultivo. Apesar de não terem encontrado benefícios no crescimento dos camarões, os autores constataram melhorias nos parâmetros imunológicos avaliados, obtiveram aumento na contagem total de hemócitos, proteína total entre outros. Concluíram que o uso de cepas de *Bacillus* sp. isoladas do bioflocos adicionada via ração podem proporcionar maior proteção aos crustáceos contra infecções.

O uso de cepas probióticas tem sido empregado em diversos cultivos de peixes, na tilapicultura tem trazido diversos efeitos benéficos no crescimento e no sistema imune, fortalecendo as tilápias contra diversas enfermidades (ALY; MOHAMED; JOHN, 2008; ETYEMEZ; BALCAZAR, 2016).

A produtividade do pescado foi significativamente maior nos tanques do tratamento T2, constituído pelo perifíton formado espontaneamente, diferindo dos tratamentos T3 e T4, formado pelo perifíton desenvolvido a partir da inoculação dos consórcios microbianos. Já a produtividade dos tratamentos T1 e T5 não diferiram. Esses resultados vão de acordo com Asaduzzaman *et al.* (2009a) que constataram incremento de 16% na produtividade de tilápia quando cultivada na presença de substrato.

O resultado do fator de conversão alimentar (FCA) foi maior no tratamento T3, sendo igual a 1,32, diferindo significativamente dos demais tratamentos. E o menor valor foi obtido no tratamento T2 (1,01). Já os tratamentos T1, T4 e T5 não diferiram entre si. Yu *et al.* (2016) constataram que a suplementação dietética da carpa capim com uso de complexos microbianos crescidos no substrato teve efeito positivo no ganho de peso, no fator de conversão alimentar e na taxa de crescimento específico.

A taxa de eficiência proteica (TEP) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior e melhor no tratamento T2, diferindo do T3. No entanto, não diferiu do T1, T4 e T5. O sistema de cultivo constituído pelo perifíton espontâneo (T2), perifíton formado pelas bactérias nitrificantes (T4) e pela adição do probiótico via ração (T5) contribuiu para o maior aproveitamento da proteína presente na ração, diminuindo, dessa forma, o aporte de

nitrogênio em forma de amônia para a água de cultivo.

Os peixes do tratamento T1 e T2 apresentaram maior taxa de crescimento específico, quando comparados com os peixes do T3 e T4. Não apresentando diferença estatística para o T5. A presença do perifíton espontâneo foi melhor para o crescimento específico (T2), assim como o cultivo em águas verdes sem perifíton (T1) e o cultivo com a presença do probiótico via ração (T5). Asaduzzaman *et al.* (2009a) ao cultivar tilápia do Nilo na presença de substrato para desenvolvimento de perifíton espontâneo obtiveram incremento de 5% do crescimento específico. Zhou *et al.* (2010) obtiveram tilápias com melhores resultados de crescimento específico ao fazer inclusão de *Bacillus coagulans* no cultivo.

As tilápias não apresentaram diferença significativa no comprimento final, independente do tratamento empregado. O comprimento final variou de  $11,78 \pm 0,54$  a  $12,89 \pm 1,04$  cm.

Em relação ao índice de uniformidade, os tratamentos T3, T4 e T5 não diferiram entre si. No entanto, apresentaram diferença significativa em relação ao T1 e T2. Dessa forma, pode-se inferir que a adição dos consórcios microbianos, seja como formador de perifíton ou como probiótico via ração, não influenciou de forma negativa o bem-estar das tilápias, ao contrário, contribuindo para o crescimento mais uniforme.

A presença das bactérias empregadas para formação do perifíton no tratamento T4 (*Rhizobium rosettiformans*, *Brevibacterium* sp., *Thauera phenylacetica*, *Buttiauxella agrestis*, *Enterobacter* sp. e *Brevundimonas* sp.) e adicionadas via ração no T5 (mix de *Bacillus* sp.) não trouxeram prejuízos ao desempenho zootécnico dos peixes. Uma das explicações possíveis pode ser porque algumas dessas espécies bacterianas utilizadas na formação dos consórcios são comumente isoladas da microbiota intestinal da tilápia. Além disso, foi comprovado o efeito probiótico das cepas de *Bacillus* sp. utilizadas. Está bem estabelecido que as bactérias do intestino desempenham um papel importante no metabolismo do hospedeiro, auxiliando no desenvolvimento do epitélio intestinal, sistema imune e na expressão induzida por genes, além de protegerem o hospedeiro contra colonização por patógenos intestinais (JIANG *et al.*, 2011).

O consórcio de *Bacillus* sp. não foi eficiente quando utilizado na formação do perifíton empregado no tratamento T3. Possivelmente pode ter ocorrido efeito antagônico desse mix bacteriano contra outros microrganismos importantes na constituição do perifíton, que auxiliariam no melhor desempenho das tilápias. Já foi comprovado o efeito inibitório de *Bacillus* sp. contra inúmeras bactérias, seja através da produção de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, ou pela competição por espaço e nutrientes (ALY;

MOHAMED; JOHN, 2008; CHEN *et al.*, 2016; ETYEMEZ; BALCAZAR, 2016).

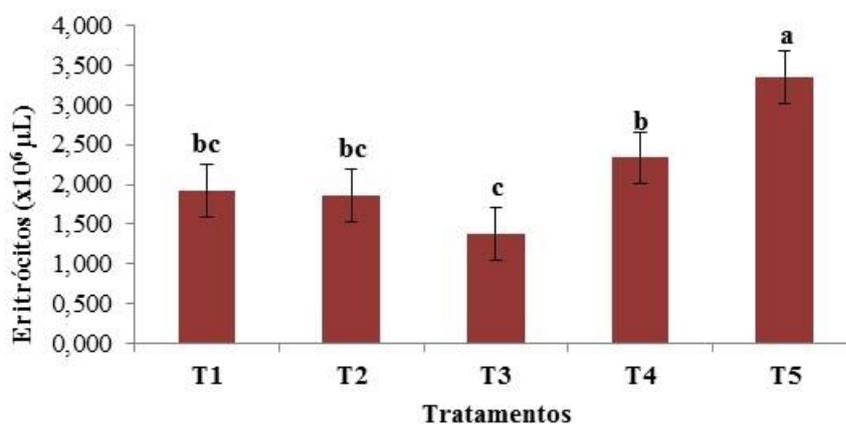
### 4.2.3 Hematologia

#### 4.2.3.1 Eritrograma

A análise dos parâmetros hematológicos é uma boa ferramenta para determinar a saúde dos organismos cultivados. As variações dos parâmetros vão depender da espécie de peixe, idade, maturação sexual, condição de saúde (DHANALAKSHMI; RAMASUBRAMANIAN, 2017; VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007) e tipos de cultivo empregado.

No Gráfico 8 estão apresentados as médias dos valores de eritrócitos dos juvenis de tilápia do Nilo nos diferentes tratamentos. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), onde os peixes do tratamento T5 apresentaram maior valor de eritrócitos ( $3,35 \pm 0,57 \times 10^6 \mu\text{L}$ ) em comparação com os demais.

Gráfico 8 - Valores médios da concentração de eritrócitos dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: elaborado pela autora.

O tratamento T4, apresentou contagem de eritrócitos igual a  $2,33 \pm 0,83 \times 10^6 \mu\text{L}$ , diferindo significativamente do T3, que teve menor valor de contagem,  $1,39 \pm 0,39 \times 10^6 \mu\text{L}$ . No entanto, não diferiu dos tratamentos T1 ( $1,92 \pm 0,45 \times 10^6 \mu\text{L}$ ) e T2 ( $1,85 \pm 0,39 \times 10^6 \mu\text{L}$ ).

Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação sanguínea da maioria dos peixes (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007). Sendo responsáveis pelo transporte de oxigênio

e gás carbônico por meio da combinação da hemoglobina com o O<sub>2</sub>, formando a oxihemoglobina nos órgãos respiratórios e ocorrendo a posterior troca pelo CO<sub>2</sub> tecidual (RANZANI-PAIVA, 2007; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Dessa forma, caso ocorra alguma deficiência nos eritrócitos pode ocorrer falta de oxigênio nos tecidos, além disso, a análise dessas células auxilia no diagnóstico de anemias nos organismos cultivados.

Alguns probióticos podem aumentar o número de eritrócitos, granulócitos, macrófagos e linfócitos em vários peixes (AKHTER *et al.*, 2015). Como foi observado na presente pesquisa, a adição de *Bacillus* sp. na ração elevou a contagem de eritrócitos no sangue das tilápias. O mesmo foi observado no tratamento T4, com uso de bactérias nitrificantes heterotróficas para formação do perífíton.

Os valores de hematócrito não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos empregados, assim como os valores de hemoglobina (TABELA 21). Esses valores de hematócrito encontrados na presente pesquisa estão abaixo dos encontrados por Aly, Mohamed e John (2008) em tilápias alimentadas com ração adicionada de probiótico. Feldman, Zinkl e Jain (2006) estabeleceram que o intervalo do hematócrito entre 20 a 45% e a concentração de hemoglobina entre 5 e 10 g/dL são considerados valores normais para peixes saudáveis. Dessa forma, pode-se afirmar que as tilápias da presente pesquisa estavam em ótimo estado de saúde.

Tabela 21 - Valores médios do hematócrito (HTC), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Parâmetros	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
HTC (%)	20,25 ± 4,60	20,00 ± 1,22	23,42 ± 5,00	21,50 ± 1,80	23,00 ± 1,95
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	5,22 ± 1,60	5,63 ± 0,83	6,58 ± 0,50	5,27 ± 0,32	6,62 ± 0,84
VCM (fL)	107,67 ± 26,62 <b>b</b>	111,36 ± 21,14 <b>b</b>	165,66 ± 15,05 <b>a</b>	100,54 ± 36,7 <b>b</b>	72,83 ± 4,91 <b>b</b>
HCM (pg)	30,11 ± 3,90 <b>bc</b>	34,77 ± 5,36 <b>c</b>	51,62 ± 7,34 <b>a</b>	26,58 ± 6,89 <b>bc</b>	20,87 ± 2,32 <b>b</b>
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	25,89 ± 2,73 <b>a</b>	28,14 ± 3,83 <b>a</b>	29,89 ± 7,18 <b>a</b>	25,30 ± 2,68 <b>a</b>	28,32 ± 3,21 <b>a</b>

Fonte: elaborada pela autora.

HTC (%): hematócrito; Hb (g dL<sup>-1</sup>): hemoglobina; VCM (fL): volume corpuscular médio; HCM (pg): hemoglobina corpuscular média; CHCM (g dL<sup>-1</sup>): concentração de hemoglobina corpuscular média. Para cada variável, letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Ausência de letras representa falta de significância estatística (ns:  $p > 0,05$ ).

De acordo com Martins *et al.* (2008) a diminuição da contagem de células

sanguíneas vermelhas e hematócrito indicam que os eritrócitos estão sendo afetados ou destruídos com alguma infecção. No presente trabalho não foi observado diminuição dessas variáveis, ao contrário, pode-se observar um aumento dos parâmetros nos tratamentos onde se fez adição das bactérias, apesar de não ter havido diferença significativa. Com exceção da contagem de eritrócitos do tratamento T3, que apresentaram valores mais baixos.

O volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) dos peixes pertencentes ao tratamento T3 foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que os demais tratamentos. A contagem de eritrócitos é utilizada para o cálculo dessas duas variáveis, interferindo de forma direta nos resultados obtidos.

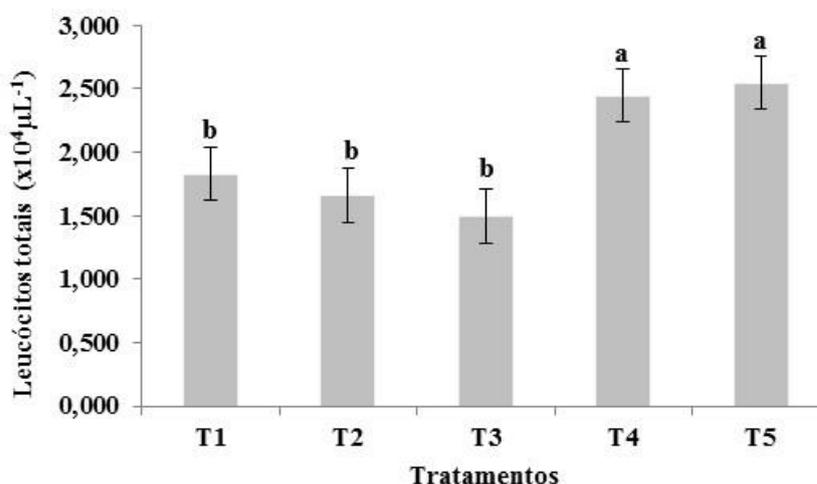
A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.

Esses índices hematimétricos são utilizados para classificação de anemias, variando de acordo com as relações entre contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina, que podem sofrer alterações dependendo da situação de estresse sofrida pelo animal (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Os animais analisados não apresentaram quadro de anemia. Esse resultado demonstra que os *Bacillus* sp. que apresentaram atividade  $\beta$ -hemólise utilizados nos tratamentos T3 e T4 não trouxeram prejuízos hematológicos as tilápias. De acordo com Vesterlund *et al.* (2007) a hemólise é um fator de virulência comum entre os patógenos, facilita a disponibilidade de ferro para os micro-organismos e causa anemia e edema no hospedeiro.

#### 4.2.3.2 Leucograma

Os valores de leucócitos foram maiores no sangue dos peixes do tratamento T4 e T5, sendo iguais a  $2,45 \pm 0,93$  e  $2,55 \pm 0,29 \times 10^4 \mu\text{L}$ , respectivamente, sem diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ; GRÁFICO 9). No entanto foram diferentes estatisticamente dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ), os quais apresentaram menores valores.

Gráfico 9 - Leucócitos totais dos juvenis de tilápia do Nilo sob diferentes tratamentos.



Fonte: elaborado pela autora.

Os leucócitos também definidos como glóbulos brancos são as células sanguíneas responsáveis pela defesa humoral celular do organismo (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007), os quais utilizam a via sanguínea para realizar o monitoramento de possíveis infecções e danos teciduais (SATAKE *et al.*, 2009).

A contagem elevada de leucócitos no tratamento T4 e T5 indica um aumento no fortalecimento do sistema imune das tilápias. As bactérias utilizadas nesses tratamentos trouxeram benefícios para o sistema de defesa orgânica dos peixes. De acordo com Nakandakare *et al.* (2013), o fornecimento de bactérias com capacidade probiótica na dieta pode provocar imunoestimulação, ocasionando um alerta/preparo para possíveis infecções. Apesar dos autores não terem observado alteração nos parâmetros sanguíneos de células brancas com o fornecimento do probiótico *B. subtilis* e *B. cereus* na dieta de juvenis de tilápia do Nilo, indo contrário aos resultados encontrados na presente pesquisa. Enquanto Jatobá *et al.* (2011) observaram aumento do número de leucócitos em tilápias alimentadas com probióticos.

Pode-se observar que a adição não somente de bactérias na dieta (T3), mas como iniciador do perifíton, representado pelo tratamento T4, trouxe melhorias para o sistema de defesa orgânica das tilápias.

Na Tabela 22 está apresentado a contagem diferencial dos leucócitos dos juvenis de tilápia do Nilo. Para a contagem dos linfócitos, pode-se observar que os peixes do tratamento T3 e T4 não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Exibiram maiores valores,  $68,00 \pm 2,63\%$  e  $69,00 \pm 3,02\%$ , diferindo ( $p < 0,05$ ) do tratamento T1.

Tabela 22 - Contagem diferencial de leucócitos do sangue dos juvenis de tilápia do Nilo após o cultivo empregando os diferentes tratamentos.

Parâmetros	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
<b>LINFÓCITOS (%)</b>	59,20 ± 3,40 <b>b</b>	59,90 ± 4,88 <b>ab</b>	68,00 ± 2,63 <b>a</b>	69,00 ± 3,02 <b>a</b>	63,90 ± 5,27 <b>ab</b>
<b>NEUTRÓFILOS (%)</b>	34,20 ± 9,49	33,85 ± 9,2	27,50 ± 10,20	27,30 ± 6,11	30,50 ± 4,65
<b>MONÓCITOS (%)</b>	3,00 ± 0,80	2,80 ± 0,80	2,70 ± 0,81	2,50 ± 0,45	2,80 ± 0,7
<b>EOSINÓFILOS (%)</b>	2,65 ± 0,05	2,51 ± 1,00	0,89 ± 0,05	0,70 ± 0,04	1,60 ± 0,80
<b>BASÓFILOS (%)</b>	0,95 ± 0,05	0,94 ± 0,05	0,91 ± 0,05	0,50 ± 0,20	1,20 ± 0,55

Fonte: elaborado pela autora.

Para cada variável, letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Ausência de letras representa falta de significância estatística ( $ns: p > 0,05$ ).

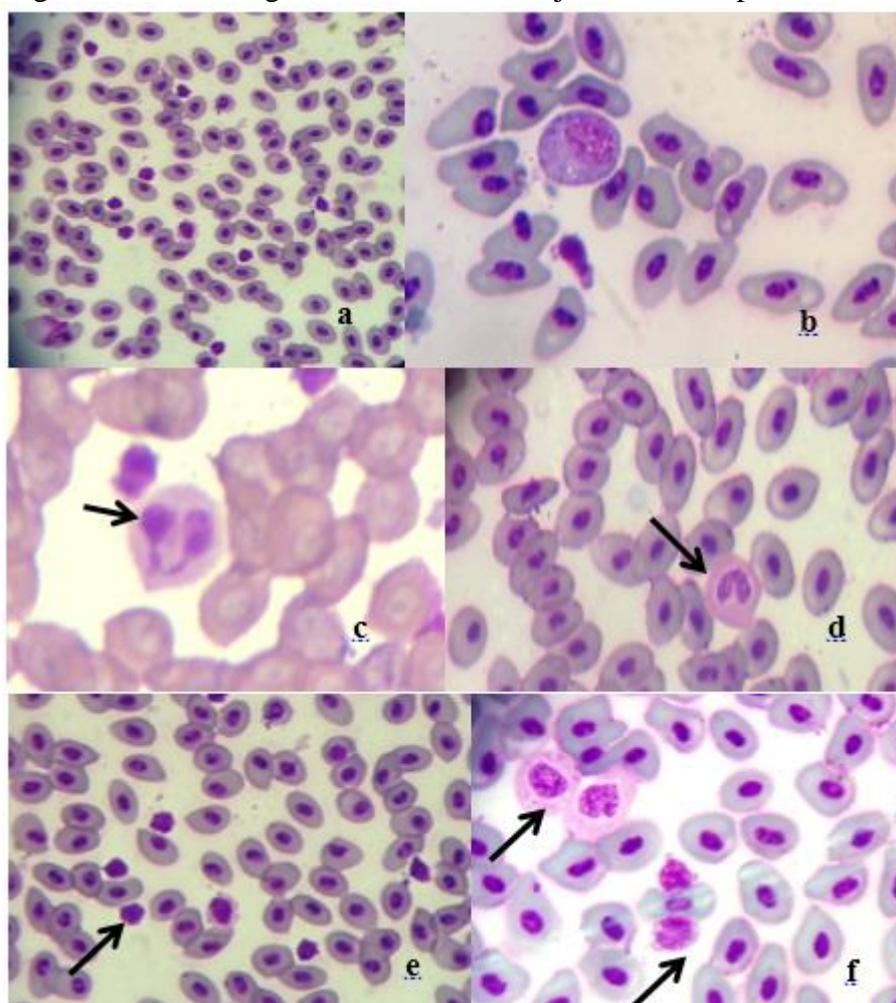
Os linfócitos possuem diversas funções no organismo, todas de extrema importância para o sistema imunitário, interagindo em um complexo de células e moléculas específicas, tendo por função reconhecer agentes agressores defendendo o organismo de sua ação, a fim de manter a integridade e equilíbrio do mesmo, dividindo-se em três tipos: linfócitos T, B e NK (NETO *et al.*, 2009). São importantes na produção de anticorpos e resposta celular humoral, representando a quase totalidade dos leucócitos (FALCON *et al.*, 2008).

Elevados valores de linfócitos e leucócitos foram obtidos em tilápias cultivadas com adição de bactéria ácido-lácticas via ração (JATOBÁ *et al.*, 2011). Esses mesmo autores afirmaram que esse aumento nesses dois parâmetros hematológicos pode ser interessante para resposta inespecífica em relação as infecções. Falcon *et al.* (2008) relataram que tilápias, pós-estresse térmico, tiveram queda no número de células brancas e nos linfócitos. Os autores afirmaram que houve prejuízo nas funções fagocitárias das células, aumentando a susceptibilidade à invasão microbiana, permitindo que infecções se propaguem. Assim, pode-se afirmar que os peixes tratados com adição de bactérias, seja para formação do perifíton ou adicionada via ração não causaram estresse aos animais cultivados, uma vez que não houve diminuição da contagem das células brancas no sangue.

A contagem de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos não diferiram entre os tratamentos empregados. A adição de bactéria no cultivo, seja para formar perifíton ou como probiótico via ração, não influenciou na contagem dessas variáveis. Nem a presença de perifíton espontâneo.

Na Figura 14 estão ilustradas a morfologia de algumas células sanguíneas da tilápia do Nilo. As células sanguíneas mais encontradas foram os eritrócitos (figura a), apresentando formato oval a elipsoidal com núcleo central; os linfócitos foram predominantemente arredondadas, de tamanho variado, com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis (e); os neutrófilos apresentaram-se com formato arredondado com núcleo em forma de bastonete (c e d); e os monócitos são células grandes de formatos esféricos (f) (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012).

Figura 14 - Morfologia dos leucócitos dos juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborado pela autora.

a) Eritrócito; b) Basófilo; c e d) Neutrófilo; e) Linfócito; f) Monócitos.

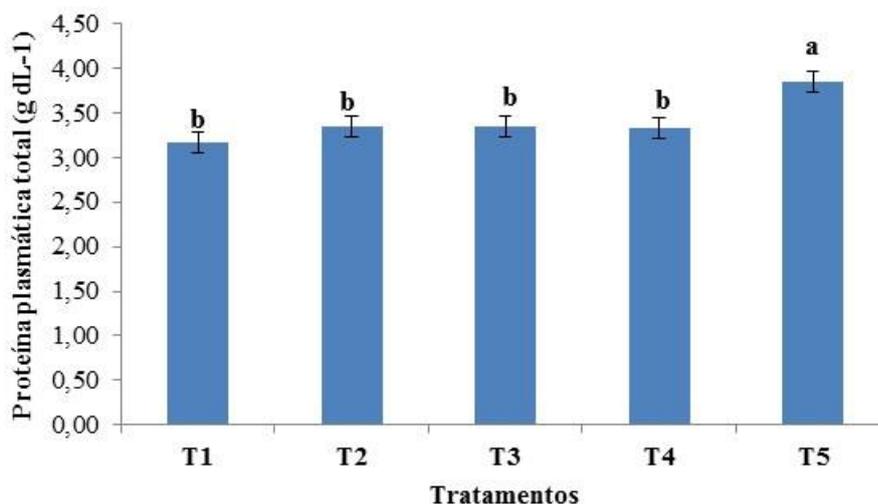
Fonte: Autor

#### 4.2.3.3 Proteína plasmática total

No Gráfico 10 estão apresentados os valores da proteína plasmática total (PPT) das tilápias. O tratamento T5 apresentou maior valor,  $3,84 \pm 0,46 \text{ g dL}^{-1}$ , apresentando

diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 10 - Proteína plasmática total dos juvenis de tilápia do Nilo.



Fonte: elaborado pela autora.

Abdel-Tawwab, Abdel- Rahman e Ismael (2008) observaram incremento e melhoria nos níveis de proteína plasmática total em tilápias do Nilo alimentadas com ração adicionadas do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* em relação ao controle. Concluíram que a determinação desse parâmetro é importante para o diagnóstico em peixes, já que se relaciona ao estado nutricional geral e com a integridade do sistema vascular e função hepática.

El-Rahman, Khattab e Shalaby (2009) determinaram aumento da proteína plasmática total nas tilápias do Nilo quando os peixes foram alimentados com dieta suplementada com *M. luteus*. Sugerindo que essa bactéria pode elevar o sistema imunológico das tilápias tornando-as mais resistentes quando foram desafiadas com *A. hydrophila*.

Os valores de PPT de todos os tratamentos encontram-se na faixa de valores médios de referência para tilápia do Nilo saudáveis, com médias de 3,0 a 7,7 g dL<sup>-1</sup> (FRECCIA *et al.*, 2016).

#### 4.2.4 Desafio *in vivo*

Após as 96h de observação, pode-se constatar alguns sinais clínicos dos peixes nos respectivos tratamentos empregados, como pode ser visto na Tabela 23 e Figura 15.

Tabela 23 - Sinais clínicos observados nas tilápias após 96h do desafio sanitário com injeção intraperitoneal (IP) de *A. hydrophila*.

Tratamentos	n	Sinais clínicos				
		Coloração da superfície da pele		Hemorragias externas		Corrosão das nadadeiras
		Normal	Escura	Abdômen	Nadadeira	
<b>T1</b>	6	1	5	3	3	2
<b>T2</b>	6	4	2	2	0	1
<b>T3</b>	6	4	2	1	0	0
<b>T4</b>	6	4	2	2	0	1
<b>T5</b>	6	4	2	1	0	1

Fonte: elaborado pela autora.

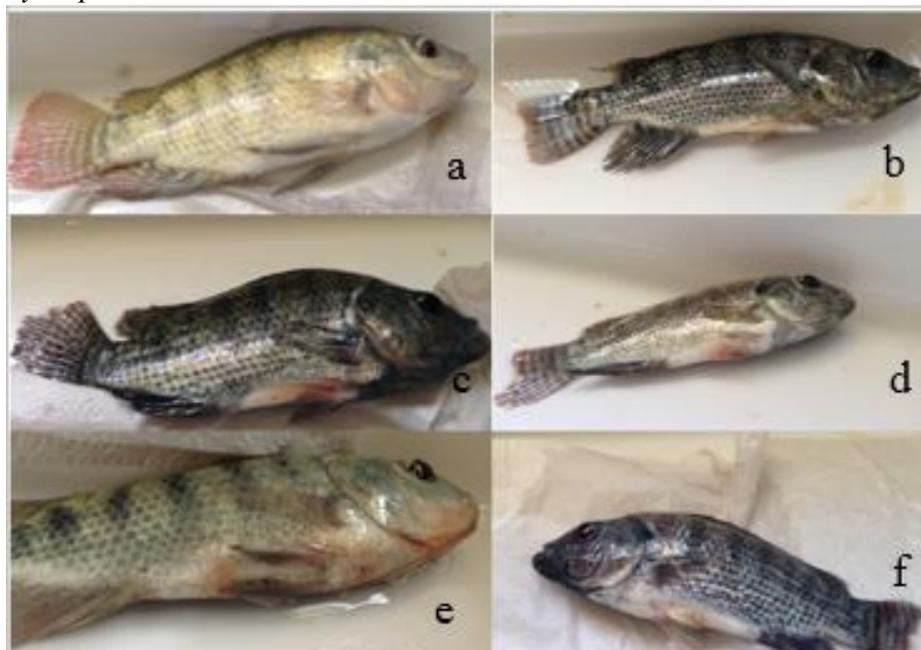
n: número de animais utilizados no teste.

Pode-se observar que os peixes cultivados no tratamento T1, sem perifíton e sem probiótico, apresentaram maior número de peixes com os principais sinais clínicos observados por infecção de *Aeromonas hydrophila*, coloração escura (n=5; 83,3%), hemorragias externas no abdômen e nas nadadeiras (n=3; 50%) e corrosão da nadadeira caudal (n=2, 33,3%). Enquanto os tratamentos que empregaram substrato para desenvolvimento do perifíton (T2, T3 e T4) e adição de consórcio de *Bacillus* sp. via ração apresentaram um padrão semelhante dos sinais clínicos monitorados. Assim, a presença de perifíton espontâneo ou manipulado, e a adição de bactérias probióticas na ração auxiliaram no melhor desempenho das tilápias quando infectadas pela bactéria reconhecida em causar patogenicidade em tilápias.

Aly, Abd-El-Rahman e Mohamed (2008) observaram sinais clínicos de tilápia do Nilo semelhante ao do presente trabalho, com hemorragias no corpo e nas nadadeiras após infecção com *A. hydrophila*.

Anormalidades no comportamento dos peixes descrito por Boijink e Brandão (2001), como natação errática, perda de equilíbrio, permanência dos peixes na parte inferior do aquário e perda de apetite não foram observados.

Figura 15 - Imagens das tilápias após 96h do desafio sanitário com *A. hydrophila*.



Fonte: elaborada pela autora.

a) Peixe com coloração normal; b) Peixe com coloração escura; c) Hemorragia na nadadeira pélvica, nadadeira caudal ruída e coloração escura da pele; d) Hemorragia no abdômen; e) Pontos avermelhados no abdômen; f) nadadeira caudal ruída.

Não foram observadas mortalidades de tilápias de nenhum tratamento durante o desafio sanitário das tilápias contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Associando os resultados positivos nas análises hematológicas com 100% de sobrevivência dos peixes oriundos dos tratamentos T3, T4 e T5, pode-se inferir a segurança e a eficiência do uso desses consórcios microbianos para o cultivo de tilápia do Nilo.

De acordo com Boijink e Brandão (2001) as mortalidades dos peixes vão depender da virulência da estirpe utilizada para causar a infecção, estando associada a produção de enzimas bem como da atividade citotóxica da própria cepa. *A. hydrophila* utilizada no presente trabalho apresentou positividade nos testes enzimáticos *in vitro* produzindo protease, amilase, lipase e  $\beta$ -hemólise em sangue de carneiro a 5%.

El-Rahman, Khattab e Shalaby (2009) desafiaram tilápia do Nilo contra *A. hydrophila* (0,3 mL na concentração de  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) cultivadas durante 90 dias com administração de ração adicionada de *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas* sp. Detectaram que a mortalidade dos peixes durante 14 dias após a injeção IP com *A. hydrophila* diminuiu significativamente em peixes alimentados com dieta suplementado com *M. luteus*, sendo elevada quando os peixes foram alimentados com dieta suplementada por *Pseudomonas*.

Já Abdel-Tawwab, Abdel- Rahman e Ismael (2008) avaliaram a resistência de tilápia do Nilo infectada com *A. hydrophila* injetada intraperitoneal (0,1 mL de *A. hydrophila* na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL) após 12 semanas de cultivo alimentadas com produto comercial a base de *Saccharomyces cerevisiae*. Os peixes foram mantidos em observação durante 10 dias, para registrar os sinais clínicos e a taxa de mortalidade. O aumento da levedura na dieta incrementou a sobrevivência dos peixes durante o desafio.

Aly, Mohamed e John (2008) identificaram que o uso de probióticos durante um mês ofereceu proteção imediata das tilápias quando desafiadas a *A. hydrophila*, e o uso por dois meses pode ser útil a longo prazo.

O nível relativo de proteção de tilápia do Nilo quando submetidas ao desafio de *A. hydrophila* foi significativamente maior quando elas foram tratadas com mix de bactérias (*B. subtilis* e *Lactobacillus acidophilus*) durante um mês de cultivo (ALY; MOHAMED; JOHN, 2008).

## 5 CONCLUSÃO

Como resultado obtido no primeiro experimento, pode-se comprovar a eficiência do perifíton formado espontaneamente sobre a manutenção da qualidade de água e melhoria no desempenho zootécnico dos peixes.

O crescimento do número total de bactérias heterotróficas no perifíton espontâneo parece ter um efeito de controle sobre o número de espécies de gênero *Aeromonas* potencialmente patogênicas para os peixes cultivados. Isso pode ser indicativo de um efeito antagonista ou de controle nessa comunidade devido ao aumento da diversidade e competição entre as bactérias que apresentam ampla capacidade na produção de exoenzimas.

É possível observar uma sucessão espaço temporal entre os micro-organismos constituintes do perifíton, com maior ou menor abundância de bactérias, fungos e fito/zooplâncton, ao longo do desenvolvimento da comunidade. Membros do gênero *Bacillus* representaram o grupo bacteriano dominante entre a comunidade de heterotróficas enquanto que no grupo das bactérias do ciclo do nitrogênio, as cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* figuraram como as mais frequentemente isoladas.

A dinâmica de fungos foi inversa a das bactérias, com números mais elevados no início da formação do perifíton e redução ao longo do período de cultivo tendo o gênero *Aspergillus* como o mais frequente e abundante no biofilme.

No segundo experimento, o desempenho zootécnico das tilápias nos tratamentos valida o perifíton espontâneo ou manipulado como uma fonte suplementar eficiente de alimento para os peixes, favorecendo o crescimento dos animais ao longo do cultivo.

Outro importante aspecto é a via de disposição desses micro-organismos para os peixes, sendo que o consórcio formado pelo mix de bactérias do gênero *Bacillus* foi mais eficiente (com melhores resultados de FCA) quando aplicado como probiótico via ração (T5) do que como parte do biofilme. Isto ocorre provavelmente por que a presença de *Bacillus* proporciona efeitos benéficos aos animais cultivados, como melhor aproveitamento da ração e melhoria no sistema imune. De acordo com o índice de uniformidade, variável relacionada ao bem-estar animal, a introdução exógena de bactérias nos cultivos de juvenis de tilápia trouxeram melhorias no ambiente.

Do ponto de vista do fortalecimento do sistema imunológico dos animais, o uso de bactérias como iniciadoras do perifíton (T3 e T4) e a adição de probióticos via ração (T5) trouxeram melhorias nos parâmetros hematológicos dos peixes quando comparado com os peixes do tratamento T1 e T2. As maiores contagens das células sanguíneas de defesa

orgânica (leucócitos) foram detectadas nos peixes do T4 e T5. E a contagem de eritrócitos e o nível de proteína plasmática total foram mais elevadas no T5. Corroborando com esses resultados, pode-se observar durante o desafio sanitário, que os peixes cultivados com as cepas probióticas apresentaram menor número de sinais clínicos após exposição a *A. hydrophila*.

O conceito de domesticação de micro-organismos benéficos associados ao cultivo de tilápia do Nilo deve ser extrapolado para outros sistemas de cultivo, como a tecnologia dos bioflocos (BFT), a fim de testar a eficiência dessas bactérias como formadoras dos flocos microbianos e na manutenção da estruturação dos mesmos. Além disso, é necessário que novas pesquisas sejam feitas a fim de testar a eficiência de outros consórcios microbianos formados na presente pesquisa como iniciadores do perifíton, tanto bactérias isoladas das BHCs como das nitrificantes heterotróficas em cultivos de escala comercial, e a aplicação em culturas de outros recursos aquáticos.

A aplicação de substratos submersos para desenvolvimento de perifíton no cultivo de organismos aquáticos ou a adição de consórcios microbianos benéficos nesses sistemas, possibilitam uma melhor manutenção da qualidade de água, a qual pode ser reaproveitada em outros ciclos produtivos. Além disso, as trocas de água realizadas são mínimas, o que possibilita a diminuição da entrada de possíveis patógenos nos sistemas estabelecidos, e o reaproveitamento desse bem tão escasso na região Nordeste.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; ISMAEL, N. E. M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*, **Aquaculture**, v. 280, p. 185–189, 2008.
- AKHTER, N. *et al.* Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, p. 733-741, 2015.
- ALLAMEH, S. K. *et al.* Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). **Aquaculture nutrition**, v. 21, p. 1-8, 2015.
- AL-SAAD, A. *et al.* Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin biosynthetic genes, aflD and aflR expression, and phenotypic aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* under different environmental and nutritional regimes Labeed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 123–129, 2016.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALY, S. M.; MOHAMED, M. F.; JOHN, G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 647-656, 2008.
- ANAND, P. S. S. *et al.* Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 392, p. 59–68, 2013a.
- ANAND, P. S. S. *et al.* Effects of C: N ratio and substrate integration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles. **Aquaculture International**, v. 21, p. 511- 524, 2013b.
- ANAND, P. S. S. *et al.* Effect of dietary supplementation of periphyton on growth, immune response and metabolic enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 46, p. 2277-2288, 2014a.
- ANAND, P. S. S. *et al.* Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 418-419, p. 108–115, 2014b.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. 19<sup>th</sup> ed. Washington, DC : American Public Health Association, 2000, 1-10 p.
- ARAÚJO, J. C. *et al.* Comparação de métodos para quantificação de bactérias nitrificantes. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 23, n. 2, p. 299-305, 2018.

- ARNOLD, S. J. *et al.* Intensive production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evaluation of stocking density and artificial substrates. **Aquaculture**, v. 261, p.890–896, 2006.
- ASADUZZAMAN, M. *et al.* C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. **Aquaculture**, v. 280, p. 117–123, 2008.
- ASADUZZAMAN, M. *et al.* Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrates for periphyton developments on pond ecology and production in C/N-controlled freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming systems. **Aquaculture**, v. 287, p. 371–380, 2009a.
- ASADUZZAMAN, M. *et al.* Effects of stocking density of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and addition of different levels of tilapia *Oreochromis niloticus* on production in C/N controlled periphyton based system. **Aquaculture**, v. 286, p. 72–79, 2009b.
- ASADUZZAMAN, M. *et al.* Effects of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. **Aquaculture**, v. 306, p. 127–13, 2010.
- ASKARIAN, F. *et al.* Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens. **Aquaculture**, v. 326–329, p. 1–8, 2012.
- AUDELO-NARANJO, J. M. *et al.* Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1371-1377, 2011.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, A. **Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish**. 4<sup>th</sup> ed. Ellis Horwood: Chichester, 2007, 196-224 p.
- AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering**, v. 34, p. 172-178, 2006.
- AZIM, M. E. *et al.* Optimization of stocking ratios of two Indian major carps, rohu (*Labeo rohita* Ham.) and catla (*Catla catla* Ham.) in a periphyton-based aquaculture system. **Aquaculture**, v. 203, p. 33–49, 2001.
- AZIM, M. E. *et al.* The effects of artificial substrates on freshwater pond productivity and water quality and the implications for periphyton-based aquaculture. **Aquatic Living Resources**, v. 15, p. 231–241, 2002.
- AZIM, M. E. *et al.* Ingestion and utilization of periphyton grown on artificial substrates by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 85-92, 2003a.
- AZIM, M. E. *et al.* Periphyton–water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. **Aquaculture**, v. 228, p. 169–187, 2003b.

AZIM, M. E., WAHAB, M. A. Periphyton-based pond polyculture. In: Azim, M.E., Verdegem, M. C. J., van Dam, A. A., Beveridge, M. C. M. (Eds.), **Periphyton—Ecology, Exploitation and Management**. CABI Publishing, Wallingford, 2005, 207–222 p.

AZIM, M.E.; LITTLE D.E. Intensifying aquaculture production through new approaches to manipulating natural food. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 1, p. 1- 23, 2006. Disponível em <www.cababstractsplus.org/cabreviews>. Acesso em: 20 jan. 2017.

BALLESTER, E. L. C. *et al.* Nursey of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. **Aquaculture**, v. 269, p. 355-362, 2007.

BENDER J, PHILLIPS P. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. **Bioresourche Technology**, v. 94, p. 229–238, 2004.

BIAVASCO, F. *et al.* VanA-Type Enterococci from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3307–3319, 2007.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 588–594, 2006.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 31, n. 4, p. 687-690, 2001.

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Ponds aquaculture water quality management**. Springer: Keuwer Academic Publishers, 1998, p. 700.

BOYD, C.E. Bottom soil and water quality management in shrimp ponds. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 13, n. 1-2, p. 11-33, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Módulo VII. ANVISA: Brasília. 2004. 16 p.

C. A, A. D.; KURUP, B. M. Biofloc Technology: An Overview and its application in animal food industry. **International Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2015.

CAI, Y. *et al.* Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p.177–184, 1999.

CARVALHO, E.; BELÉM-COSTA, A.; PORTO, J. I. R. Identificação bioquímica de bactérias patogênicas isoladas de peixes ornamentais no estado do Amazonas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 1, p. 170-178, 2015.

CAVALCANTE, D. H. *et al.* Lab-scale periphyton-based system for fish culture. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2177-2182, 2011.

CAVALCANTE, D. H. *et al.* Imbalances in the hardness/alkalinity ratio of water and Nile tilapia's growth performance. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 1, p. 49-54, 2014.

CAVALCANTE, D. H. *et al.* Underwater structures for periphyton in bioflocs tanks for Nile tilapia submitted to feed restriction. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 39, n. 2, p. 117-122, 2017a.

CAVALCANTE, D. H. *et al.* Integration between bioflocs and periphyton in Nile tilapia culture tanks. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, p. 601-607, 2017b.

CAVATI, B.; FERNANDES, V. O. Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno – Linhares, Estado do Espírito Santo, Brasil): variação espacial e temporal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 439-448, 2008.

CHEN, Y. *et al.* Isolation and characterization of *Bacillus* spp. M001 for potential application in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) against *Vibrio anguillarum*. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 374-381, 2016.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase- negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, p. 996-1006, 1985.

CHUNG, B. S. *et al.* *Hydrogenophaga caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1126–1130, 2007.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater** (20<sup>th</sup> ed.). Washington, DC: American Public Health Association, 1998.

CLSI/NCCLS- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement**. 19<sup>th</sup> ed. Wayne, PA. v. 29, n. 3, p. 149, 2010.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). 2013. Disponível em <[www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)>. Acesso em 15 jul. 2017.

CRAIG, S.; HELFRICH, LA. **Understanding fish nutrition, feeds and feeding** (Publication 420-256). Virginia Cooperative Extension, Yorktown (Virginia), 2002, 4 p.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 6, 2007.

DEBBAB, A. *et al.* Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. **Microbial Biotechnology**, v. 3, p. 544-563, 2010.

DELBON, M. C.; RANZANI PAIVA, M. J. T. Eugenol em juvenis de Tilápia do Nilo: Concentrações e Administrações sucessivas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n.1, p. 43-52, 2012.

DEMPSTER, P. W.; BEVERIDGE, M. C. M.; BAIRD, D. J. Herbivory in the tilapia *Oreochromis niloticus*: a comparison of feeding rates on phytoplankton and periphyton. **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 385-392, 1993.

DHANALAKSHMI, P.; RAMASUBRAMANIAN, V. Effect of Probiotics and Prebiotics Supplemented Diets on Immune Resistance against *Aeromonas hydrophila* in Mrigal Carp. **Annals of Aquaculture and Research**, v. 4, n. 3, p. 1042, 2017.

DIRINGER, B. *et al.* Peryphyton domestication offers feeds in shrimp culture. **Global Aquaculture**, v. 20, p. 60-62, 2010.

DOGAN, N. M. *et al.* Characterization of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Thermal *Bacillus* and Determination of Environmental Conditions Affecting Exopolysaccharide Production. **International Journal Environmental Research**, v. 9, n. 3, p. 1107-1116, 2015.

DOGGETT, M. S. Characterization of Fungal Biofilms within a Municipal Water Distribution System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1249–1251, 2000.

DOMINGOS, J. A.; VINATEA, L. Efeito do uso de diferentes quantidades de substratos artificiais na engorda do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), em sistema de cultivo semi-intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 1, p. 141-150, 2008.

DOUTERELO, I. *et al.* Microbial analysis of in situ biofilm formation in drinking water distribution systems: implications for monitoring and control of drinking water quality. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, p. 3301–3311, 2016.

DOUTERELO, I. *et al.* Spatial and temporal analogies in microbial communities in natural drinking water biofilms. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 277–288, 2017.

DOWNES M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**. 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC, 2001.

DUQUE, S. E. M. *et al.* Efectos del perifiton sobre los parâmetros físico químicos del agua en estanques com policultivo de tilápia *Oreochromis niloticus* y Bocachico *Prochilodus magdalenae*. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 9, n. 1, p. 41-52, 2012.

DUTTA, D.; GHOSH, K. Screening of extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory gut bacteria as putative probiotics in mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, n. 4, p. 310-318, 2015.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, p. 346–358, 2006.

EGNA, H. S.; BOYD, C. E. **Dynamics of pond aquaculture**. 1<sup>th</sup> ed. Flórida, 1997, 136 p.

EL-RHMAN, AM.; KHATTAB, YA.; SHALABY, AM. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 175-80, 2009.

EL-SAYED, A. F. M. Tilapia Culture. CABI publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom, 2006, 277 p.

EL-SHERIF, M. S.; EL-FEKY, A. M. I. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings.II. Influence of Different Water Temperatures. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, p. 297-300, 2009a.

EL-SHERIF, M. S.; EL-FEKY, A. M. I. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. I. Effect of pH. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 3, 2009b.

ELVERS, K. T. *et al.* Bacterial-fungal biofilms in flowing water photo-processing Tanks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 607–618, 1998.

ERLACHER, A. *et al.* Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 53, 2015.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Interciência/FINEP, 1998, 602 p.

ETYEMEZ, M.; BALCAZAR, J. L. Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 62–64, 2016.

FALCON, D. R. *et al.* Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina c e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 543-551, 2008.

FAN, L. *et al.* Exploration of three heterotrophic nitrifying strains from a tilapia pond for their characteristics of inorganic nitrogen use and application in aquaculture water. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 303-309, 2015.

FAO - Food and Agricultural Organization. **The State of world fisheries and aquaculture-SOFIA**. Roma: FAO, 2016, 224 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, C. N. Schalm's veterinary hematology. 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006. 1344 p.

FERREIRA, G. S. *et al.* Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 448, p. 273–279, 2015.

FRECCIA, A. *et al.* Farinha de inseto em dietas de alevinos de tilápia. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 252, p. 541-547, 2016.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FURNISS, A. L.; LEE, J. V.; DONOVAN, T. J. The *Vibrio*. Monograph Series, London: **Public Health Laboratory Service**, p. 58, 1979.

FURTADO, P. S.; POERSCH, L. H.; WASIELESKY JR., W. The effect of different alkalinity levels on *Litopenaeus vannamei* reared with biofloc technology (BFT). **Aquaculture International**, v. 23, p. 345-358, 2015.

GAMARRA, N. N.; VILLENA, G. K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 545–551, 2010.

GARCIA, F. *et al.* The potential of periphyton-based cage culture of Nile tilapia in a Brazilian reservoir. **Aquaculture**, v. 464, p. 229–235, 2016.

GARCIA, J. *et al.* Acompanhamento da comunidade bacteriana presente no sistema de bioflocos para engorda do camarão *Litopenaeus vannamei*. Santa Catarina, RS, 2014. Disponível em: <<http://eventos.ifc.edu.br>>. Acesso em: 4 mar. 2016.

GAUTHIER, D. T. Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 27-35, 2015.

GHAFOOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. A. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.15, p. 5238–5246, 2011.

GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. **Aquaculture**, v. 448, p. 464–475, 2015.

GOMES, V. D. S. *et al.* Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes - Revisão de Literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 4, p. 259-264, 2016.

GUO, X. *et al.* Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 52, p. 74-84, 2016.

GROSS, A.; BOYD, C. E.; WOOD, C.W. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. **Aquaculture Engineering**, v. 24, p.1-14, 2000.

HAN, T. *et al.* Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. **BioControl**, v. 61, n. 2, p. 195-205, 2015.

HAQUE, M. R. *et al.* Effects of C/N ratio and periphyton substrates on pond ecology and production performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) and tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) polyculture system. **Aquaculture Research**, v. 46. n. 5, p. 1139-1155, 2013.

- HAROUN, E.; GODA, A.; KABIR, M. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1473–1480, 2006.
- HASAN, M. N. *et al.* Effects of addition of tilapia on the abundance of periphyton in freshwater prawn culture ponds with periphyton substrates. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 2, p. 313–324, 2012.
- HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M.; MEURER, F. Exigência de Proteína Digestível para Larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a Reversão Sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.823-828, 2002.
- HIRSCH, D. *et al.* Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.
- HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A HEMATOLOGY OF FISHES. In: HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A HEMATOLOGY OF FISHES. **Schalm'S Veterinary Hematology**. 5<sup>th</sup> ed. Blackburg: Wiley-Blackwell, 1998, 1120-1125 p.
- HU, M. *et al.* Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, n.3, p. 224-233, 2012.
- HUCHETTE, S. M. H. *et al.* The impact of grazing by tilapias (*Oreochromis niloticus* L.) on periphyton communities growing on artificial substrate in cages. **Aquaculture**, v. 186, p. 45–60, 2000.
- HUGUET, J. M.; RIBAS, F. SGAP-10C agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* from water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 81-88, 1991.
- HUNTER, W. J.; KUYKENDALL, L. D.; MANTER, D. K. Rhizobium selenireducens sp. nov.: A Selenite-Reducing a-Proteobacteria Isolated From a Bioreactor. **Current Microbiology**, v. 55, p. 455–460, 2007.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária municipal**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-51, 2016.
- IRIEA, Y. *et al.* Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS** 11, v. 109, n. 50, p. 20632–20636, 2012.
- JACKSON, C. R.; CHURCHILL, P. F.; RODEN, E. E. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. **Ecology**, v. 82, n. 2, p. 555–566, 2001.
- JATOBÁ, A. *et al.* Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology Biochem**, v. 37, p.725–732, 2011.

- JIANG, Y. *et al.* Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 42, p. 499-505, 2011.
- KAMPFER, P. *et al.* *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 341–344, 2005.
- KAUR, J.; VERMA, M.; LAL, R. *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 1218–1225, 2011.
- KAUSHAL, A.; GUPTA, K.; VAN HOEK, M. L. Characterization of *Cimex lectularius* (bedbug) defensin peptide and its antimicrobial activity against human skin microflora. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 470, n. 4, p. 955-960, 2016.
- KHATOON, H. *et al.* Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackish water shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 273, p. 470–477, 2007.
- KIRAN, G. S. *et al.* Antiadhesive activity of poly-hydroxy butyrate biopolymer from a marine *Brevibacterium casei* MS104 against shrimp pathogenic vibrios. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n.114, p.1-12, 2014.
- KUMAR, V. J. R. *et al.* Molecular characterization of the nitrifying bacterial consortia employed for the activation of bioreactors used in brackish and marine aquaculture systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 74-81, 2013.
- KUMAR, S. *et al.* Effect of periphyton on microbial dynamics, immune responses and growth performance in black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. **Indian Journal Fisheries**, v. 62, n. 3, p. 67-74, 2015.
- KUMAR, V. J. R. *et al.* Effect of periphyton (aquamat) on water quality, nitrogen budget, microbial ecology, and growth parameters of *Litopenaeus vannamei* in a semi-intensive culture system. **Aquaculture**, v. 479, p. 240-249, 2017.
- KUSUMANINGRUM, H. P.; ZAINURI, M. Detection of Bacteria and Fungi Associated with *Penaeus monodon* Postlarvae Mortality. **Procedia Environmental Sciences**, v. 23, p. 329 – 337, 2015.
- LAJOIE, C. A. *et al.* Zoogloeal Clusters and Sludge Dewatering Potential in an Industrial Activated-Sludge Wastewater Treatment Plant. **Water Environment Research**, v. 72, n. 1, p. 56-64, 2000.
- LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B. Nitrogen and Phosphorus waste in fish farming. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 591 - 600, 2008.
- LEE, Y. K. Culture and Identification of Bacteria from Marine Biofilms. **The Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p.183-188, 2003.

LEZAMA-CERVANTES, C.; PANIAGUA-MICHEL, J. J.; ZAMORA-CASTRO, J. Biorremediación de los efluentes de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizando tapetes microbianos em um sistema de recirculación. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 1, p. 129-142, 2010.

LI, C. *et al.* Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 18–25, 2015.

LI, Z. *et al.* Microbial succession in biofilms growing on artificial substratum in subtropical freshwater aquaculture ponds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 4, 2017.

LI, H. *et al.* Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on Sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 153–164 2014.

LIANG, Z. *et al.* Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. **Chemosphere**, v. 81, p. 626–632, 2010.

LIMOLI, D. H.; JONES, C. S.; WOZNIAK, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1-30, 2015.

LIN, Y. *et al.* Simultaneous Nitrification and Denitrification in a Membrane Bioreactor and Isolation of Heterotrophic Nitrifying Bacteria. **Japanese Journal of Water Treatment Biology**, v. 40, n. 3, p. 105-114, 2004.

LIU, H. *et al.* The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24430, p. 1-12, 2016.

LIU, P. C; LEE, K. K; CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letter in Applied Microbiology**, v. 22, p. 413-416, 1996.

LIU, R. *et al.* Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. **Science of the Total Environment**, v. 435–436, p. 124–131, 2012.

LONG, L. *et al.* Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 448, p. 135–141, 2015.

LOWRY, T.; SMITH, S. A. Aquatic zoonoses associated with food, bait, ornamental, and tropical fish. **Vet Med Today: Zoonosis Update**, v. 231, n. 6, 2007.

LUO, J. Succession of biofilm communities responsible for biofouling of membrane bioreactors (MBRs). **Plos One**, v. 12, p. 1-23, 2017.

MA, L. *et al.* Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, 2009.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 10<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002, 991 p.

MARÍN, J. C. et al. Nitrobacterias em reactores biológicos rotativos de controle (CBC) de três câmaras bajo diferentes cargas orgânicas. **Revista Tecnocientífica URU**, v. 2012, n. 2, p. 71-82, 2012.

MARQUES, N. R. et al. Níveis Diários de Arraçamento para Alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*, L.) Cultivados em Baixas Temperaturas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 24, p. 97-104, 2003.

MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. et al. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. **Reviews in Aquaculture**, v. 7, p. 131-148, 2015.

MARTINS, ML. et al. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 657-661, 2008.

MCGRAW, W. J. Utilization of Heterotrophic and Autotrophic Bacteria in Aquaculture. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5, n. 6, p. 82-83, 2002.

MECHICHI, T. et al. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. **Archives Microbiology**, v. 178, p. 26–35, 2002.

MERCANTE, C. T. J. et al. Limnologia de viveiro de criação de tilápias do nilo: avaliação diurna visando boas práticas de manejo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 73 – 84, 2011.

METCALF and EDDY, Inc. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse. 3<sup>th</sup> ed. Edition, McGraw-Hill, Inc., Singapore, 1991.

MILSTEIN, A.; PERETZ, Y.; HARPAZ, S. Culture of organic tilapia to market size in periphyton-based ponds with reduced feed inputs. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 55-59, 2009.

MONROY-DOSTA, M. DEL C. et al. G. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 48, n. 3, p. 511-520, 2013.

MOSCHINI-CARLOS, V. Importância, estrutura e dinâmica da comunidade perifítica nos ecossistemas aquáticos continentais. In: POMPEO, M.L.M. (Ed.). **Perspectivas da limnologia no Brasil**. São Luis: União, 1999, 91-103 p.

MRIDULA, R. M. et al. Effects of paddy straw and sugarcane bagasse on water quality, bacterial biofilm production and growth and survival of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 635–642, 2005.

MUKHERJEE, A. *et al.* Potential probiotics from Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. Characterization, pathogen inhibitory activity, partial characterization of bacteriocin and production of exoenzymes. **Research in Veterinary Science**, v. 108, p. 76–84, 2016.

MULLER, H. E. *et al.* Emended Description of *Buttiamella agrestis* with Recognition of Six New Species of *Buttiamella* and Two New Species of *Kluyvera*: *Buttiamella ferragutiae* sp. nov., *Buttiamella gaviniae* sp. nov., *Buttiamella brennerae* sp. nov., *Buttiamella izardii* sp. nov., *Buttiamella noackiae* sp. nov., *Buttiamella warmboldiae* sp. nov., *Kluyvera cochleae* sp. nov., and *Kluyvera georgiana* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 50-63, 1996.

NAKANDAKARE, I. B. *et al.* Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de Tilápias-do-Nilo: Parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, n. 2, p. 121 – 135, 2013.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 2-14, 2010.

NETO, E. C. *et al.* LINFÓCITOS. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. Ano VII – n. 12 - Periódicos Semestral, 2009.

NI, SQ.; ZHANG, J. Anaerobic Ammonium Oxidation: From Laboratory to Full-Scale Application. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-1, 2013.

OLIVEIRA, A. C. Del GROSSI. *et al.* NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes e sua relação com os parâmetros físico-químicos em lodo ativado para remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. **Revista DAE**, n. 192, p. 60 – 69, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na industria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-84, 2010.

OLIVEIRA, S. S. *et al.* Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "Fluorescent *in situ* hybridization" (fish) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica, Rio Grande**, v. 28, n. 1, p. 33-45, 2006.

OLIVER, J. D. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 2005.

ONRAEDT, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 527-533, 2005.

ORSOD, M.; JOSEPH, M.; HUYOP, F. Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. Isolated from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*), **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 170-174, 2012.

ÖZKAYA, F. C. *et al.* Marine fungi against aquaculture pathogens and induction of the activity via co-culture. **CLEAN Soil Air Water**, v. 45, n. 8, 2017.

- PADHI, S. K. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 285–296, 2017.
- PANDEY, P. K.; BHARTI, V.; KUMAR, K. Biofilm in aquaculture production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 13, p. 1434-1443, 2014.
- PANIGRAHI, A.; AZAD, I. S. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 429–440, 2007.
- PEREIRA, C. *et al.* Bacteriophages with Potential for Inactivation of Fish Pathogenic Bacteria: Survival, Host Specificity and Effect on Bacterial Community Structure. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2236-2255, 2011.
- PEREIRA, D. S. P. *et al.* Comparação de metodologias utilizadas na análise dos parâmetros sanguíneos e da proteína total de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 4, p. 893-904, 2015.
- PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, n.1, p. 81- 88, 2005.
- PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11- 36, 2011.
- PINHEIRO, C. A. M. *et al.* Qualidade da água e incidência de fungos em peixes oriundos de pisciculturas do município de São Luís – Maranhão. **Pesquisa em Foco**, v. 20, n. 1, p. 53-69, 2015.
- POLI, M. *et al.* Monitoramento da formação do bioflocos para cultivo do camarão marinho em sistema intensivo com diferentes relações carbono: nitrogênio. *In: III Encontro Nacional dos Núcleos de Pesquisas Aplicadas em Pesca e Aquicultura. Anais... III Encontro Nacional dos Núcleos de Pesquisa aplicada em Pesca e Aquicultura.* Búzios, RJ, 2011.
- POMPÊO, M.L.M.; MOSCHINI-CARLOS, V. Perifíton: estrutura, dinâmica e métodos de estudos. *In: POMPÊO, M. L. M; MOSCHINI-CARLOS, V. Macrófitas aquáticas e perifíton – Aspectos ecológicos e metodológicos.* São Carlos: RiMa, 2003, 63-85 p.
- POSTAI, M. *et al.* Avaliação do potencial probiótico da comunidade bacteriana presente no sistema de bioflocos de engorda de camarão. *In: Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnologia Interdisciplinar, Araquari, Santa Catarina, 12 a 13 de novembro de 2014.* Disponível em: < [https://updoc.site/download/versao-de-impressao-17\\_pdf](https://updoc.site/download/versao-de-impressao-17_pdf)>. Acesso em 12 jul em 2016.
- PREENA, P. G. *et al.* Genetic diversity of nitrate reducing bacteria in marine and brackish water nitrifying bacterial consortia generated for activating nitrifying bioreactors in recirculating aquaculture systems. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 5729–5740, 2017.
- RAMAGE, G. *et al.* *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiology Letter**, v. 324, p. 89–97, 2011.

RAMESH, D. *et al.* Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, p. 268-276, 2015.

RANJEET, K.; HAMEED, P. V. P. S. Evaluation of Three Substrate Bound Periphyton Systems for the Farming of *Oreochromis niloticus* in South India. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 10, n. 4, p. 276-285, 2015.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia como ferramenta para a avaliação da saúde de peixes. In: BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, **Anais...2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes**, Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista, 2007, 47-51 p.

RANZANI-PAIVA, M. J.T. *et al.* **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá-PR: Eduem, 2013, 140 p.

RAY, A. K. *et al.* Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1462-1469, 2010.

REBOUÇAS, V. T. *et al.* Reassessment of the suitable range of water pH for culture of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. in eutrophic water. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 4, p. 361-368, 2016.

REHM, B. Microbial exopolysaccharides: Variety and potential applications. In: **Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives**; Caister Academic: Norfolk, UK, 2009, 229-254 p.

RIBOLDI, G. P. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 125-128, 2009.

RICHARD, M. *et al.* Influence of periphyton substrates and rearing density on *Liza aurata* growth and production in marine nursery ponds. **Aquaculture**, v. 310, p. 106–111, 2010.

RINGO, E.; GATESOUBE, F. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177–203, 1998.

RODRIGUES, D. P. *et al.* Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 589-592, 1993.

RODRIGUEZ-ESTRADA, U. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture Science**, v. 57, p. 609–617, 2009.

ROESELERS, G.; LOOSDRECHT, M. C. M van.; MUYZER, G. Phototrophic biofilms and their potential applications. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 227–235, 2008.

- RUST, L.; MESSING, C.R.; IGLEWSKI, B.H. Elastase assays. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 554-562, 1994.
- RYU, S. H. *et al.* *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1561–1565, 2007.
- SÁ, M. V. C. **Limnocultura**: limnologia para aquicultura. Fortaleza: Edições UFC, 2012, 218 p.
- SAHA, S. *et al.* Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 380-388, 2006.
- SAKR, E. M. *et al.* Evaluation of Periphyton as a Food Source for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles Fed Reduced Protein Levels in Cages. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 27, n. 1, p. 50-60, 2015.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. *In.* : SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. **Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica**. *In.*: TAVARES-DIAS, M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. 1º ed. Macapá: Embrapa Amapá, 2009, 330-45 p.
- SCHEEREN, M. B. *et al.* O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1289–1297, 2011.
- SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimento. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 403- 411, 2005.
- SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 882–894, 2010.
- SHI, P. *et al.* A novel phytase gene *appA* from *Buttiauxella* sp. GC21 isolated from grass carp intestine. **Aquaculture**, v. 275, p. 70–75, 2008.
- SHILTA, M. T., CHADHA, N. K., PANDEY, P. K.; SAWANT, P. B. Effect of biofilm on water quality and growth of *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790). **Aquaculture International**, v. 24, p. 661–674, 2016.
- SILVA, A. S. E.; LIMA, J. T. A. X.; BLANCO, B. S. HEMATOLOGIA EM PEIXES. **Revista Centauro**, v. 3, n. 1, p. 24 - 32, 2012.

- SILVA, C. F. *et al.* Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 507-514, 2008.
- SILVA, J. L. S. *et al.* Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 3, p. 233-241, 2016.
- SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 317–329, 2010.
- SINGH, T. *et al.* Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasitic *Trichoderma* species. **Mycological Progress**, v. 3, n. 3, p. 219–228, 2004.
- SINHA, B.; ANNACHHATRE, A. P. Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v. 6, p. 285–313, 2007.
- SIQUEIRA, V. M.; LIMA, N. Biofilm Formation by Filamentous Fungi Recovered from a Water System. **Journal of Mycology**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- SPRING, S. *et al.* *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 99–106, 2004.
- STALEY, J. T. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. 2th Ed. New York: Springer, v. 2, part B, 2005, 1388 p.
- STEINMULLER, W.; BOCK, E. Growth of *Nitrobacter* in the Presence of Organic Matter I. Mixotrophic Growth. **Archive Microbiology**, v. 108, p. 299-304, 1976.
- SUANTIKA, G. *et al.* Use of Zero Water Discharge Technology through the Application of Nitrifying Bacteria and Textile Vertical Substrate in Grow-Out Phase of *Macrobrachium rosenbergii* De Man. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v.3, n.5, p. 3-5, 2012.
- SUANTIKA, G.; TURENDRO, OR.; SITUMORANG, ML. Use of Nitrifying Bacteria for Promoting Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) Nursery Phase in Indoor System. **Journal of Fisheries and Livestock Production**, v. 5, n. 2, p. 2332-2608, 2017.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141–158, 1998.
- TANT, C.J.; ROSEMOND, A.D.; MEHRING, A. S.; KUEHN, K. A.; DAVIS, J. M. The role of aquatic fungi in transformations of organic matter mediated by nutrients. **Freshwater Biology**, v. 60, p. 1354–1363, 2015.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revistata brasileira de Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 423 – 431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 1, p. 49, 2007.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

THOMPSON, F. L.; ABREU, P. C.; WASIELESKY, W. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. **Aquaculture**, v. 203, p. 263–278, 2002.

TOMÉ, R.; MARQUES, G. **Atlas Micologia**. Grupo de Estudo de Micologia Médica. Disponível em: <[www.atlasmicologia.blogspot.com.br](http://www.atlasmicologia.blogspot.com.br)>. Acesso em 28 abr. 2016.

TORRES, C. A. V. *et al.* Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 148–156, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre, Artmed, 2012, 934 p.

TRIPATHY, S. *et al.* Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. **Microbiological Research**, v. 162, p. 391-396, 2007.

TRIVENI, S. *et al.* Evaluating the biochemical traits of novel *Trichoderma*-based biofilms for use as plant growth-promoting inoculants. **Annals Microbiology**, v. 63, n. 3, 2012.

TUAN, T. N.; DUC, P. M.; HATAI, K. Overview of the use of probiotics in aquaculture. **International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture**, v. 3, n. 3, p. 89-97, 2013.

UDDIN, M. S. *et al.* Technical evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) monoculture and tilapia–prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture in earthen ponds with or without substrates for periphyton development. **Aquaculture**, v. 269, p. 232–240, 2007.

UDDIN, M.S. *et al.* Effects of substrate addition and supplemental feeding on plankton composition and production in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture. **Aquaculture**, v. 297, p. 99–105, 2009.

VAZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**, v. 39, p. 151-160, 2007.

VELUSAMY, K.; KRISHNANI, K. K. Heterotrophic Nitrifying and Oxygen Tolerant Denitrifying Bacteria from Greenwater System of Coastal Aquaculture. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 169, p. 1978–1992, 2013.

VESTERLUND, S. *et al.* Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 325-331, 2007.

- VIAU, V. E.; SOUZA, D. M.; RODRÍGUEZ, E. M.; WASIELESKY JR, W.; ABREU, P. C.; BALLESTER, E. L. C. Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda, Penaeidae). **Aquaculture research**, v. 44, p. 783-794, 2013.
- VIAU, V. R.; MARCIANO, A.; IRIEL, A.; GRECO, L. S. L. Assessment of a biofilm-based culture system within zero water exchange on water quality and on survival and growth of the freshwater shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda*. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 8, p. 2528-2542, 2016.
- VICENTE, I. S. T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C. E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392-398, 2014.
- VIEIRA, B. B.; PEREIRA, E. L. Potencial dos probióticos para o uso na aquicultura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 1223-1241, 2016.
- WANG, M.; HASHIMOTO, M.; HASHIDOKO, Y. Repression of Tropolone Production and Induction of a *Burkholderia plantarii* Pseudo-Biofilm by Carot-4-en9, 10-diol, a Cell-to-Cell Signaling Disrupter Produced by *Trichoderma virens*. **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013.
- WANG, Y. *et al.* Time-resolved analysis of a denitrifying bacterial community revealed a core microbiome responsible for the anaerobic degradation of quinolone. **Scientific Reports-UK**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- WHAL, M. Marine epibiosis I. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p. 175–189, 1989.
- WONG, S.; RAWLS, J. F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 13, p. 3100-3102, 2012.
- WU, S. *et al.* Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2012.
- YOON, J. H. *et al.* *Brevundimonas lenta* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2236–2240, 2007.
- YOSHIDA, K. *et al.* A novel convenient method for high bacteriophage titer assay. **Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)**, v. 53, p. 315-6, 2009.
- YU, E. *et al.* Surface-attached and suspended bacterial community structure as affected by C/N ratios: relationship between bacteria and fish production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 116, p. 1-9, 2016.
- ZHANG, B. Influence of the Artificial Substrates on the Attachment Behavior of *Litopenaeus vannamei* in the Intensive Culture Condition. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 3, n. 1, p. 37- 43, 2011.

ZHANG, J. *et al.* Artificial substrates in zero-water-exchange culture system regulate the rearing performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) under the winter indoor condition. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 91–100, 2016.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 437-440, 2001.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824. 2004.

ZHANG, Z.; BISHOP, P. L. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. **Chemosphere**, v. 50, p. 63–69, 2003.

ZHOU, X. *et al.* Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 36, p. 501–509, 2010.

ZORZAL-ALMEIDA, S.; FERNANDES, V. O. Influência da predação de tilápia (*Oreochromis* sp.) na estrutura da comunidade de algas perifíticas em tanque de piscicultura tropical. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 9, n. 1, p. 49-54, 2014.

**APÊNDICE A - Identificação genotípica das cepas selecionadas de BHC e Nitrificantes.**

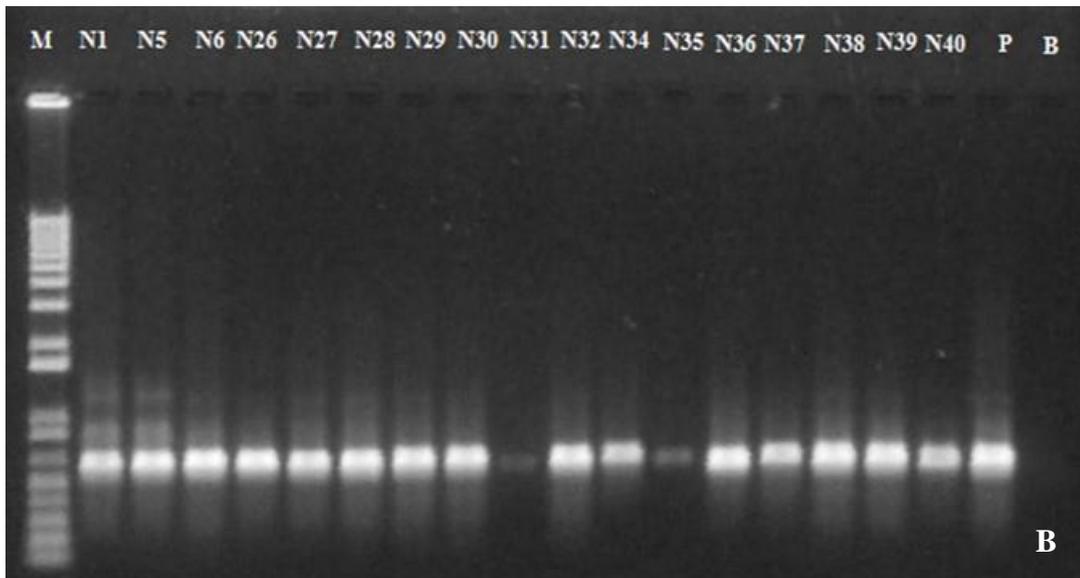
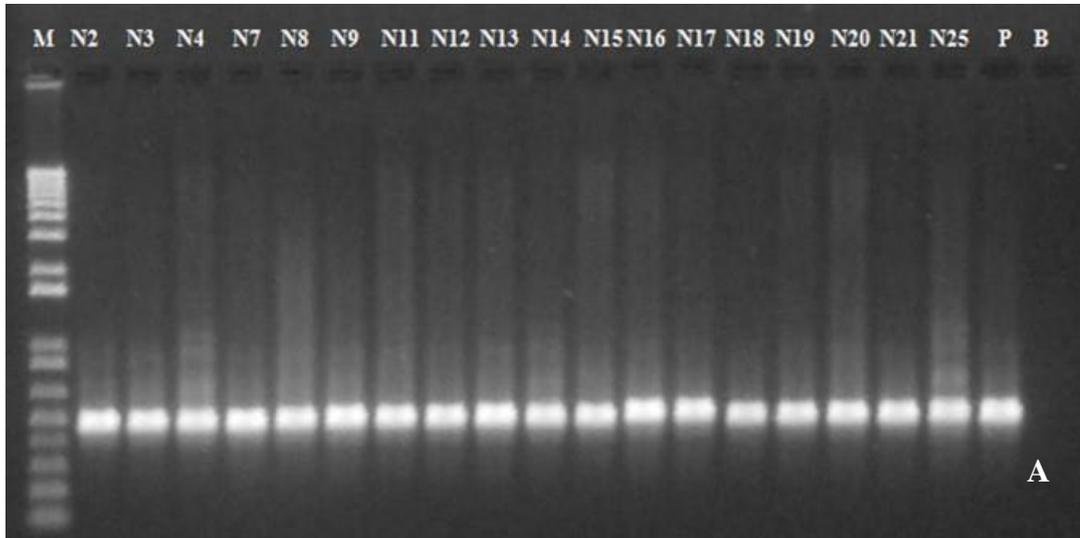
<b>CÓDIGO</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	<b>SIMILARIDADE</b>
9	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
24	<i>Bacillus</i> sp.	99%
27	<i>Bacillus</i> sp.	100%
30	<i>Bacillus</i> sp.	100%
31	<i>Staphylococcus</i> sp.	97%
42	<i>Bacillus</i> sp.	100%
43	<i>Bacillus</i> sp.	100%
44	<i>Bacillus</i> sp.	100%
47	<i>Bacillus</i> sp.	99%
48	<i>Bacillus</i> sp.	100%
51	<i>Bacillus</i> sp.	100%
53	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%
54	<i>Bacillus</i> sp.	100%
57	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%
61	<i>Burkholderia</i> . sp	99%
67	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
70	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
74	<i>Burkholderia</i> . sp	96%
N01	Rhizobiales	89%
N02	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	100%
N03	<i>Brevibacterium</i> sp.	100%
N04	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	96%
N05	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	99%
N06	<i>Brevibacterium</i> sp	100%
N07	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N08	<i>Enterobacter</i> sp.	100%
N09	Enterobacteriaceae	100%
N11	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
N12	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N14	<i>Thauera phenylacetica</i>	100%
N15	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N16	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N17	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N18	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N19	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N20	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N21	<i>Thauera phenylacetica</i>	100%
N25	<i>Buttiauxella agrestis</i>	94%
N26	<i>Thauera phenylacetica</i>	100%
N27	Enterobacteriaceae	100%
N28	<i>Enterobacter</i> sp.	100%
N29	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N30	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
N32	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%

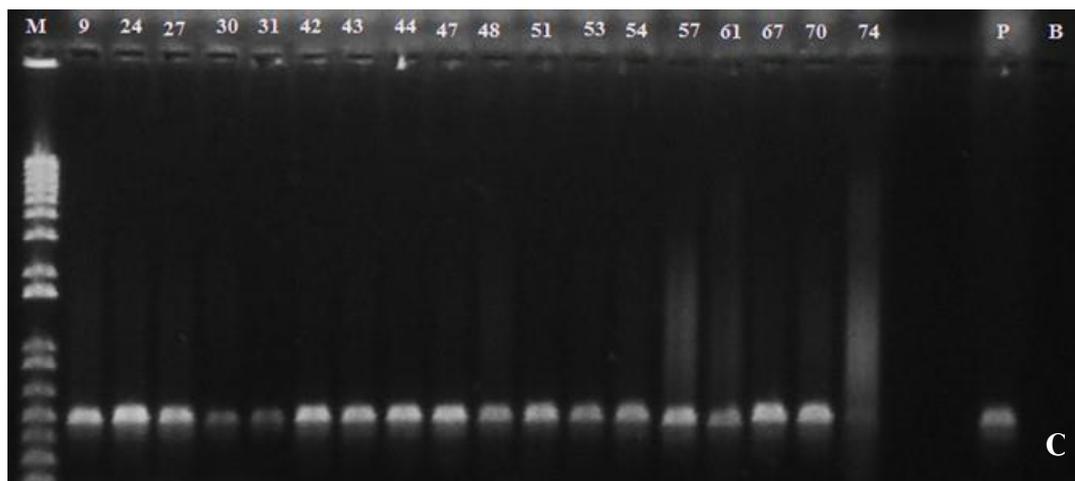
---

N34	<i>Thauera phenylactetica</i>	100%
N35	<i>Thauera phenylactetica</i>	95%
N36	<i>Brevundimonas</i> sp.	99%
N37	<i>Rhizobiales</i>	99%
N39	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
N40	<i>Burkholderia.</i> sp	100%

---

**APÊNDICE B - ELETROFORESE DOS ISOLADOS BACTERIANOS PARA CONFIRMAÇÃO GENOTÍPICA (A E B: BACTÉRIAS NITRIFICANTES; C: BHC).**





M: marcador molecular de 1kb DNA ladder; P: cepa padrão de *Vibrio parahaemolyticus*; B: branco da reação.

**APÊNDICE C- CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS DO PERIFÍTON  
DESENVOLVIDO NATURALMENTE NO SUBSTRATO DURANTE CULTIVO DE  
TILÁPIA DO NILO.**

CEPA	TAMANHO	TEXTURA	COR			COROU MEIO	IDENTIFICAÇÃO
			Centro	Meio	Borda		
1	Médio	Aveludada	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
2	Médio	Aveludada	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
3	Grande	Algodonosa	Branco	Branco	Branco	Sim	<i>Absidia</i>
4	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
5	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
6	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
7	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
8	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
9	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
10	Grande	Algodonosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
11	Pequena	Penungenta	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Fusarium</i>
12	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
13	Grande	Algodonosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
14	Grande	Algodonosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
15	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
16	Média	Arenosa	Amarelo	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
17	Grande	Algodonosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
18	Média	Penungenta	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
19	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
20	Grande	Algodonoso	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Absidia</i>
21	Médio	Arenoso	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
22	Médio	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
23	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
24	Média	Arenosa	Amarelo	Amarelo	Branco	Não	<i>Chrysosporium</i>
25	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>

CEPA	TAMANHO	TEXTURA	COR			COROU MEIO	IDENTIFICAÇÃO
			Centro	Meio	Borda		
26	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
27	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
28	Grande	Furfurácea	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
29	Grande	Furfurácea	Branco	Branco	Branco	Não	<i>Chrysosporium</i>
30	Grande	Furfurácea	Branco	Branco	Branco	Não	<i>Chrysosporium</i>
31	Grande	Furfurácea	Branco	Branco	Branco	Não	<i>Chrysosporium</i>
32	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
33	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
34	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
35	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
36	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
37	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
38	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>
39	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Penicillium</i>
40	Média	Arenosa	Verde	Verde	Branco	Não	<i>Trichoderma</i>
41	Média	Arenosa	Preto	Preto	Branco	Não	<i>Aspergillus</i>

**APÊNDICE D- CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS BHCS.**

CEPA	Identificação	TAV	TMC	AVC	MRS	GEL	FOSF	LIP	ELAS	CAS	CEL	AMI	Hem carneiro	Hem peixe
1	Filo <i>Firmicutes</i>	NI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Corynebacterium</i> sp.	---	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3	<i>Aeromonas</i> sp.	---	++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	β	β
4	<i>Corynebacterium</i> sp.	---	+++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5	Filo Proteobacteria	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
6	Filo Proteobacteria	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
7	<i>Aeromonas</i> sp.	---	++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	---	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	---	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
10	<i>Burkholderia</i> sp.	---	+++	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
11	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	+	-	-	+	-	-	+	+	+	β	β
12	<i>Shigella</i> sp.	---	+++	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
13	<i>Aeromonas</i> sp.	++-	+++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
14	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15	<i>Aeromonas</i> sp.	NI	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
22	<i>Corynebacterium</i> sp.	---	+++	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
23	<i>Serratia</i> sp.	NI	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
24	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
26	<i>Staphylococcus</i> sp.	---	---	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
27	<i>Bacillus</i> sp.	---	--	+	+	-	+	-	-	+	+	+	β	β
28	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	+	+	-	+	-	-	+	-	-	β	β
29	<i>Corynebacterium</i> sp.	---	+++	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
30	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	+	-	-	+	+	-	+	+	+	β	β
31	<i>Staphylococcus</i> sp.	++-	---	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-

NI: não identificado; +++: Aderência forte: bactérias aderiram nos três tubos ou poços; ++: Aderência média, dois tubos; +: Aderência fraca, um tubo; -: Ausente.

CEPA	Identificação	TAV	TMC	AVC	MRS	GEL	FOSF	LIP	ELAS	CAS	CEL	AMI	Hem carneiro	Hem peixe
38	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	+	-	-	+	+	-	+	+	+	β	β
39	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	-	+	-	-	+	-	+	+	+	β	β
40	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	+	-	+	+	-	+	+	+	β	β
41	<i>Bacillus</i> sp.	---	+..	+	-	-	+	-	-	+	+	+	β	β
42	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	+	-	+	+	-	+	+	+	β	β
43	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	-	-	+	-	-	+	+	+	β	β
44	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	+	-	-	+	-	-	+	+	+	β	β
45	<i>Bacillus</i> sp.	---	-..	-	+	-	+	-	-	+	-	+	β	β
47	<i>Bacillus</i> sp.	---	---	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
48	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	β
49	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	β
50	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	-	+	-	-	+	-	+	+	+	β	β
51	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	β
52	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	β
53	<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	+	-	-	-	-	-	+	-	-	β	β
54	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	+	-	-	-	-	-	+	-	+	β	β
56	<i>Corynebacterium</i> sp.	---	+++	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
57	<i>Pseudomonas</i> sp.	+..	+++	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
59	<i>Serratia</i> sp.	---	---	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
60	Filo <i>Proteobacteria</i>	---	---	+	-	-	+	+	-	+	-	-	β	
61	<i>Burkholderia</i> sp.	---	++	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	NI
63	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	-	+	-	-	+	-	+	-	+	β	-
64	<i>Bacillus</i> sp.	---	+++	-	+	-	-	+	-	+	+	+	β	β
65	Filo <i>Proteobacteria</i>	+..	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
66	<i>Pseudomonas</i> sp.	+..	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	β	
67	<i>Pseudomonas</i> sp.	+..	+++	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
69	Filo <i>Proteobacteria</i>	---	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	+++	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
71	<i>Bacillus</i> sp.	---	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
72	<i>Aeromonas</i> sp.	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

NI: não identificado; +++: Aderência forte: bactérias aderiram nos três tubos ou poços; ++: Aderência média, dois tubos; +: Aderência fraca, um tubo; -: Ausente.

APÊNDICE E- CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS BACTÉRIAS NITRIFICANTES.

Numeração	Identificação molecular	TMC	AVC	PROT	AMI	LIP	FOSF	GEL	CEL	HEM carneiro
N01	Rhizobiales	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N02	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
N03	<i>Brevibacterium</i> sp.	+++	+	-	-	+	+	+	+	-
N04	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N05	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	--+	-	-	-	-	-	-	-	-
N06	<i>Brevibacterium</i> sp.	++-	-	-	-	-	-	+	-	-
N07	<i>Pseudomonas</i> sp.	++-	+	+	-	+	+	-	-	-
N08	<i>Enterobacter</i> sp.	---	-	-	-	+	+	-	-	-
N09	Enterobacteriaceae	+++	+	-	-	+	+	-	-	-
N11	<i>Pseudomonas</i> sp.	+++	+	+	+	+	+	-	-	$\beta$
N12	<i>Pseudomonas</i> sp.	+-	+	+	-	+	+	-	-	-
N13	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N14	<i>Thauera phenylacetica</i>	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N15	<i>Pseudomonas</i> sp.	+++	+	+	-	+	+	-	-	-
N16	<i>Pseudomonas</i> sp.	+-	+	+	-	+	+	-	-	-
N17	<i>Pseudomonas</i> sp.	+-	-	+	-	+	+	-	-	-
N18	<i>Pseudomonas</i> sp.	--+	-	+	-	+	+	-	-	-
N19	<i>Pseudomonas</i> sp.	--+	-	+	-	+	+	-	-	-
N20	<i>Pseudomonas</i> sp.	+++	+	+	-	+	+	-	-	-
N21	<i>Thauera phenylacetica</i>	-++	+	-	+	+	+	-	+	-
N25	<i>Buttiauxella agrestis</i>	+++	+	+	+	-	+	-	-	-
N26	<i>Thauera phenylacetica</i>	---	+	-	-	+	-	+	-	-
N27	Enterobacteriaceae	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N28	<i>Enterobacter</i> sp.	++-	+	+	+	+	+	-	-	-
N29	<i>Pseudomonas</i> sp.	-++	+	-	-	+	+	-	-	-
N30	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	-	+	+	-	+	-	-	-
N31	-									
N32	<i>Pseudomonas</i> sp.	-+-	+	-	+	+	+	-	-	-
N34	<i>Thauera phenylacetica</i>	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N35	<i>Thauera phenylacetica</i>	-++	+	-	-	+	+	-	-	-
N36	<i>Brevundimonas</i> sp.	-++	+	-	-	+	+	-	-	-
N37	Rhizobiales	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N38	<i>Pseudomonas</i> sp.	---	-	-	-	-	-	-	-	-
N39	<i>Pseudomonas</i> sp.	-+-	-	-	-	-	-	-	-	-
N40	<i>Burkholderia</i> sp.	--+	+	+	-	+	+	+	-	-

+++ : Aderência forte: três tubos; ++ : Aderência média, dois tubos; + : Aderência fraca, um tubo; - : Ausente.