



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

**CÉLIO HENRIQUE ALEXANDRINO CAVALCANTE**

**ANÁLISE DA MICROBIOTA HETEROTRÓFICA EM ALEVINOS DE  
TILÁPIA: IMPACTOS NA SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO  
DURANTE A ETAPA DE MASCULINIZAÇÃO**

**FORTALEZA**

**2024**

CÉLIO HENRIQUE ALEXANDRINO CAVALCANTE

ANÁLISE DA MICROBIOTA HETEROTRÓFICA EM ALEVINOS DE TILÁPIA:  
IMPACTOS NA SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DURANTE A ETAPA  
DE MASCULINIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recurso Pesqueiro e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof.a Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

Coorientador: Prof. Dr. Esaú Aguiar Carvalho.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C364a Cavalcante, Célio Henrique Alexandrino Cavalcante.

Análise da microbiota heterotrófica em alevinos de tilápia: impactos na sobrevivência e desenvolvimento durante a etapa de masculinização / Célio Henrique Alexandrino Cavalcante Cavalcante. – 2024.

70 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

Coorientação: Prof. Dr. Esaú Aguiar Carvalho.

1. Aquicultura. 2. Larvicultura. 3. Sanidade. 4. Sustentabilidade. I. Título.

CDD 639.2

---

CÉLIO HENRIQUE ALEXANDRINO CAVALCANTE

ANÁLISE DA MICROBIOTA HETEROTRÓFICA EM ALEVINOS DE TILÁPIA:  
IMPACTOS NA SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DURANTE A ETAPA  
DE MASCULINIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recurso Pesqueiro e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 24/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)  
Examinadora Externa ao Programa

A Deus.

Aos meus pais, Ricardo e Jacqueline  
Cavalcante, e aos meus irmãos, Ricardo  
Bruno e Italo Veras.

## AGRADECIMENTOS

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

A minha orientadora, Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes, por todos os momentos em que nunca desistiu de mim, por toda ajuda, conselhos, “puxões de orelha”, dedicação e acima de tudo paciência, durante toda minha jornada na pós-graduação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Esaú Aguiar Carvalho, inicialmente por abrir as portas de seu laboratório para realização de parte das atividades experimentais desse trabalho. Muito obrigado por suas orientações, conselhos e toda contribuição durante essa jornada.

Aos professores participantes da banca examinadora por todas as valiosas contribuições e recomendações em prol do melhoramento do presente trabalho.

Aos meus pais, Francisco Ricardo Cavalcante e Jacqueline Alexandrino Cavalcante, por serem o alicerce da minha vida, por toda educação e todo apoio durante todos esses anos. Obrigado por serem os melhores pais que um filho poderia ter.

Aos meus irmãos Ricardo Bruno e Italo Veras, por todo apoio, admiração e incentivo.

Aos meus amigos de laboratório, Carlos, Daniel, Debora, Igor, Iracilda, Juliana, Raquel, Robério, Samuel e Sara, por toda ajuda, companheirismo, apoio e, principalmente, por tornarem essa jornada mais leve e divertida.

A todos os membros do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), por todo apoio e ajuda. Vocês foram fundamentais para minha formação.

E a todos que, de alguma forma, torceram e me ajudaram para a concretização dessa etapa de minha vida.

## RESUMO

A intensificação da aquicultura, com destaque para a tilapicultura, tem impulsionado a busca por estratégias para otimizar a produção e prevenção de doenças. A caracterização da microbiota intestinal de larvas de tilápia revelou uma dinâmica complexa e fundamental para a saúde dos peixes. O objetivo do presente trabalho foi monitorar e caracterizar a sucessão e desenvolvimento da comunidade bacteriana da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), desde sua eclosão até o final da etapa de masculinização estabelecendo sua influência no desenvolvimento e sobrevivência dos animais cultivados. Para caracterização microbiológica, metodologias de quantificação, isolamento e susceptibilidade a antimicrobianos foram aplicadas. Foram avaliados também os índices zootécnicos e limnológicas para monitoramento dos parâmetros de cultivo, bem como a avaliação da eficiência sanitizante dos ovos coletados com formaldeído 4%. Para isso, aproximadamente 350 g de ovos de tilápia foram coletados em uma fazenda comercial localizada no município de Cascavel/Ceará e levados para o Centro de Estudos Ambientais Costeiros – CEAC. Foi realizado o processo de higienização com posterior transferência dos ovos para a incubadora e, após a total eclosão, foram distribuídas para as unidades de cultivo. Os parâmetros biométricos e de qualidade de água foram medidos periodicamente. Foi utilizado uma densidade de estocagem de 3 larvas/litro. O experimento teve duração de 28 dias, com os animais alimentados com ração comercial em pó contendo 40% de proteína bruta, adicionada de solução hormonal de metil-testosterona 50%, a uma taxa alimentar de 12% da biomassa total. As análises microbiológicas foram realizadas desde a coleta dos ovos, onde duas amostras foram coletadas para processamento, uma sanitizada em solução de formalina e a outra sem a solução. Em seguida, foram realizados mais 4 processamentos microbiológicos, distribuídos a partir do momento de eclosão total dos ovos incubados, em intervalos de 7 dias. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado – LAMAP/LABOMAR/UFC. Os animais foram devidamente eutanasiados por insensibilização em gelo e solução de eugenol. Foram feitas contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis por meio da técnica de Contagem Padrão em Placas (CPP), e a partir do crescimento, foram realizados os isolamentos. Em seguida, a caracterização fenotípica das estirpes isoladas foi realizada seguindo a metodologia proposta no Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey's. O teste de difusão em disco foi utilizado para a realização do antibiograma, sendo utilizado 7 antimicrobianos: Amoxicilina+ácido clavulânico (20/10 µg), Aztreonam (30 µg), Enrofloxacina (5 µg), Estreptomicina (10 µg), Gentamicina (30 µg), Norfloxacina (10 µg) e Tetraciclina (30 µg). Durante todo o cultivo, os parâmetros físicos e químicos mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie. Os resultados zootécnicos também se apresentaram dentro do perfil esperado. A sanitização dos ovos demonstrou ser eficaz na redução da carga microbiana externa. A caracterização da microbiota revelou uma comunidade microbiana dinâmica, com predominância de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Lactobacillaceae, Bacillaceae e Micrococcaceae, respectivamente. A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos revelou algum percentual de resistência das estirpes isoladas, sendo os maiores índices associados ao Aztreonam (29,5%), Estreptomicina (23,5%), Amoxicilina + ácido clavulânico (23,5%). Os resultados obtidos evidenciam a importância do desenvolvimento de estratégias de manejo e cultivo em sistemas intensivos.

**Palavras – chave:** aquicultura; larvicultura; sanidade; sustentabilidade.

## ABSTRACT

The intensification of aquaculture, especially tilapia farming, has driven the search for strategies to optimize production and disease prevention. The characterization of the intestinal microbiota of tilapia larvae revealed a complex and fundamental dynamic for fish health. The objective of this study was to monitor and characterize the succession and development of the bacterial community of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), from hatching to the end of the masculinization stage, establishing its influence on the development and survival of the farmed animals. For microbiological characterization, quantification, isolation and antimicrobial susceptibility methodologies were applied. Zootechnical and limnological indices were also evaluated to monitor the culture parameters, as well as the evaluation of the sanitizing efficiency of the eggs collected with 4% formaldehyde. For this purpose, approximately 350 g of tilapia eggs were collected from a commercial farm located in the municipality of Cascavel/Ceará and taken to the Center for Coastal Environmental Studies (CEAC). The sanitation process was carried out with subsequent transfer of the eggs to the incubator and, after complete hatching, they were distributed to the cultivation units. The biometric and water quality parameters were measured periodically. A stocking density of 3 larvae/liter was used. The experiment lasted 28 days, with the animals fed commercial powdered feed containing 40% crude protein, added with 50% methyl-testosterone hormonal solution, at a feeding rate of 12% of the total biomass. Microbiological analyses were performed from the collection of the eggs, when two samples were collected for processing, one sanitized in formalin solution and the other without the solution. Then, four more microbiological processes were performed, distributed from the moment of complete hatching of the incubated eggs, at intervals of 7 days. The microbiological analyses were performed at the Laboratory of Environmental and Fish Microbiology – LAMAP/LABOMAR/UFC. The animals were properly euthanized by stunning in ice and eugenol solution. Cultivable heterotrophic bacteria were counted using the Standard Plate Count (SPC) technique, and isolations were performed based on growth. Then, the phenotypic characterization of the isolated strains was performed following the methodology proposed in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The disk diffusion test was used to perform the antibiogram, using 7 antimicrobials: Amoxicillin+clavulanic acid (20/10 µg), Aztreonam (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Streptomycin (10 µg), Gentamicin (30 µg), Norfloxacin (10 µg) and Tetracycline (30 µg). Throughout the culture, the physical and chemical parameters remained within the normal range for the species. The zootechnical results were also within the expected profile. Egg sanitation proved to be effective in reducing the external microbial load. The characterization of the microbiota revealed a dynamic microbial community, with a predominance of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Lactobacillaceae, Bacillaceae and Micrococcaceae, respectively. The assessment of antimicrobial sensitivity revealed some percentage of resistance of the isolated strains, with the highest rates associated with Aztreonam (29.5%), Streptomycin (23.5%), Amoxicillin + clavulanic acid (23.5%). The results obtained highlight the importance of developing management and cultivation strategies in intensive systems.

**Keywords:** aquaculture; larviculture; health; sustainability.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fêmea de tilápia durante processo de coleta de ovos .....	29
Figura 2 – Saco de transporte de ovos de tilápia pressurizado com oxigênio .....	30
Figura 3 – Higienização dos ovos em solução de formaldeído 4% .....	31
Figura 4 – Sistema de incubação artificial .....	32
Figura 5 – Sistema de cultivo e unidade de filtragem mecânica e biológica .....	32
Figura 6 – Pesagem dos animais para realização de povoamento .....	34
Figura 7 – Exemplificação do procedimento de preparação de amostras para realização de análise microbiológica .....	36
Figura 8 – Preparo e determinação do número de UFC das bactérias do grupo das heterotróficas cultiváveis totais .....	38
Figura 9 – Crescimento microbiano em ágar TSA para isolamento e identificação fenotípica .....	39
Figura 10 – Coloração de Gram para análise morfotintorial e avaliação de pureza das cepas isoladas de tilápia do Nilo .....	39
Figura 11 – Provas bioquímicas para identificação fenotípica de BHCs isoladas de tilápia do Nilo .....	41
Figura 12 – Fluxograma de execução do teste de sensibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos testados .....	42
Figura 13 – Crescimento microbiano da amostra de ovos sanitizados em solução de formaldeído 4% em meio não seletivo .....	48
Figura 14 – Crescimento microbiano da amostra de ovos não sanitizados em meio não seletivo .....	49
Figura 15 – Crescimento bacteriano obtido da análise microbiológica de tilápia do Nilo durante o processo de masculinização .....	50

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 – Quantificação dos isolados bacterianos quanto à sua classificação morfotintorial .....	52
Gráfico 2 – Identificação fenotípica a nível de gênero das bactérias heterotróficas cultiváveis durante a larvicultura da tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ....	53
Gráfico 3 – Desenvolvimento da microbiota total da tilápia do Nilo durante a fase de larvicultura .....	57
Gráfico 4 – Percentual de resistência a diferentes antimicrobianos de cepas isoladas de tilápia do Nilo durante a fase inicial de cultivo .....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos antimicrobianos de acordo com seus mecanismos de ação ..	27
Tabela 2 – Antibióticos e dosagens usados para avaliação de sensibilidade antimicrobiana .....	43
Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos obtidos a partir de análises realizadas durante o experimento .....	44
Tabela 4 – Resultados zootécnicos obtidos durante o processo de masculinização da tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	46
Tabela 5 – Resultado das Contagens Padrão em Placas, realizadas em duplicata, para quantificação de BHCT .....	48
Tabela 6 – Identificação das estirpes bacterianas isoladas de pool total de larcas de tilápia do Nilo em sistema fechado de cultivo .....	55
Tabela 7 – Resultados da susceptibilidade a antibióticos dos isolados bacterianos da fase larval de tilápias .....	60

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BHC	Bactérias Heterotróficas Cultiváveis
BrCast	BrCAST Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CEAC	Centro de Estudos Ambientais Costeiros
CECON	Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico
CLSI	Norma Brasileira Regulamentar
CPP	Contagem Padrão em Placas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
I	Intermediário
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
MDR	Multidroga Resistente
NaCl	Cloreto de sódio
OD	Oxigênio Dissolvido
ONU	Organização das Nações Unidas
pH	Potencial hidrogeniônico
RAS	Recirculating Aquaculture Systems
RAM	Resistência a Antimicrobianos
RNA	Ácido ribonucleico
R	Resistente
S	Sensível
TGI	Trato Gastro Intestinal
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UND	Unidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>A produção de tilápia no mundo e no Brasil.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>A produção do pescado e seus impactos ambientais .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Sanidade de organismos cultivados .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Microbiota da tilápia do Nilo e a produção de alevinos saudáveis .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Importância do conhecimento microbiológico na aquicultura .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Uso de antimicrobianos na aquicultura .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Local de realização do experimento .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Coleta dos ovos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Recepção e preparação dos ovos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Sistema de incubação .....</b>	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Sistema de cultivo .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Sanitização e maturação biológica do sistema de cultivo .....</b>	<b>33</b>
<b>4.7</b>	<b>Povoamento .....</b>	<b>33</b>
<b>4.8</b>	<b>Protocolo alimentar .....</b>	<b>34</b>
<b>4.9</b>	<b>Análises zootécnicas .....</b>	<b>34</b>
<b>4.10</b>	<b>Análise dos parâmetros físicos e químicos .....</b>	<b>35</b>
<b>4.11</b>	<b>Coleta das amostras para processamento .....</b>	<b>36</b>
<b>4.12</b>	<b>Análise microbiológica – Identificação fenotípica .....</b>	<b>37</b>
<b>4.12.1</b>	<b><i>Quantificação das BHCs .....</i></b>	<b>37</b>
<b>4.12.2</b>	<b><i>Isolamento .....</i></b>	<b>38</b>
<b>4.12.3</b>	<b><i>Coloração de Gram .....</i></b>	<b>39</b>
<b>4.12.4</b>	<b><i>Provas bioquímicas .....</i></b>	<b>40</b>
<b>4.13</b>	<b>Teste de sensibilidade a antimicrobianos .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>

<b>5.1</b>	<b>Qualidade de água .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Desempenho zootécnico .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3</b>	<b>Análises microbiológicas .....</b>	<b>47</b>
<b>5.3.1</b>	<b><i>Quantificação das BHCs .....</i></b>	<b>47</b>
<b>5.3.2</b>	<b><i>Identificação fenotípica .....</i></b>	<b>51</b>
<b>5.3.3</b>	<b><i>Resistência a antimicrobianos .....</i></b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado apresentou crescimento recorde em 2022, atingindo a marca de 223,2 milhões de toneladas, com a produção aquícola ultrapassando pela primeira vez a produção oriunda da pesca, alcançando a marca de 130,9 milhões de toneladas, de acordo com o relatório apresentado pela FAO em 2024. Essa tendência tem se mostrado necessária e vital para garantia da segurança alimentar no planeta, apesar de um ritmo mais lento do crescimento populacional mundial em relação a anos anteriores, segundo as últimas projeções das Nações Unidas (FAO, 2024). Contudo, nada disso impactou a crescente intensificação dos sistemas produtivos impulsionada pela alta demanda por pescado, no mundo

A criação de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* tem se destacado dentro do cenário aquícola mundial e nacional. Atualmente, o Brasil encontra-se como o quarto maior produtor de tilápia do mundo. Em 2022, aproximadamente 409 mil toneladas desse recurso pesqueiro foram produzidas, seguindo um padrão ascendente de crescimento ao longo dos anos, fazendo da espécie o pescado mais cultivado no país (IBGE, 2023)

O conhecimento e a determinação das condições ideais em aquicultura, segundo Sá (2023), são fundamentais para o sucesso da produção, pois podem trazer implicações diretas na sobrevivência, crescimento e qualidade da água. A aplicação de altas densidades de estocagem promove uma grande produção de matéria orgânica devido à alta necessidade de fornecimento de alimento artificial. Com isso, o controle dos parâmetros de qualidade da água de cultivo torna-se um dos principais desafios em aquicultura, podendo gerar diversos impactos zootécnicos e ambientais no sistema de produção (ABD EL-HACK *et al.*, 2022).

Devido à alta demanda da cadeia produtiva, a produção de alevinos de tilápia tem conquistado cada vez mais destaque, com mais necessidade de desenvolvimento e aprimoramento, a fim de garantir a máxima performance dos animais produzidos. Contudo, com a intensificação da produção, surgem os riscos e problemas trazidos por surtos de doenças causados por bactérias patogênicas. Nas fases iniciais, a vulnerabilidade dos organismos produzidos torna necessário um cuidado redobrado, haja vista que o sistema imunológico desses animais ainda se encontra em processo de desenvolvimento (BORGES *et al.*, 2021).

A avaliação e o conhecimento das comunidades microbianas, presentes nos peixes, são de fundamental importância para a determinação de entendimento sobre a dinâmica das relações entre peixes, hospedeiros e ambiente, podendo servir como um indicativo de saúde e qualidade tanto da espécie quanto do ambiente de cultivo (LEGRAND *et al.*, 2018).

A superfície externa dos peixes é a primeira barreira imunológica deles, tendo em

vista seu contato direto com o ambiente. Células caliciformes recobrem essa superfície e garantem uma produção contínua de muco, o qual auxilia nessa proteção imunológica dos organismos aquáticos. Essa superfície mucosa é colonizada por uma microbiota extremamente diversificada que é fundamental para manutenção da saúde dos peixes, tendo sua modulação diretamente influenciada pelo ambiente de cultivo (DIWAN; HARKER. PANCHE, 2023).

O crescimento acelerado da aquicultura global é acompanhado por um aumento preocupante das doenças de origem bacteriana que afetam os peixes cultivados. Para maximizar a produtividade, o uso de produtos químicos e antibióticos se tornou uma prática comum, mas com consequências que exigem atenção. Mannan *et al.* (2020), investigando os efeitos da oxitetraciclina no cultivo da tilápia do Nilo, observaram que após 30 dias de exposição a esse medicamento, houve uma queda significativa da carga bacteriana intestinal (CBI), reduzindo de  $3,06 \pm 2,08 \times 10^8$  ufc/g, aos 7 dias de experimento, para  $3,45 \pm 4,46 \times 10^7$  ufc/g ao final dele. Além da redução da CBI, a diversidade bacteriana no trato gastrointestinal diminuiu, sendo observado também a expressão de resistência bacteriana a antibióticos.

Com o objetivo de assegurar a qualidade sanitária do ambiente de cultivo, muitos produtores adotam o uso de antibióticos para sanar problemas de origem bacteriana. Entretanto, a utilização desses medicamentos muitas vezes é realizada de maneira incorreta e sem a orientação de um profissional e, quando associado a um uso excessivo e indiscriminado podem trazer riscos tanto para o ambiente, com o desenvolvimento de bactérias multirresistentes, como para o ser humano, com a presença de resíduos medicamentosos nos alimentos produzidos (ROMERO, 2012).

Para que se possa aprimorar as técnicas de cultivo e, com isso, garantir uma maior estabilidade microbiológica da produção, se faz necessário o conhecimento da microbiota total dos organismos cultivados para que, a partir daí se possa avaliar características como diversidade, função, interação organismo/ambiente e, principalmente, seu papel na saúde do organismo cultivado (BORGES *et al.*, 2021).

Considerando o expressivo crescimento da cadeia produtiva de tilápia do Nilo e a crescente preocupação com doenças, torna-se imprescindível aprofundar o conhecimento sobre a microbiota total dessa espécie desde os primeiros estágios de vida. A caracterização dessa comunidade microbiana é fundamental para compreender as interações ecológicas, a susceptibilidade a doenças e para o desenvolvimento de estratégias de manejo e cultivo mais eficientes e sustentáveis, visando minimizar as perdas causadas por patógenos e otimizar o desempenho produtivo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A produção de tilápia no mundo e no Brasil

A demanda mundial por pescado tem crescido bastante, apesar da tendência de desaceleração do crescimento populacional, segundo dados fornecidos pelo Departamento de Assuntos Econômicos (DESA), órgão pertencente à Organização das Nações Unidas – ONU (ONU, 2024). Diante disso, a aquicultura vem se mostrando como possibilidade viável para atender o mercado consumidor, fornecendo alimento de alto valor proteico e garantindo segurança alimentar, haja vista os últimos dados mundiais fornecidos pela FAO (FAO, 2022), onde essa atividade do agronegócio apresentou uma taxa de crescimento anual de 3% desde 1961.

Relatos históricos indicam que o cultivo de tilápia tenha se originado no Egito a mais de 4000 anos, e se difundido para o resto do mundo, sendo cultivado em praticamente todos os continentes, exceto na Antártica (PRABU *et al.*, 2019).

No Brasil, a aquicultura nacional segue a tendência mundial de crescimento e desenvolvimento, com grande relevância não apenas no cenário econômico, mas também no âmbito social, ambiental e tecnológico (FAO, 2022). Apesar das dificuldades enfrentadas, como instabilidades e descontinuidades das políticas públicas, agregação e levantamento de dados produtivos e cadastramento de produtores, o setor aquícola nacional tem se tornado cada vez mais indispensável para a sociedade, com seu crescimento diretamente relacionado ao cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), carro chefe da aquicultura nacional (ANDRADE, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2024).

O cultivo de tilápia baseia-se em diversas espécies de ciclídeos, tendo sua produção difundida em mais de 135 países e a espécie mais cultivada *Oreochromis niloticus*. Sua introdução no Brasil data de 1971, quando o Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), em expedição realizada para Tailândia, importou o primeiro plantel, cujo objetivo era a realização de “peixamentos” nos açudes federais. A partir daí, iniciou-se a disseminação da tilápia no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A produção de tilápia alcançou a marca de 550 mil toneladas no Brasil em 2023, representando 64% do volume total de pescado cultivado. Projeções indicam que até 2030, a criação de tilápia alcance a marca de 80% da produção de pescado no Brasil, tendo a maior aceitação do peixe de cativeiro por parte da população, bem como a crescente taxa de exportação (BRASIL, 2023; PEIXE BR, 2023).

Dois terços do território brasileiro se localizam em região tropical, apresentando grande disponibilidade hídrica, logo, o Brasil é visto como nação com alta potencialidade para produção de pescado em cativeiro, o que, atualmente, está concentrada na piscicultura continental e na carcinicultura marinha. Esse cenário tem contribuído para suprir parte da carência alimentar da população e alavancado o crescimento econômico do país (SILVA *et. al.*, 2018).

A região nordeste do Brasil, apesar de se encontrar localizada em região de clima semiárido, apresenta grande potencial para produção aquícola, sendo responsável por 17,8% da produção nacional, em 2021 (BRASIL, 2023). De acordo com a Agência Nacional de Águas (2024), o semiárido brasileiro possui 275 açudes com capacidade superior a 10 hm<sup>3</sup>. Além disso, a utilização de canais de irrigação e da produção em águas da União em reservatórios possibilita a ampliação da atividade pelo interior do estado.

## **2.2 A produção do pescado e seus impactos ambientais**

O desenvolvimento e uso de técnicas de produção que minimizem os impactos ambientais provocados pela produção de pescado em cativeiro, vem se tornando pré-requisito na hora da implantação de novos empreendimentos aquícolas. A aplicação de altas densidades de cultivo promove um elevado volume de resíduos oriundos da atividade metabólica e das rações artificiais fornecidas, uma vez que estas apresentam baixa digestibilidade, o que está confirmado por somente 70% do que é fornecido ser aproveitado pelos peixes (SÁ, 2023).

O cultivo de organismos aquáticos está diretamente associado à qualidade de água. Para que se possa obter êxito nos sistemas de produção, é necessário que ocorra constante monitoramento e manutenção dos parâmetros limnológicos do ambiente de cultivo. Para isso, o uso de técnicas de manejo adequadas é necessário em todas as fases de criação, mitigando assim possíveis problemas que possam acometer o sucesso da produção (KUBITZA; KUBITZA, 2013).

Segundo Alves *et al.* (2022), a aquicultura mundial vem seguindo uma tendência de intensificação de seus sistemas de produção e dentre os efeitos dessa intensificação são os riscos de eutrofização dos ambientes aquáticos, custo esse bastante oneroso para o ambiente. Assim, a preocupação com os parâmetros ambientais de cultivo está ganhando cada vez mais importância, haja vista que estão diretamente relacionados a fatores como sobrevivência, bem-estar e qualidade dos organismos cultivados. Nesse contexto, cultivos intensivos alinhados com as questões ambientais podem ser classificados como o futuro da aquicultura mundial (LINDHOLM-LEHTO, 2023).

Utete *et al.* (2013), em seus estudos avaliando os impactos ambientais causados pela atividade aquícola no lago Kariba, puderam constatar que, embora a grande dimensão apresentada pelo corpo d'água, os efeitos da intensa atividade aquícola no reservatório trouxeram consequências significantes com relação à qualidade de água, deixando-a fora dos padrões de qualidade recomendados pela OMS. Casos, como esse, revelam a necessidade de observação e monitoramento constantes do setor produtivo, pois embora seja uma atividade vital para alimentação humana, a mesma precisa ocorrer em sinergia com o ambiente.

### **2.3 Sanidade de organismos cultivados**

As doenças de origem bacteriana estão entre as principais causas de prejuízo do setor aquícola, quando se analisa a piscicultura mundial. Para garantir o sucesso do cultivo em sistema intensivo de produção, deve-se levar em consideração alguns fatores para que a atividade seja tanto sustentável, quanto viável economicamente. Dentre esses fatores, o conhecimento biológico da espécie alvo é fundamental para a determinação do manejo produtivo (KUBITZA; KUBITZA, 2013).

Fases iniciais de produção, como ocorre na maioria das espécies, estão mais expostas e susceptíveis à agentes patogênicos. Doenças bacterianas e parasitárias figuram como os principais diagnósticos de campo encontrados, tornando cada vez mais essencial o conhecimento acerca desse assunto. O conhecimento dessas doenças, bem como suas interações com o meio e com o hospedeiro são fundamentais para o desenvolvimento de estratégicas de controle dessas enfermidades (ISHIKAWA *et.al.*, 2012).

Cada espécie possui suas características imunológicas e biológicas específicas, que podem torná-las mais ou menos vulneráveis aos agentes patogênicos externos encontrados nos ambientes de cultivo. Tal conhecimento é fundamental para determinar qual espécie cultivar e, principalmente, qual manejo adotar durante sua criação (MONTEIRO, 2014).

A identificação da fonte de contaminação é fundamental para que se possa elaborar medidas preventivas e de erradicação do patógeno, quando se objetiva garantir a sanidade do ambiente de cultivo, e, assim, solucionar a problemática na sua origem. Pelo fato de os animais de criação serem constantemente expostos às situações de estresse ambiental, o controle sanitário é fundamental pois, nesses cenários, diante de uma fragilização imunológica, cargas bacterianas elevadas podem abrir condições para infecções e, em casos mais severos, mortalidades em massa (DE PADUA; FILHO, 2014).

Uma saída encontrada para prevenção e combate de problemas sanitários na aquicultura é o uso de antibióticos. O uso desses fármacos visa alcançar melhores taxas de

sobrevivência de peixes e camarões, principalmente quando expostos às situações de estresse. No Brasil, oito gêneros de bactérias aparecem com maior recorrência: *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Edwardsiella*, *Francisella*, *Citrobacter*, *Aeromonas* e *Chryseobacterium*. A distribuição e ocorrência desses patógenos dependem de características relacionadas ao clima, imunidade e manejo. Em casos de ocorrência ou surtos causados por alguns desses agentes, a única opção para sanar essa problemática é através da remediação por antibióticos (DOTTA; PIAZZA, 2012).

Guan *et al.* (2022), avaliando um caso de surto de columinariose em uma larvicultura de tilápia do Nilo, observaram que, com o acelerado crescimento da indústria aquícola na China, ocorreu também um aumento nos casos de surtos bacterianos. Com isso, houve a necessidade de implantação de protocolos de prevenção a essas enfermidades. Práticas como higienização dos ovos e larvas em solução de formalina bem como o aumento da salinidade da água de cultivo, foram algumas das medidas adotadas para se enfrentar os problemas que vinham acometendo a produção. Pelo fato de que, nas fases iniciais de vida, ovos e larvas de tilápia ainda apresentam seu sistema imunológico em desenvolvimento, sua susceptibilidade a enfermidades é ainda maior, tornando essa fase de produção ainda mais vulnerável às perdas provocadas por patógenos.

O estudo de Egger *et al.* (2023), investigaram surtos de lactococose em fazendas brasileiras, caracterizando os isolados, sua virulência para tilápias do Nilo e suscetibilidade a antimicrobianos. Os surtos de lactococose foram monitorados de 2019 a 2022 em todo o Brasil. Uma rápida expansão do patógeno *Lactococcus petauri* foi observada em diferentes regiões brasileiras. Durante o monitoramento dos surtos, a coinfecção com outras bactérias (*Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Streptococcus agalactiae* e *S. iniae*) foi identificada em alguns peixes. Infecções por *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Francisella orientalis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. iniae* e *Vibrio vulnificus* também foram diagnosticadas nos peixes amostrados, mas não como coinfecção.

Dong *et al.* (2015), descrevendo o isolamento e a caracterização dos potenciais patógenos simultâneos em surtos de doenças naturais em *O. niloticus*, em sistema de cultivo intensivo, revelaram infecções de múltiplos patógenos bacterianos e virais em peixes doentes coletados em duas fazendas. A maioria dos peixes doentes foram simultaneamente infectados por três patógenos. Os resultados demonstraram que foram encontradas cinco espécies bacterianas. Infecções concomitante de *Flavobacterium columnare* e *Aeromonas veronii* ocorreram em 100% dos peixes doentes. É possível que a infecção primária dos peixes com *F. columnare* possa causar erosões nas brânquias ou no músculo, o que resulta em infecções

subsequentes. Além disso, os autores ressaltaram que infecções parasitárias também podem danificar os tecidos e criar um meio para invasão secundária múltiplas de bactérias e vírus.

Fatores como baixa qualidade de água, condições ambientais de temperatura e umidade relativa estressantes, associados a um manejo irregular, foram observados em uma fazenda de recria de tilápia do Nilo, e associados como sendo os potenciais desencadeadores de uma invasão parasitária e bacteriana simultânea que comprometeu gravemente o sistema imunológico dos peixes, resultando em mortalidade em massa. Foram encontradas infecções estreptocócicas em 40% dos peixes investigados. Foram identificados, nos animais moribundos, 36 isolados bacterianos agrupados, sendo 21 de *Enterococcus faecalis* e 15 de *Streptococcus agalactiae* (EISSA *et al.*, 2021).

Preena (2020) constatou que a maioria dos antimicrobianos e antibióticos utilizados na aquicultura apresentam eficácia parcial ou até mesmo ineficiência inibitória contra patógenos comumente encontrados em peixes. Esse fato pode ser considerado um problema alarmante capaz de comprometer toda a cadeia produtiva.

## **2.4 Microbiota da tilápia do Nilo e a produção de alevinos saudáveis**

A tilápia do Nilo se apresenta como uma excelente escolha para produção, haja vista ter características extremamente favoráveis ao cultivo como boas taxas de crescimento nos mais diversos sistemas de criação, boa conversão alimentar, ser uma eficiente filtradora, apresentar capacidade de resistência a doenças e, principalmente, ter boa aceitação no mercado consumidor (BEVERIDGE; MCANDREW, 2000).

As comunidades microbianas apresentam organização complexa nos organismos aquáticos, podendo apresentar variações em decorrência do ambiente de cultivo, idade e hábitos alimentares (RINGO, 2003). As bactérias que colonizam o trato gastrointestinal dos peixes podem ser classificadas em dois grandes grupos, alóctones e autóctones, capazes de desempenhar funções vitais ao hospedeiro, além de serem capazes de inibir o desenvolvimento de organismos patogênicos (BENERJEE; RAY, 2017)

Bereded *et al.* (2022), investigando a microbiota bacteriana intestinal da tilápia do Nilo em dois lagos distintos da Etiópia, revelando uma elevada diversidade microbiana nos animais para ambos os ambientes. As análises filogenéticas encontram 7 filos e 41 gêneros bacterianos, com predominância dos filos firmicutes (61%) e proteobacterias (16%). O estudo observou também que todas as amostras compartilhavam um mesmo microbioma central, evidenciando a presença de padrão microbiano “saudável” e característico para essa espécie no ambiente analisado.

Silva *et al.* (2016), ao avaliar a diversidade da microbiota aquática em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do Nilo, encontraram grande diversidade biológica e observaram que em todos os sistemas avaliados, os gêneros mais frequentes foram *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Mycobacterium* spp., *Micrococcus* spp. e *Corybacterium* spp., respectivamente. A partir dessa caracterização, torna-se possível uma manipulação mais precisa dos parâmetros ambientais a fim de induzir o desenvolvimento dos principais grupos e com isso, proporcionar melhorias para o ambiente de cultivo.

A disponibilidade de “sementes” com constância e qualidade, em todo o setor do agronegócio, é de fundamental importância para garantir a viabilidade do segmento. A larvicultura da tilápia do Nilo, atualmente, possui um pacote tecnológico bem desenvolvido e eficiente, contudo, devido ao acelerado ritmo de crescimento da aquicultura, a necessidade de maximização e otimização é constante na produção de alevinos (LUZ, 2013).

O processo de larvicultura da tilápia do Nilo é favorecido devido às características fisiológicas, como alta prolificidade, podendo variar de 3 a 5 ovos/grama de peso vivo, idade de maturação sexual precoce a partir do terceiro ou quarto mês de vida, desova parcelada e cuidado parental (SENAR, 2017).

O fato de possuir uma maturação sexual precoce torna necessário a aplicação de técnicas masculinizantes, visando o cultivo apenas de animais machos, com fins de controle populacional, maior desempenho zootécnico e econômico (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Quando comparado às fêmeas, animais machos chegam a crescer até duas vezes mais rápido pois, ao atingirem a maturidade sexual, fêmeas iniciam o processo de desenvolvimento gonadal, destinando parte de sua energia para esse processo, diminuindo assim seu crescimento muscular (BALDISSEROTTO, 2009; LAGO *et al.*, 2017).

Um estudo realizado em diversas fazendas de produção de tilápia, em fase de terminação, por todo o Brasil, observou que a maioria dos problemas sanitários encontrados nesses animais os acompanhavam desde as fases larval e de juvenil. No estudo, a principal fonte de infecção para toda a cadeia produtiva era oriunda dos planteis de reprodutores. No entanto, mesmo com a presença dos organismos patogênicos, o quadro sanitário ainda se encontrava em fase subclínica. Para poder tornar mais segura e rentável a atividade, o controle sanitário nos estágios iniciais de produção é indispensável, proporcionando mais estabilidade sanitária nas criações (DE PÁDUA; FILHO, 2015).

## 2.5 Importância do conhecimento microbiológico na aquicultura

A microbiota intestinal de peixes é colonizada por bactérias autóctones e bactérias alóctones (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). As bactérias autóctones são bactérias residentes, capazes de colonizar toda a superfície epitelial do intestino, bem como suas microvilosidades, fazendo parte da microbiota natural desempenhando muitas vezes funções essenciais ao hospedeiro. As bactérias alóctones são classificadas como transitórias, podendo estar associadas ao alimento ou ambiente, não fazendo parte da microbiota natural do hospedeiro.

A caracterização fenotípica de bactérias é um processo fundamental para diversas áreas de estudo, auxiliando desde o diagnóstico de doenças, análises ambientais e desenvolvimento de fármacos. Para isso, são realizados testes bioquímicos que tem como finalidade a verificação de reações metabólicas, observação da característica das colônias e da morfologia celular, avaliação das enzimas estruturais e de suas sensibilidades em diferentes compostos (LEIRA *et al.*, 2016)

Baldo *et al.* (2019) investigando a relação filogeográfica e ecológica da microbiota intestinal de ciclídeos, em lagos da África e América Central, desvendaram a influência marcante de fatores geográficos na sua modulação. A microbiota intestinal, embora similar entre diferentes populações, é sensível a variações geográficas, o que pode ter um impacto direto nos hábitos alimentares, modulando desde dietas herbívoras até carnívoras. Com isso, torna-se possível compreender os fatores que influenciam a relação hospedeiro – microbiota com a natureza.

A comunidade microbiana intestinal é capaz de produzir metabólitos que desempenham funções essenciais para manutenção da homeostase ambiente-hospedeiro. Tais atividades exercem alterações fisiológicas que variam desde alterações de pH gastrointestinal, capacidade de absorção de nutrientes até a modulação imunológica do animal (LOUIS; HOLD; FLINT, 2014). Diversos estudos revelam que uma microbiota diversa e em equilíbrio garante bons resultados zootécnicos, refletindo diretamente na saúde e bem-estar dos organismos cultivados.

O sistema imunológico está associado tanto a mecanismos inatos ao organismo, quanto adquiridos durante seu desenvolvimento. Quando em homeostasia, esses mecanismos atuam na defesa do organismo contra patógenos. O trato gastrointestinal (TGI), por ser uma das principais vias de ingestão de patógenos, é altamente especializado no combate dessas enfermidades. O tecido linfático do TGI (GALT) atua associado a microbiota intestinal como linha de defesa do organismo e na manutenção da saúde intestinal (GEREMIA *et. al.*, 2021)

A diversidade microbiana e seu estabelecimento no TGI de peixes está associada a diversos fatores exógenos, como tipo e estágio de desenvolvimento do peixe bem como condições de criação e cultivo, modulando o processo de colonização e estabelecimento do microbioma. Nos primeiros estágios de vida, a carga bacteriana total é baixa, tendo sua ascensão a partir do início de uma alimentação ativa e da maturação do ambiente de cultivo, aumentando rapidamente e se desenvolvendo em sinergia com o ambiente (NAYAK, 2010)

O ambiente de cultivo aquático apresenta características extremamente propícias ao desenvolvimento e disseminação de microrganismos e, desse modo, o compartilhamento mútuo de sua diversidade. Como a maioria dos organismos com potencial patogênico são oportunistas e estão comumente presentes no microbioma aquático, para que se tornem um problema, é necessário a ocorrência de precursores de estresse como deficiência nutricional e oscilações ambientais. Isso acaba enfraquecendo a primeira linha de defesa desses organismos, abrindo uma porta de acesso a essas enfermidades (HANSEN; OLAFSEN, 1999).

## **2.6 Uso de antimicrobianos na aquicultura**

O desenvolvimento de antimicrobianos promoveu o otimismo na cadeia global de produção de animais, graças à sua melhor capacidade de combate as infecções que afetam o setor. No entanto, a utilização excessiva desses medicamentos tem provocado um problema em ascensão: a multirresistência bacteriana. Este contexto acende um sinal de alerta para a importância de um uso consciente e responsável de antimicrobianos, para evitar a perda da eficácia desses medicamentos e com isso ameaçar a saúde humana e animal (REVERTER et al., 2020).

A intensificação dos sistemas de produção animal, impulsionada pela crescente demanda global por alimentos, tem sido acompanhada pela adoção de medidas mais rigorosas de higiene, gestão e biosseguridade nas fazendas. Essa intensificação, por sua vez, tem levado ao aumento do uso de antimicrobianos na produção animal, com o objetivo principal de promover o crescimento animal e prevenir doenças em massa (VAN BOECKEL *et al.*, 2017).

A aquicultura se configura como um setor estratégico e assume um papel fundamental nos cenários econômico, social e alimentar (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Projeções indicam que a demanda global por pescado deverá crescer 27% até 2030, tendo a aquicultura responsável por 67% desse crescimento (GODINHO *et al.*, 2021). No entanto, a intensificação da produção aquícola associada ao uso elevado de antimicrobianos, tem gerado um problema de saúde pública de grande magnitude, com a seleção, surgimento e disseminação de patógenos multirresistentes (MARTINS *et al.*, 2017). Essa problemática é agravada pelo

aumento do consumo de pescado pela população, o que pode levar a um consumo indireto e crescente de antimicrobianos, colocando em risco a saúde humana e animal (KOBAYASHI *et al.*, 2015; REVERTER *et al.*, 2020; SCHAR *et al.*, 2018).

A resistência antimicrobiana (RAM), presente em praticamente todos os gêneros de bactérias, configura-se como um grave desafio à saúde pública global. Fatores como o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos, a falta de saneamento básico e práticas agropecuárias irregulares contribuem para o surgimento e disseminação da RAM. Os mecanismos de resistência podem ser intrínsecos, inerentes ao microrganismo desde sua origem, ou extrínsecos, adquiridos por meio da transferência de genes de resistência de outros microrganismos (ABRANTES; NOGUEIRA, 2021; TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Com relação a sua classificação, os antibióticos são organizados em classes, onde se distinguem de acordo com características como, modo de ação e espectro ou de acordo com sua estrutura química (Tabela 1). O conhecimento acerca de suas classificações é fundamental para o uso e aplicação corretos no combate a infecções bacterianas (TORTORA; CASE, FUNKE, 2017).

**Tabela 1.** Classificação dos antimicrobianos de acordo com seus mecanismos de ação.

Mecanismo de ação	Classe	Subgrupos	Espectro de ação
Inibidor da síntese da parede celular	Beta-lactâmicos	Penicilina	Gram-positivas (Amplo espectro)
		Cefalosporina	Amplo espectro
		Carbapenas	Amplo espectro + anaeróbias
Inibidor da síntese de proteínas	Aminoglicosídeos	Glicopeptídeos	Cocos Gram-positivos
		Estreptomicina	Amplo espectro
		Gentamicina	Amplo espectro
Inibidor da síntese de ácidos nucleicos	Tetraciclinas	Tobramicina	Amplo espectro
		Doxiciclina	Amplo espectro
		Minociclina	Amplo espectro
Inibidor da síntese de ácidos nucleicos	Macrolídeos	Tetraciclina	Amplo espectro
		Eritromicina	Amplo espectro
		Azitromicina	Amplo espectro
Inibidor da síntese de ácidos nucleicos	Quinolonas	Claritromicina	Amplo espectro
		Cloranfenicol	Amplo espectro
		Ciprofloxacina	Amplo espectro
Inibidor da síntese de ácidos nucleicos		Levofloxacina	Amplo espectro
		Moxifloxacina	Amplo espectro

Fonte: CLSI (2024); Tortora, Case e Funke (2017).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Quantificar e caracterizar a microbiota de bactérias heterotróficas cultiváveis nas fases iniciais de desenvolvimento de tilápias até o final da masculinização, avaliando sua influência na sobrevivência e desenvolvimento dos animais cultivados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- i) quantificar o número de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) presentes na microbiota total durante o período de masculinização;
- ii) identificar e caracterizar as cepas de BHC encontradas na microbiota dos animais cultivados;
- iii) avaliar os parâmetros físicos e químicos do sistema de cultivo;
- iv) analisar os resultados zootécnicos obtidos durante o processo de cultivo;
- v) determinar o perfil de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos de uso veterinário e clínico, das estirpes isoladas;
- vi) avaliar a eficiência do formaldeído 4% como sanitizante dos ovos fecundados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização do experimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado – LAMAP, localizado no Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, e no Centro de Estudos Ambientais Costeiros – CEAC, também pertencente ao LABOMAR, em setembro de 2023.

### 4.2 Coleta dos ovos

Trezentos e cinquenta gramas (350 g) de ovos de tilápia, de aproximadamente 20 fêmeas, foram coletados em uma fazenda comercial, localizada no município de Cascavel/Ceará (Figura 1). Devido à incubação oral da prole por essa espécie, a extração manual dos ovos se tornou necessária. Para tal, um fluxo de água foi estabelecido no sentido opérculo-boca, permitindo a remoção e coleta completa dos ovos. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção – CEUAP/UFC (parecer protocolado sob CEUAP nº 0901202401).

Figura 1 - Fêmea de tilápia durante processo de coleta de ovos.



Fonte. o autor (2024).

Após a coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos pressurizados com oxigênio e transportado de forma imediata para o Centro de Estudos Ambientais Costeiros – CEAC (Figura 2).

Figura 2 - Saco de transporte de ovos de tilápia pressurizado com oxigênio.



Fonte. o autor (2024).

#### **4.3 Recepção e preparação dos ovos**

Os ovos passaram por um processo de higienização em banho de curta duração em solução de formaldeído 4% (formalina), durante 60 segundos (Figura 3) (FRANCIS-FLOYD, 1996). Em seguida, foram transferidos para uma incubadora, onde permaneceram até sua total eclosão, com duração de 48 a 72 horas, devido aos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos.

Figura 3 - Higienização dos ovos em solução de formaldeído 4%.



Fonte. o autor (2024).

#### **4.4 Sistema de incubação**

A incubação artificial de ovos de tilápia se configura como uma técnica amplamente difundida e consolidada, constituindo elemento fundamental para a garantia da produção em larga escala de alevinos. Sua efetivação demanda mão de obra qualificada e estrutura específica, capaz de assegurar condições controladas de temperatura, oxigenação e fluxo de água, propícias ao desenvolvimento embrionário (KUBITZA, 2011).

Com o objetivo de viabilizar o processo de incubação artificial, foi projetada uma estrutura capaz de oferecer condições ideais para o desenvolvimento embrionário (Figura 4). Essa estrutura é composta pelos seguintes elementos:

- Incubadora de acrílico:
  - Volume útil: 8 litros;
  - Formato: Cilíndrico;
  - Base: Oval;
  - Altura total: 40 cm.
- Tanque de vidro para coleta de larvas eclodidas:
  - Volume útil: 70 litros.
- Filtro mecânico-biológico:
  - Volume: 100 litros.

- Bomba submersa:
  - Vazão: 300 litros/hora.

Figura 4 - Sistema de incubação artificial.



Fonte. o autor (2024)

#### 4.5 Sistema de cultivo

O sistema foi composto por 5 unidades de cultivo (aquários), cada um com volume útil de 70 litros, interligados a um sistema de filtragem mecânica e biológica em fluxo contínuo (Figura 5).

Figura 5 - Sistema de cultivo e unidade de filtragem mecânica e biológica.



Fonte. o autor (2024).

O sistema de filtragem do aquário foi composto por duas etapas: filtragem mecânica e filtragem biológica. O volume total do filtro era de aproximadamente 100 litros (L). Para a filtragem biológica, foram utilizados 30 L de meio suporte comercial, enquanto na filtragem

mecânica, lã acrílica foi empregada para a retenção de sólidos totais. O sistema operava em regime ininterrupto de circulação, utilizando a força gravitacional para drenagem e uma bomba submersa de vazão 3.000 L/h para o retorno da água. O nível dos tanques era controlado por um dreno de nível localizado na parte superior do aquário, que definia o nível máximo da água.

#### **4.6 Sanitização e maturação biológica do sistema de cultivo**

A sanitização das estruturas é uma etapa fundamental quando se objetiva realizar experimentos microbiológicos com organismos aquáticos que visa garantir a máxima confiabilidade dos resultados, bem como a saúde dos animais cultivados (DOTTA; PIAZZA, 2012).

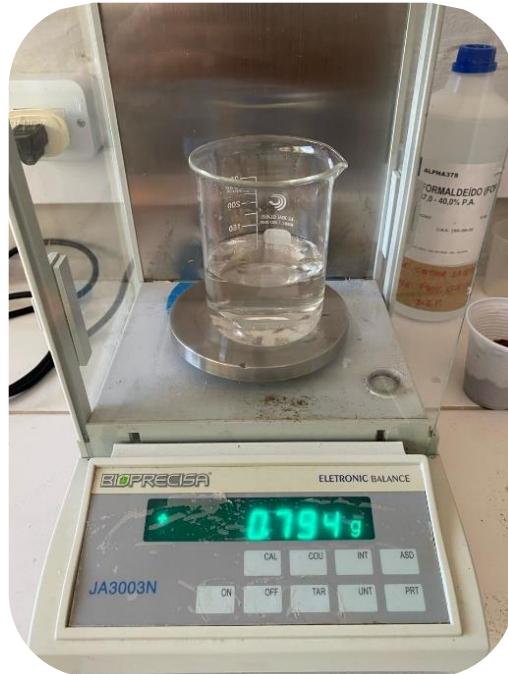
Após realizar o abastecimento do sistema de cultivo com água fornecida pela Companhia de Água e Esgoto do Ceará (CAGECE), foi aplicada uma solução de hipoclorito de sódio na concentração de 20 ppm (ISHIKAWA *et al.*, 2020). Em seguida, o sistema de bombeamento e recirculação de água foi acionado, permitindo a sanitização uniforme de toda a estrutura durante um ciclo de 3 dias. Ao final desse período, a ausência total de hipoclorito de sódio na água foi confirmada através de um teste colorimétrico comercial da marca API®. Com a sanitização completa, o processo de maturação biológica do sistema de cultivo foi iniciado.

Para estimular o desenvolvimento do sistema de filtragem biológico, foi induzido um pico de nitrogênio amoniacal total (NAT) de 5 mg/L utilizando ureia em pó (60%). O monitoramento dos parâmetros físicos e químicos foi realizado a cada três dias, visando acompanhar o processo de ciclagem do NAT até a estabilização, para em seguida povoar o sistema.

#### **4.7 Povoamento**

Cada unidade de cultivo foi estocada com uma densidade de 3 larvas por litro, resultando em um total de 210 animais por aquário. O processo de pesagem dos animais foi realizado por agrupamento, devido ao seu pequeno peso e alta sensibilidade ao manejo. Amostras de 10 animais foram pesadas por vez, utilizando um Becker com água do próprio sistema de cultivo para minimizar o estresse dos organismos (Figura 6). A pesagem foi realizada em uma balança de precisão para garantir a acurácia dos dados. Após a pesagem, os animais foram cuidadosamente distribuídos nos respectivos aquários até alcançar a densidade desejada.

Figura 6 - Pesagem dos animais para realização do povoamento.



Fonte. o autor (2024).

#### 4.8 Protocolo alimentar

Os peixes foram arraçoados cinco vezes ao dia, as 8h30min; 10h30min; 12h30min; 14h30min e 16h30min, com intervalo de duas horas entre as refeições. A ração utilizada foi um alimento comercial em pó contendo 40% de proteína bruta. A taxa de arraçoamento foi de 12% do peso vivo dos peixes, ajustada semanalmente com base nos dados biométricos coletados.

Com o objetivo de induzir a masculinização dos peixes, a ração foi enriquecida com hormônio masculinizante Alfarever® metiltestosterona 50%. A incorporação do hormônio na ração seguiu as instruções do fabricante.

#### 4.9 Análise zootécnica

As avaliações zootécnicas foram realizadas durante todo o período experimental. Os intervalos entre as análises eram de sete dias e, para isso, uma amostra de 20 peixes foi tomada aleatoriamente de cada aquário, para determinação do peso individual (g). O número de peixes no início e final do experimento, bem como a quantidade total de ração fornecida foram contabilizados para essa análise.

Os dados zootécnicos coletados foram o peso médio, a biomassa, o ganho de peso, a taxa de crescimento específico e a conversão alimentar de acordo com as seguintes fórmulas:

- **Peso médio (PM):**

Equação 1

$$PM = PT/Ni$$

Onde: PT = Peso da amostra; Ni = Número de indivíduos amostrados.

- **Biomassa (B):**

Equação 2

$$B = N \times PM$$

Onde: PM = Peso médio; N = Número total de peixes;

- **Taxa de crescimento específico do peso – TCEP (%):**

Equação 3

$$TCEP (\% \text{ dia}^{-1}) = ([\ln Pf - \ln Pi] / t) \times 100$$

Onde: Pf = peso final (g); Pi = peso inicial (g); t = tempo de cultivo.

- **Conversão alimentar (CA):** Foi obtido dividindo a quantidade de ração fornecida (Rf) pelo ganho em biomassa (Bf – Bi)

Equação 4

$$CA = Rf / (Bf - Bi)$$

Onde: Rf = Ração fornecida; Bf = Biomassa final; Bi = Biomassa inicial.

#### **4.10 Análise dos parâmetros físicos e químicos**

Durante todo o experimento, foram analisados, a cada três dias, os seguintes parâmetros: amônia total; nitrito; nitrato; pH; oxigênio dissolvido e temperatura.

Para determinação da amônia total (NAT), do nitrito e do nitrato foram realizadas análises com o auxílio de testes colorimétricos comerciais da marca API®. As concentrações de oxigênio, pH e temperatura com a utilização de sonda multiparâmetro eletrônica. A frequência de aferições foi realizada de modo a eliminar possíveis influências nos resultados zootécnicos obtidos e para que fosse possível controlar os parâmetros dentro da faixa de normalidade ideal para o cultivo da espécie em estudo.

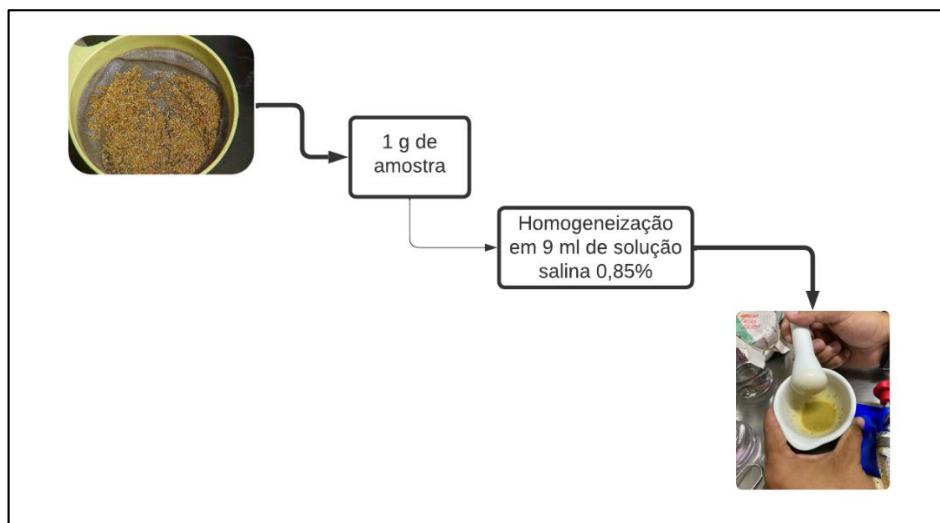
#### **4.11 Coleta das amostras para processamento**

A coleta das amostras teve como objetivo a caracterização e o acompanhamento da

evolução microbiológica ao longo do processo de larvicultura da tilápia. O experimento seguiu um protocolo de sanitização dos ovos coletados por meio de imersão em solução de formaldeído a 4% (TANCREDO, 2019). Foi realizado também a avaliação dos ovos coletados sem a realização do processo de sanitização.

Para isso, foi coletado um 1 g de amostra sanitizada e 1 g de amostra não sanitizada, onde foram homogeneizados separadamente em 9 ml de solução salina 0,85%, com o auxílio de um pistilo e almofariz, previamente esterilizados (Figura 7).

Figura 7 - Exemplificação do procedimento de preparação de amostras para realização de análise microbiológica.



Fonte: o autor (2024).

A partir da eclosão dos ovos, foram realizadas amostragens aleatórias a cada 7 dias, onde foi coletado uma biomassa mínima superior a 1g de amostra, para que, após o maceramento, fosse possível realizar a obtenção de 1g de amostra para realização das análises microbiológicas.

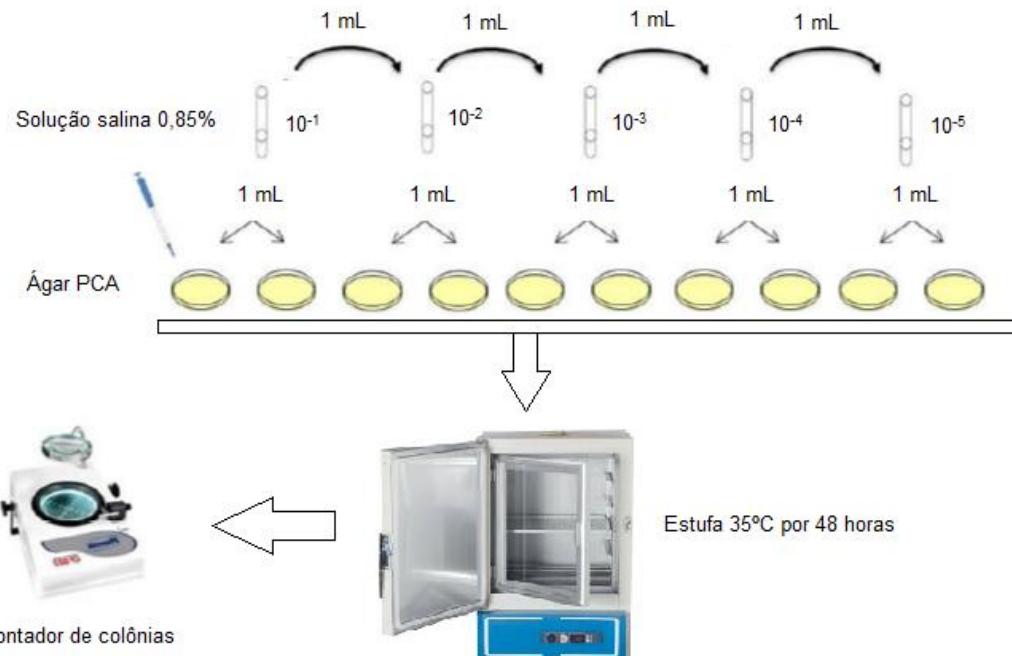
Para a realização dos processamentos com os peixes, foi seguido um protocolo de eutanásia em duas etapas: inicialmente, os animais foram expostos ao anestésico eugenol na própria água de transporte por aproximadamente três minutos, a fim de induzir o bloqueio neuromuscular competitivo (MARQUES, 2021). Após essa etapa, os peixes foram transferidos para reservatórios com água e gelo (0 a 4°C) até a perda de orientação e movimentos operculares. Em seguida, iniciou-se o procedimento de maceramento da amostra para análise microbiológica.

#### **4.12 Análise microbiológica – Identificação fenotípica**

#### **4.12.1 Quantificação das BHCs**

Para realização do processo de quantificação BHCs, 1g do material obtido de cada processamento foi diluído em 9 mL de solução salina 0,85%, seguido de diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Em seguida, 1 mL de cada diluição foram distribuídas, em duplicata, em uma placa de Petri, e adicionado o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), aplicando-se o método de incorporação em placa (*Pour Plate*). Logo após a inoculação, as placas foram levadas para incubação, em estufa a 35 °C, por 48 horas, como exemplificado na Figura 8. Placas contendo entre 25 e 250 colônias crescidas foram quantificadas, por meio da aplicação do método de Contagem Padrão em Placas – CPP com seus resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g). Para a interpretação dos resultados foi adotada a metodologia utilizada por Vieira (2004), onde a partir da média das contagens de cada placa, multiplica-se o fator de correção e em seguida se pelo inverso da diluição, com seu resultado expresso em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) (Figura 8).

Figura 8 - Preparo e determinação do número de UFC das bactérias do grupo das heterotróficas cultiváveis totais.



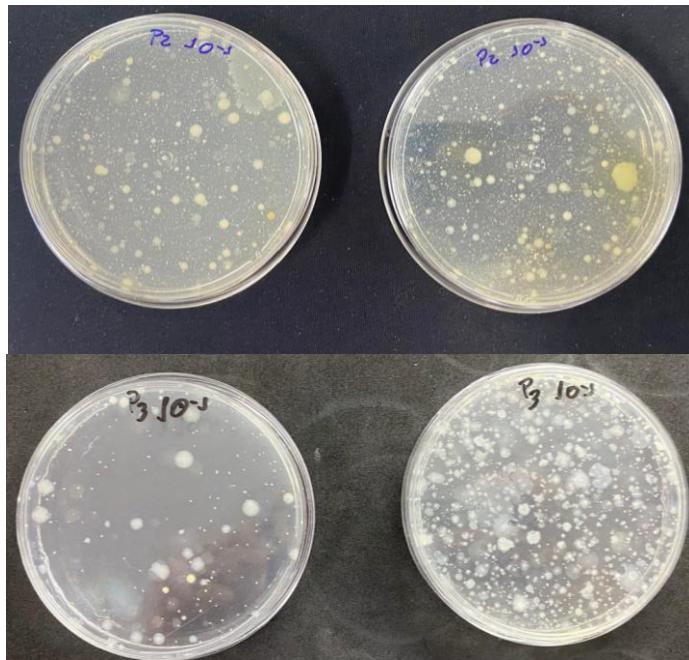
Fonte: o autor (2024).

#### 4.12.2 Isolamento

Após a contagem, foi realizado a escolha de 10 a 15 colônias, para realização do isolamento e crescimento em tubos contendo ágar TSA e, em seguida, incubados em estufa a 35 °C por 24 horas.

A seleção das colônias isoladas buscou garantir a máxima diversidade microbiana possível, priorizando a escolha de colônias com características distintas de tamanho, forma e cor (Figura 9).

Figura 9 - Crescimento microbiano em ágar PCA para isolamento e identificação fenotípica.

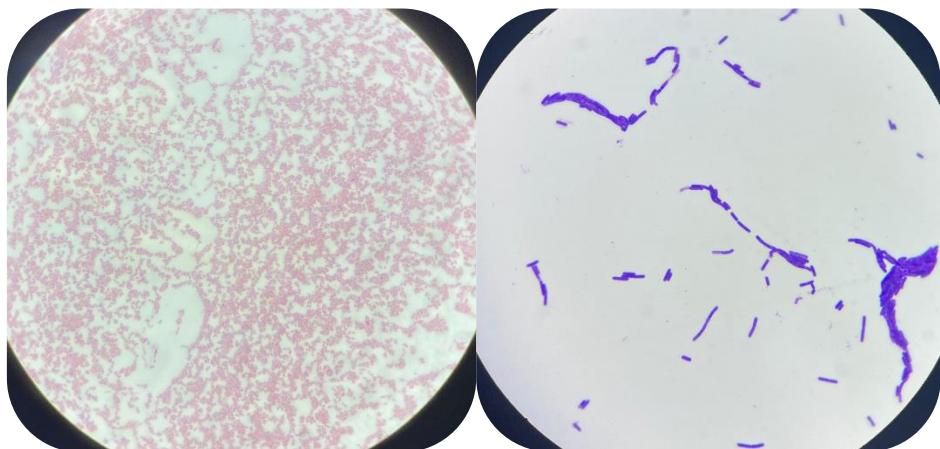


Fonte: o autor (2024).

#### 4.12.3 Coloração de Gram

Com a identificação morfotintorial das cepas isoladas (Figura 10), bem como a confirmação da pureza do material, se iniciou o processo de identificação fenotípica das BHCs através de provas bioquímicas específicas.

Figura 10 - Coloração de Gram para análise morfotintorial e avaliação de pureza das cepas isoladas de tilápia do Nilo.



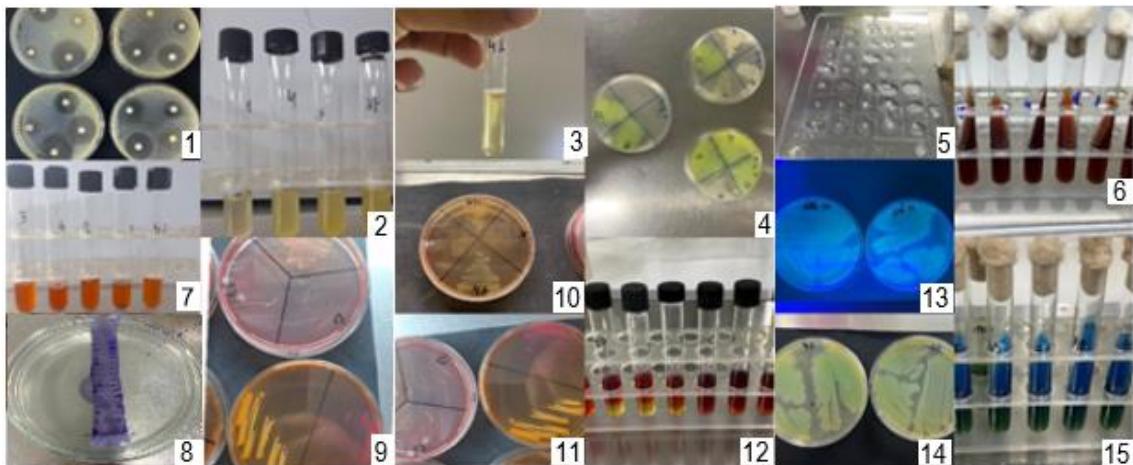
Fonte: o autor (2024).

#### **4.12.4 Provas bioquímicas**

As culturas bacterianas foram submetidas às provas bioquímicas (Figura 11) específicas após a confirmação da pureza das cepas isoladas e da caracterização morfológica pela técnica de Gram. O chaveamento fenotípico e morfológico foi realizado seguindo a metodologia proposta no Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey's (MURRAY; BREED; SMITH, 1957). Para isso, foram realizados os seguintes testes:

- Oxidase;
- Catalase;
- Fermentação da glicose em ágar TSI;
- Citrato;
- Vermelho de metila;
- Voges-Proskauer;
- Motilidade;
- Produção de indol;
- Produção de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ );
- Hidrolise da esculina;
- Crescimento em caldo ureia;
- Crescimento em meios:
  - Ágar MacConkey;
  - Ágar TCBS
  - Ágar king F;
  - Ágar king P;
- Fluorescência;
- Susceptibilidade ao vibriostático O129.

Figura 11 - Provas bioquímicas para identificação fenotípica de BHCs isoladas de tilápia do Nilo.



Legenda: Susceptibilidade ao vibriostático O129 (1); Produção de indol (2); motilidade (3); king f (4); catalase (5); ágar lisina ferro (6); urease (7); oxidase (8); MacConkey (9, 10 e 11); vermelho de metila (12); king F em luz ultravioleta (13); king P (14); citrato (15).

Fonte: o autor (2024).

#### 4.13 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

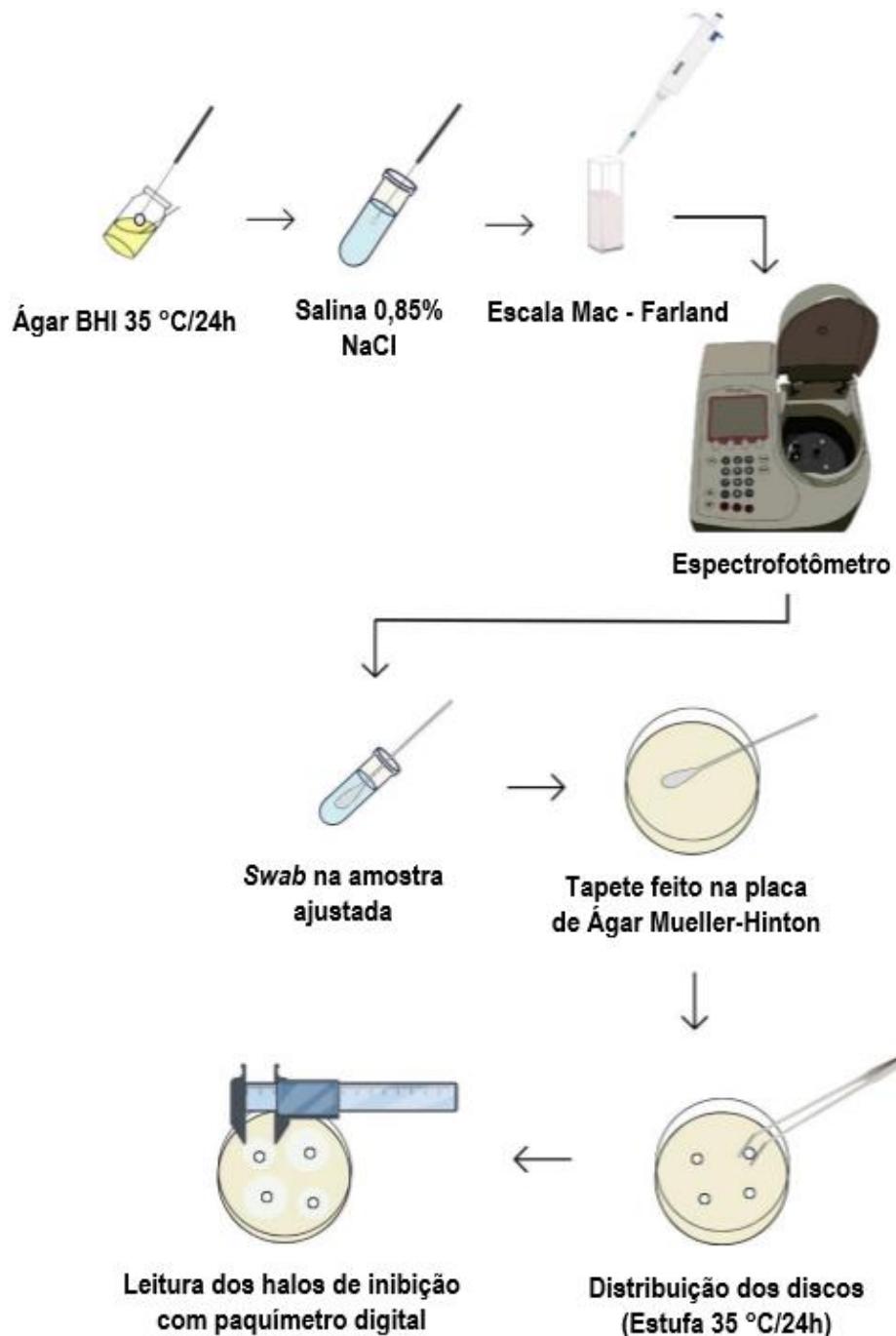
O método de difusão em disco com turvação microbiana na escala 0,5 de MacFarland foi utilizado para realização do teste de sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas, seguindo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (BAUER *et al.*, 1966; CLSI, 2024). Essa abordagem é amplamente utilizada, sendo adequada para testes com a maioria dos patógenos bacterianos.

Após renovação e crescimento das cepas em Ágar TSA por 24 horas e com o auxílio de uma alça estéril, foi coletado uma quantidade de biomassa, para suspensão em solução salina NaCl 0,85%. Em seguida, foi realizado a homogeneização do material com o auxílio vortex até sua total dissolução, ajustando a concentração bacteriana em suspensão conforme a escala MacFarlande 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC) em espectrofotômetro. Após isso e com o auxílio de um *swab* estéril, espalhou-se uniformemente em placa contendo ágar Mueller-Hinton, uma alíquota da solução de modo a formar um tapete homogêneo de crescimento bacteriano. Em seguida, foram adicionados os discos de antibióticos e logo levados à estufa a 35 °C por 24 horas. O Figura 12 traz o fluxograma demonstrativo do teste realizado. Para aferição dos halos de inibição, foi utilizado um paquímetro digital. A interpretação dos resultados obtidos foi realizada de acordo com as tabelas de ponto de corte do CLSI e EUCAST/BrCAST, tendo seus resultados expressos da seguinte forma:

- Susceptível (S);
- Intermediário (I);

- Resistente (R).

Figura 12 - Fluxograma dos testes de sensibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos testados.



Fonte: Araújo (2023), adaptado.

Para realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, foram utilizados os seguintes discos comerciais com antibióticos de uso clínico e veterinário, apresentados na Tabela 2. Tais escolhas são justificadas pela crescente preocupação de surgimento de

multirresistências, seguindo uma tendência previsível da disseminação de novas resistências a essas classes de antibióticos, associados aos fatos de utilização indiscriminada dos mesmos, descarte e contaminação ambiental.

Tabela 2. Antibióticos usados para avaliação de sensibilidade antimicrobiana e respectivas dosagens.

<b>Família</b>	<b>Antibiótico (Marca)</b>	<b>Dosagem (μg)</b>
Penicilina	Amoxicilina + Ácido clavulânico (CECON)	20/10
Betalactâmico	Aztreonam (CECON)	30
Fluoroquinolona	Enrofloxacino (CECON)	5
Aminoglicosídeos	Estreptomicina (Laborclim)	10
Aminoglicosídeos	Gentamicina (Laborclim)	30
Fluoroquinolona	Norfloxacina (Laborclim)	10
Tetraciclina	Tetraciclina (CECON))	30

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Qualidade de água

Os valores obtidos com as análises físicas e químicas realizadas durante todo o período experimental estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros físicos e químicos obtidos a partir de análises realizadas durante o experimento.

Dias de cultivo	Temp. (°C)	pH	O.D. (mg/L)	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>3</sub> (mg/L)
1	27,0	7,6	4,5	0,0	0,0	0,0
4	26,1	7,8	4,5	0,25	0,0	0,0
7	26,5	7,8	3,8	0,5	0,0	0,0
10	27,1	7,8	4,5	0,25	0,25	0 – 5
13	28,2	7,4	4,3	0,25	0,25	20
16	27,1	8,2	4,3	0,25	0,5	10 – 20
19	27,6	7,6	4,2	0,25	0,5	10 – 20
22	28,0	7,8	3,5	0,5	0,25	10 – 20
25	28,1	7,8	4,2	0,25	0,5	20 – 40
28	27,6	8,0	4,2	0,5	0,5	20 – 40

Legenda: Oxigênio dissolvido (O.D.); nitrogênio amoniacal total (NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); nitrato (NO<sub>3</sub>).

As variações observadas durante o período experimental para os parâmetros aquáticos como OD (3,8 a 4,5 mg/L), pH (7,4 a 8,2) e temperatura (26 a 28 °C), bem como os compostos nitrogenados, apresentaram comportamento correspondente ao tipo de ambiente analisado e se mantendo dentro dos limites de conforto da espécie não ocasionando influência no desempenho dos peixes (EMERENCIANO *et al.*, 2021; KUBITZA; KUBITZA, 2013).

Abdel-Tawwab *et al.* (2019) mostraram que peixes criados em ambientes de cultivo, onde as concentrações de oxigênio não estão dentro da faixa ideal para a espécie, apresentavam respostas que variavam desde impactos imunológicos até baixos desempenhos de crescimento. Em virtude de baixas concentrações de OD, os animais apresentavam baixos índices de conversão alimentar e ficavam mais susceptíveis às doenças, podendo causar, em situações mais extremas, alterações fisiológicas irreversíveis.

Da Silva *et al.* (2021), analisando um caso de mortalidade em massa em uma produção de tilápia do Nilo, constataram que a associação de técnicas de manejo inadequadas,

principalmente manejo alimentar, renovação da água de fundo e utilização de sistema de aeração adequada, podiam levar a situações de hipóxia, causando elevadas taxas de mortalidade em sistemas de cultivo.

Na tilapicultura, o monitoramento e controle do pH tem fundamental importância por influir em diversos fatores tanto ambientais, com sua relação com a toxicidade amoniacal e disponibilidade de nutrientes, como fisiológicos, afetando desde o sistema imunológico até a capacidade de regulação iônica. A faixa ideal para um bom desempenho zootécnico dos animais se encontra entre 6,5 e 7,5 (SÁ, 2023).

Yada e Tort (2016) afirmaram que exposição a estresse térmico prolongado pode trazer influências severas aos organismos cultivados, trazendo comprometimento metabólico, inibição de crescimento e redução do desempenho reprodutivo. Além disso, exposições agudas podem resultar desde respostas fisiológicas subletais à mortalidade em massa (SÁ, 2023).

A tilápia do Nilo, apesar de sua rusticidade, expressa respostas negativas quando exposta à faixas térmicas fora de seu ideal de criação, entrando em estado de estresse quando exposta a temperaturas acima de 32 °C e abaixo de 26 °C. Quando mantida fora desse intervalo, os animais entram em estado de estresse térmico, respondendo de maneira negativa aos índices zootécnicos, imunológicos e reprodutivos (MUGWANYA *et al.* 2022).

Da Costa (2018), avaliando os efeitos da amônia no cultivo de tilápia do Nilo, observou que, animais expostos a concentrações superiores a 0,5 mg/L apresentaram alterações histopatológicas nas brânquias, como hiperplasia e descolamento do epitélio branquial. O autor observou, também, lesões graves, surgimento de necroses e perda de estruturas após exposição aguda.

Pelo fato de o modelo de cultivo adotado ser baseado em técnicas de recirculação de água, o controle da qualidade de água é fundamental para garantir o bom funcionamento do sistema aquícola, pelo fato de sua premissa básica ser a mínima renovação de água e a circulação contínua do efluente tratado (SU; SUTARLIE; LOH, 2020). Com esse monitoramento, é possível garantir a mínima influência desses fatores nos resultados zootécnicos e microbiológicos do experimento.

## 5.2 Desempenho zootécnico

Os resultados zootécnicos obtidos após 28 dias de cultivo são apresentados na Tabela 4. Os dados adquiridos foram importantes para futura correlação de dados com os resultados obtidos das análises microbiológicas realizadas.

Tabela 4 - Resultados zootécnicos obtidos durante o processo de masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Variáveis	Resultados médios
População inicial (und.)	210
População final (und.)	$43 \pm 5$
Peso médio inicial (g)	$0,0153 \pm 0,009$
Peso médio final (g)	$0,392 \pm 0,041$
Biomassa inicial por aquário (g)	$3,207 \pm 0,028$
Biomassa final por aquário (g)	$15,654 \pm 1,73$
Biomassa inicial total (g)	16,173
Biomassa final total (g)	78,442
Ganho em peso (g . dia <sup>-1</sup> )	0,0134
Ganho em peso (g em 28 dias <sup>-1</sup> )	0,375
Conversão alimentar	1,61
Sobrevivência (%)	93%

Devido à grande fragilidade dos animais nessa fase de vida, e visando a mínima influência externa de estresse e de contaminação microbiológica, não foi realizado a aferição do comprimento total dos animais durante o cultivo.

A escolha da densidade de estocagem aplicada para o presente trabalho visou garantir o bem-estar animal e otimização do crescimento dos organismos, sem implicar em influências negativas de desempenho zootécnico e de qualidade de água no cultivo (CLAVER; OUATTARA; BERTE, 2019).

O peso médio final dos peixes, obtido nesse estudo, foi de  $0,392 \text{ g} \pm 0,041 \text{ g}$ . Silva *et al.* (2024), em estudo sobre a influência do hormônio  $17\alpha$ -metiltestosterona na larvicultura de tilápia do Nilo, observaram que o hormônio não influenciou o desempenho zootécnico dos peixes em nenhum dos tratamentos. O peso final médio dos peixes obtido por esses autores foi de  $0,1 \text{ g} \pm 0,02 \text{ g}$  para o tratamento sem hormônio, enquanto no tratamento com hormônio foi de  $0,13 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ . O índice encontrado por aqueles autores está abaixo do obtido no presente

estudo. Os resultados obtidos por Ramirez *et al.* (2024), em relação à redução da metiltestosterona e seus impactos nos índices zootécnicos de tilápia do Nilo em sistemas de bioflocos, corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, que apresentou peso final médio de 0,362 g, conversão alimentar de 1,96 e sobrevivência de 93%.

A conversão alimentar constitui um parâmetro de extrema relevância para a aquicultura, visto que permite determinar os gastos de ração necessários para a conversão em peso corporal em um dado cultivo. Asad *et al.* (2023), em estudo sobre a utilização de dois hormônios andrógenos na reversão sexual de tilápia do Nilo, não observaram diferença estatística no fator de conversão alimentar entre os tratamentos. Os resultados por eles obtidos ( $1,65 \pm 0,090$ ) demonstram similaridade com os encontrados no presente estudo (1,61).

A nutrição animal, especialmente em sistemas de cultivo intensivos, exige uma abordagem precisa e personalizada. A escolha do alimento deve ser alinhada ao estágio de desenvolvimento do animal, considerando fatores como tamanho, peso, necessidades nutricionais específicas e hábitos alimentares característicos de cada espécie. Essa prática, conforme destacado por Gule *et al.* (2022), garante uma alimentação otimizada, maximizando o desempenho produtivo e a saúde dos animais.

### **5.3 Análises microbiológicas**

#### **5.3.1 Quantificação das BHCs**

Os resultados das Contagens Padrão em Placas (CPP) das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), expressas em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g), presente na microbiota total dos ovos e dos alevinos amostrados, estão discriminados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados das Contagens Padrão em Placas, realizadas em duplicata, para quantificação de BHC.

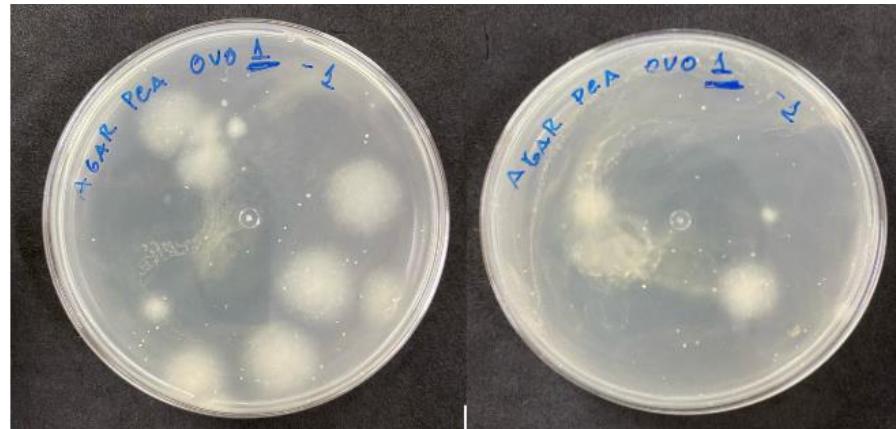
Dias de cultivo	BHC (UFC/g)
Dia zero (Ovos 1*)	$3,77 \times 10^1$
Dia zero (Ovos 2*)	$1,1 \times 10^4$
7	$5,1 \times 10^5$
14	$2,21 \times 10^6$
21	$4,38 \times 10^3$
28	$5,2 \times 10^4$

Ovos 1\* = Ovos sanitizados em solução de formaldeído 4%

Ovos 2\* = Ovos não sanitizados em solução de formaldeído 4%

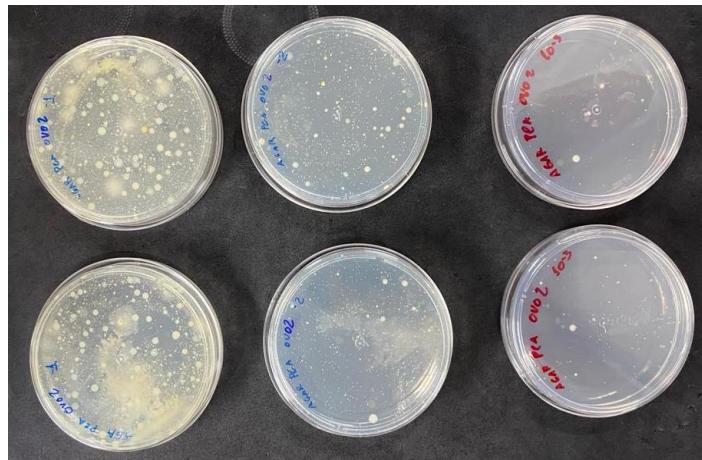
Com base nos resultados obtidos pela cultura de BHCs, foi possível observar que os ovos que passaram pelo processo de sanitização com solução de formaldeído 4%, tiveram uma redução considerável da carga bacteriana de aproximadamente 291 vezes, apresentando crescimento apenas na diluição  $10^{-1}$  (Figura 13). Estes também apresentaram crescimento de fungos até essa diluição. Os ovos que não passaram por sanitização tiveram crescimento de BHCs até a diluição  $10^{-3}$  (Figura 14). Estes também apresentaram crescimento de fungos, porém, apenas as diluições de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

Figura 13 - Crescimento microbiano da amostra de ovos sanitizados em solução de formaldeído 4% em meio não seletivo.



Fonte: o autor (2024).

Figura 14 - Crescimento microbiano da amostra de ovos não sanitizados em ágar PCA.



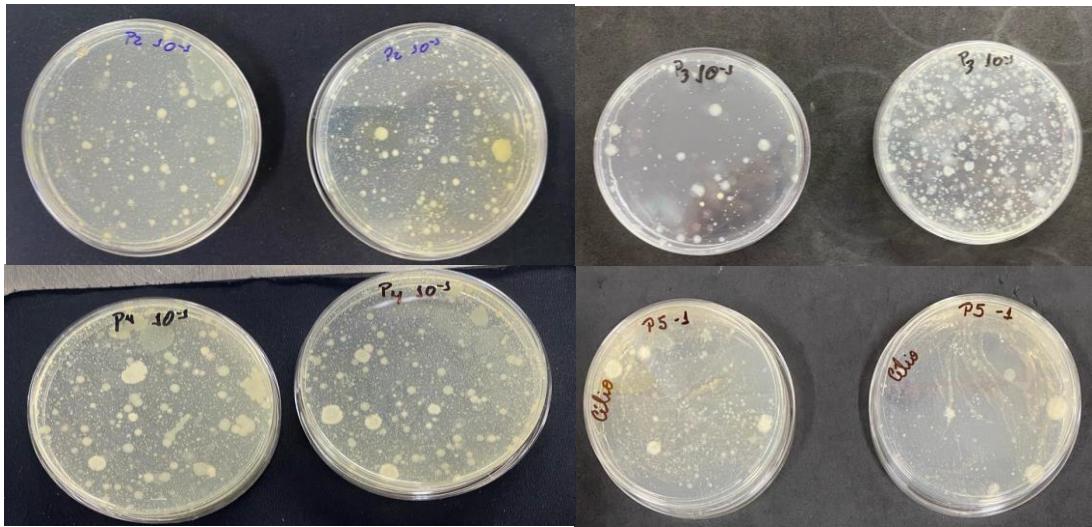
Fonte: o autor (2024).

A sanitização dos ovos com formaldeído, previamente ao processo de incubação artificial, apresentou redução da carga microbiana total, reduzindo de  $1,1 \times 10^4$  UFC/g, para  $3,77 \times 10^1$ . O uso de formaldeído como sanitizante na aquicultura tem como finalidade a eliminação de patógenos pois, devido ao seu caráter eletrofílico, age nos grupos funcionais de macromoléculas como DNA, RNA, proteínas, polissacarídeos e glicoproteínas (FOX *et al.*, 1985). Sua utilização pode ser em banhos de imersão curtos ou longos, requerendo bastante atenção à uma série de fatores biológicos e parâmetros ambientais (FRANCIS-FLOYD, 1996).

O cultivo de tilápia, em virtude de sua reprodução ovípara, expõe os ovos a uma gama variada de microrganismos desde as primeiras etapas de desenvolvimento (SANCHEZ-VASQUEZ *et al.*, 2021). A fim de garantir a sanidade dos alevinos, práticas higiênico-sanitárias rigorosas são indispensáveis. Leal *et al.* (2018) alertaram para os possíveis efeitos adversos deste quimioterápico, como lesões em brânquias, mesmo em baixas concentrações. O equilíbrio entre o controle de doenças e a preservação da saúde dos peixes é crucial, exigindo um manejo cuidadoso da formalina e a busca por alternativas menos tóxicas.

Os ovos utilizados para a realização do monitoramento na fase de Larvicultura foram os ovos sanitizados. Durante as análises microbiológicas desse estudo, foi possível observar uma tendência de crescimento da microbiota dos peixes avaliados, bem como um aumento da diversidade de formas, cores e tamanhos das colônias (Figura 15).

Figura 15 - Crescimento bacteriano em ágar PCA obtido da análise microbiológica de tilápia do Nilo durante o processo de masculinização.



Fonte: o autor (2024).

Os resultados de contagem bacteriana apresentado na tabela 6, apontaram um aumento significativo do número de colônias cultiváveis após a eclosão dos ovos sanitizados. Tal desenvolvimento está associado à colonização microbiana das larvas, modulada pelos fatores ambientais ao qual estavam expostas, como água, sistema de cultivo e alimentação artificial. Verne-Jeffreys *et al.* (2003), analisando a sobrevivência larval do halibute do Atlântico, constataram que a maturação do microbioma larval é extremamente deficiente, tendo seu desenvolvimento acelerado após sua eclosão e interação com o ambiente de cultivo e que, devido a isso, as taxas de mortalidade nessa fase de cultivo são extremamente elevadas, tendo em média 75% de sobrevivência durante sua larvicultura.

Nikouli *et al.* (2019), ao avaliarem o processo de sucessão bacteriana no estágio embrionário de douradas (*Sparus aurata*), demonstraram que as condições artificiais de eclosão dos ovos influenciam o desenvolvimento do microbioma embrionário e larval. A alta densidade em incubadoras acelera a colonização bacteriana dos embriões e, após a eclosão, as larvas ingerem fragmentos de ovos, adquirindo suas comunidades bacterianas. Esse processo acelera o desenvolvimento microbiano e aumenta a capacidade de sobrevivência larval.

Fiedler *et al.* (2023), avaliando a composição da microbiota do salmão do Atlântico durante a fase larval, constataram que a colonização é influenciada, prioritariamente, pelo ambiente de cultivo. Mesmo apresentando baixo desenvolvimento, a microbiota indígena larval representa o primeiro gatilho para sucessão e desenvolvimento microbiano nos primeiros estágios de vida.

As análises realizadas durante a larvicultura da tilápia do Nilo nesse estudo,

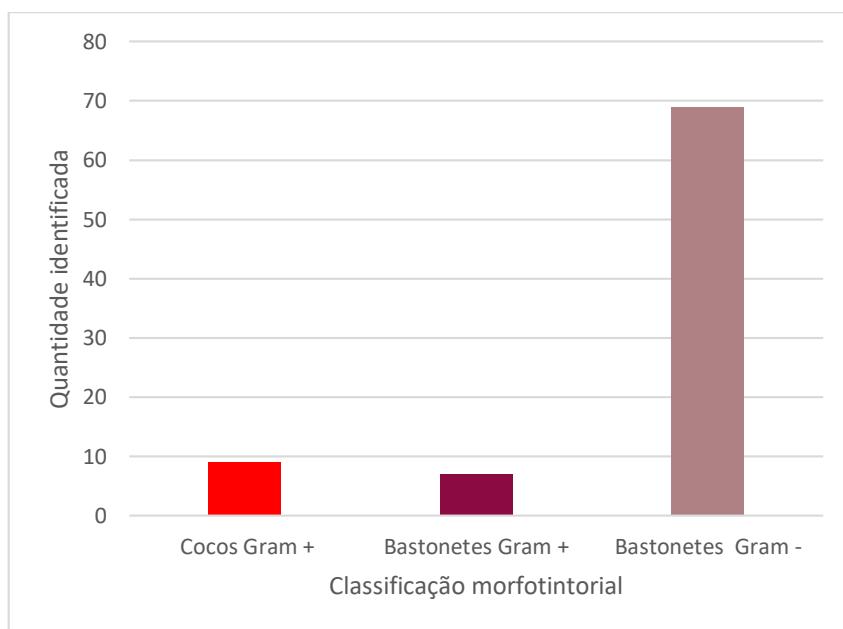
mostraram que o desenvolvimento microbiano não é regular, apresentando oscilações no número de colônias cultiváveis ao decorrer dessa fase de cultivo, seguindo uma tendência de sucessão microbiológica. A quantificação inicial bacteriana da fase de ovo, apresentou uma baixa carga microbiana ( $3,77 \times 10^1$  UFC/g). Após a eclosão e início da alimentação hormonal, foi observado um crescimento da comunidade microbiana total dos animais cultivados, tendo seu pico no décimo quarto dia de cultivo ( $2,21 \times 10^6$  UFC/g).

Deng *et al.* (2021), avaliando a sucessão do microbioma intestinal da tilápia do Nilo, em sistema de bioflocos (BFT) e de recirculação de água (RAS), observaram um efeito temporal no desenvolvimento microbiano para ambos os sistemas. Foram observadas que as cargas microbianas em ambos os sistemas seguiram uma tendência de crescimento qualiquantitativo. Entretanto, para os animais cultivados em sistema BFT desde a eclosão larval, os autores constataram que o ambiente de cultivo modulou positivamente a composição bacteriana dos animais tanto em diversidade quanto em quantidade, trazendo efeitos positivos em sobrevivência e conversão alimentar.

### **5.3.2 Identificação fenotípica**

Em análise da microbiota da fase de larvicultura da tilápia do Nilo, a coloração de Gram revelou uma predominância significativa de bacilos Gram-negativos (81,2%), enquanto cocos Gram-positivos e bacilos Gram-positivos representaram, respectivamente, 10,2% e 8,2% dos isolados, conforme demonstrado no Gráfico 2.

Gráfico 1 - Quantificação dos isolados bacterianos quanto à sua classificação morfotintorial.



Fonte: o autor (2024).

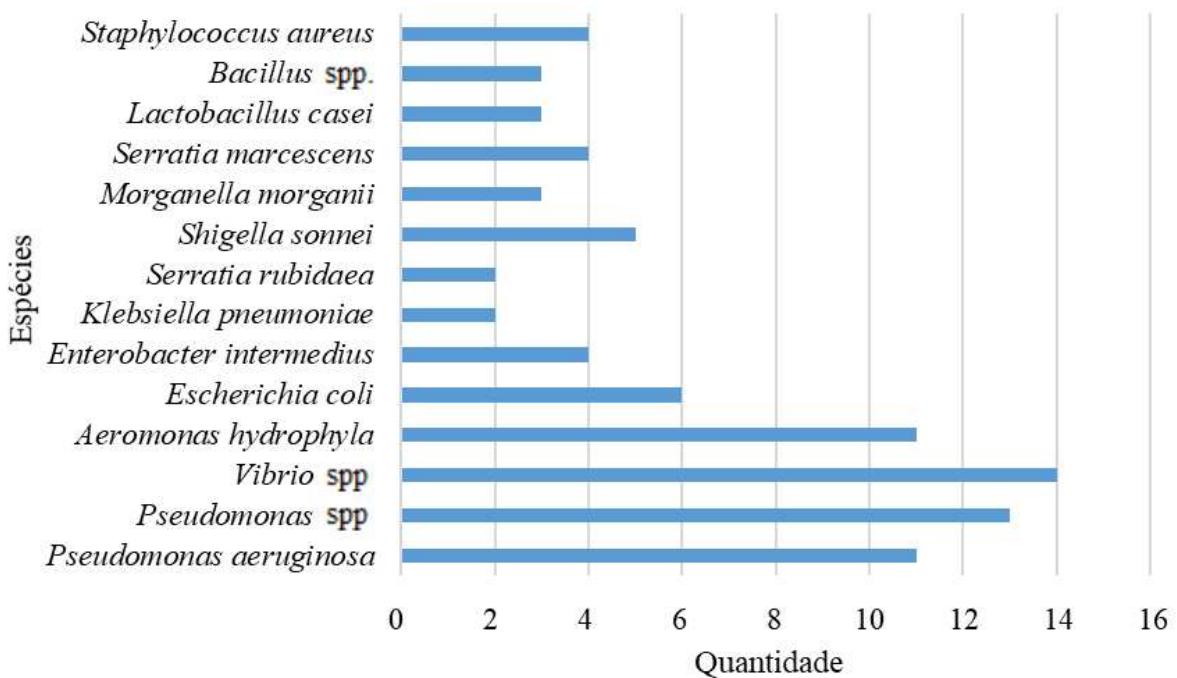
A técnica de Coloração de Gram foi realizada com a finalidade de constatar a pureza das cepas isoladas, mas, principalmente, para realizar a caracterização das bactérias com base em suas formas e estrutura de suas paredes celulares (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

A composição da microbiota da tilápia do Nilo é dinâmica e influenciada por diversos fatores, como estágio de vida, dieta e condições ambientais. Estudos como o de De Macedo *et al.* (2023), que avaliaram o impacto da suplementação de xilanase e  $\beta$ -glucanase na microbiota intestinal de juvenis de tilápia, demonstram a sensibilidade desse ecossistema microbiano a diferentes intervenções. Embora a diversidade microbiana tenha sido alterada pela suplementação, a predominância de bactérias Gram-negativas permaneceu consistente entre os grupos (76,57% para o tratamento controle e 97,18% para o tratamento suplementado), corroborando com os resultados do presente estudo, que também indicaram uma elevada proporção de bactérias Gram-negativas (81,2%). Essa predominância de bactérias Gram-negativas é frequentemente observada em estudos com tilápia, como encontrado também por Ran *et al.* (2016).

De acordo com a metodologia proposta pelo Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey's (MURRAY; BREED; SMITH, 1957), foi possível a determinação a nível de gênero do microbioma total da tilápia do Nilo, desde sua fase embrionária, até a conclusão do período de masculinização. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico

2.

Gráfico 2 - Identificação fenotípica a nível de gênero e espécie das bactérias heterotróficas cultiváveis durante a larvicultura da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.



As espécies do gênero *Vibrio* são bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes que estão amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes aquáticos, com ocorrências desde ambientes dulcícidas, estuarinos e marinhos (BAKER-AUSTIN, 2018). Relatos apontam estirpes com potencial patogênico tanto para humanos quanto para organismos aquáticos. Surtos causados por vibrioses tanto em peixes quanto camarões, apontam severos prejuízos para o setor aquícola e que, devido à multirresistência adquirida a antibióticos, seu controle se tornou um desafio (MURSIDI *et al.*, 2019).

Cai *et al.* (2024) relataram um surto de vibriose em matrizes de tilápia do Nilo criadas em um sistema de recirculação com alta densidade de estocagem (100 peixes/m<sup>3</sup>), sob condições estressoras de salinidade de 15‰ e níveis de nitrito de 2 mg/L. Lesões cutâneas, provavelmente causadas pelos procedimentos de manejo emergencial, atuaram como porta de entrada permitindo a penetração do *Vibrio vulnificus*, identificada como o agente etiológico do surto. As condições de cultivo inadequadas, ao comprometer o sistema imune dos animais, tornaram-nos mais suscetíveis à infecção. Esses resultados demonstram a importância de manter condições de cultivo adequadas para prevenir a ocorrência de vibriose em tilápias, uma vez que a presença de *Vibrio* em sistemas de produção é inevitável.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, desde água (dulcícolas, estuarinas e marinhas) e solo, bem como hospedeiros vegetais e animais. São bastonetes Gram negativas não esporulantes, com algumas de suas espécies produtoras de pigmento, característica essa fundamental para sua identificação (AUSTIN, 2016).

O gênero *Pseudomonas* engloba mais de 594 espécies descritas, com estudos associados tanto à fatores benéficos quanto deletérios para produção animal, biorremediação de ambientes degradados e a saúde humana (DSMZ, 2024; LPSN, 2018; LUPO; HAENNI; MADEC, 2018). Suas principais representantes patogênicas para aquicultura (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis*) são caracterizadas como bactérias oportunistas relacionadas ao estresse nos ambientes de criação (TAWFEEK *et al.*, 2024).

Elbaz e Abd Al Fatah (2024) investigaram um evento de mortalidade em massa em um cultivo de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* e carpa comum, *Cyprinus carpio* no Egito, associado a altas temperaturas, baixa oxigenação e amônia elevada na água. As análises microbiológicas identificaram *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* e *Streptococcus iniae* como os principais agentes etiológicos. Os autores sugerem que a combinação de fatores de estresse, como a alta densidade populacional de peixes e as condições ambientais adversas, em conjunto com a alta carga bacteriana, contribuiu para a virulência dos patógenos e a ocorrência de mortalidades em massa.

Dentre os microrganismos que apresentam grande relevância para a aquicultura, *Aeromonas hydrophila* configura uma espécie com elevado potencial patogênico tanto para o cultivo aquícola, como também para o homem. Caracterizada como uma bactéria Gram negativa em forma de bastonete, pode ser encontrada em ambientes de água doce e salobra. Quando acometida em peixes, causa elevadas taxas de mortalidade, com quadros agudos de septicemia e ulcerações cutâneas (JANDA; ABBOTT, 2010).

Embora pertencente ao microbioma indígena intestinal de diversas espécies animais, bem como encontrada também no ambiente, *Escherichia coli* possui fatores de virulência com capacidade de causar doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). O uso indiscriminado de antimicrobianos e sua presença cada vez mais constante no ambiente favorece o surgimento de bactérias com multirresistência a antimicrobianos, limitando as possibilidades de tratamento em casos de infecção, elevando as taxas de mortalidade (THAOTUMPITAK *et al.*, 2024).

Durante todas as fases de cultivo, a tilápia encontra-se exposta a uma enorme diversidade de microrganismos. Dentre eles, alguns podem apresentar grande potencial

patogênico para os animais cultivados. Pech, Chavez e Reynoso (2017), analisando a microbiota bacteriana encontrada em exemplares de tilápia do Nilo, em uma fazenda localizada no México, constatou a presença de uma enorme diversidade microbiológica presente em animais em fase de engorda. Durante o estudo, observou-se a presença de bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Edwardsiella* e *Enterococcus*. Os autores acreditam que, pelo fato desses microrganismos estarem presentes no ambiente de cultivo, podem ser patogênicos aos animais cultivados, quando estes estiverem em altas densidades, portanto, sob condições de estresse.

A análise da microbiota revelou uma diversidade microbiana significativa, com predominância de membros das famílias Enterobacteriaceae (26%), seguida por Pseudomonadaceae (24%), Vibrionaceae (14%) e Aeromonadaceae (11%). Em menor proporção, foram isoladas Micrococcaceae (4%), Lactobacillaceae (3%) e Bacillaceae (3%). A Tabela 6 apresenta a distribuição das estirpes bacterianas classificadas de acordo com suas famílias.

Tabela 6. Identificação das estirpes bacterianas isoladas de *pool* total de larvas de tilápia do Nilo em sistema fechado de cultivo.

Família	Identificação	Número de isolados
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
	<i>Pseudomonas</i> spp.	14
Vibrionaceae	<i>Vibrio</i> spp.	14
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas hydrophyla</i>	11
	<i>Escherichia coli</i>	6
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter intermedius</i>	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
	<i>Serratia rubidaea</i>	2
	<i>Shigella sonnei</i>	5
	<i>Morganella morganii</i>	3
	<i>Serratia marcescens</i>	4
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus casei</i>	3
Bacillaceae	<i>Bacillus</i> spp.	3
Micrococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	4
<b>Total de isolados</b>		<b>120</b>
<b>Total de isolados identificados</b>		<b>87</b>

A microbiota associada a peixes teleósteos desempenha um papel fundamental na saúde e na fisiologia do hospedeiro. Essa comunidade microbiana complexa, colonizando principalmente pele, guelras e intestino, atua como uma primeira linha de defesa contra

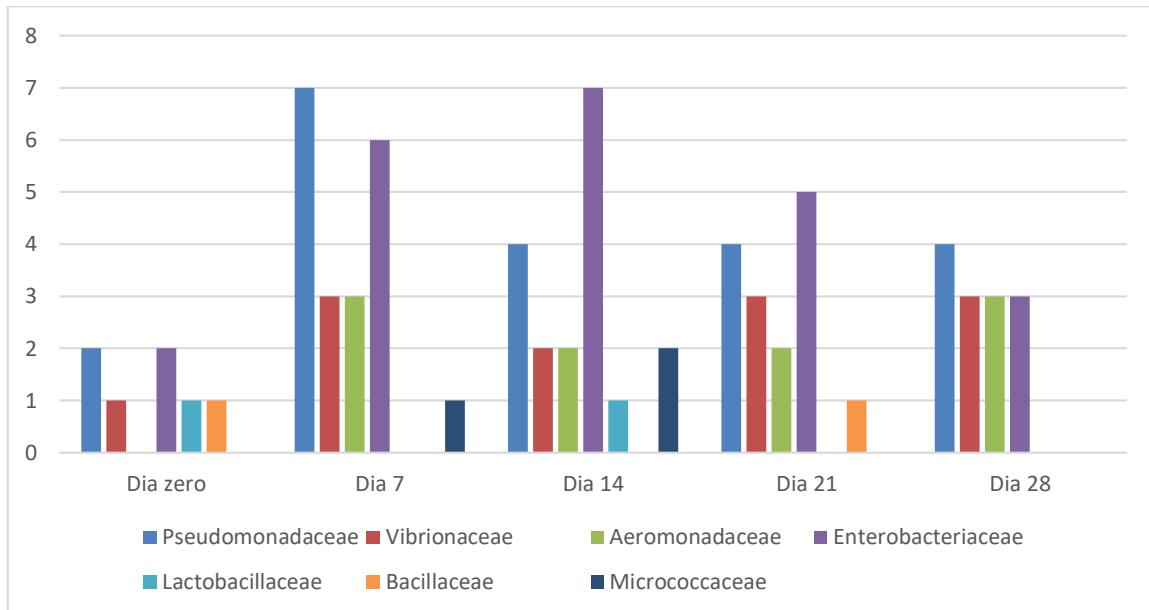
patógenos, competindo por nutrientes e espaço, e produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas (AUCLERT; CHHANDA; DEROME, 2024). Merrifield e Rodiles (2015), avaliando o microbioma de peixes teleósteos e sua interação com tecidos mucosos, relata a diversa composição da microbiota intestinal de peixes teleósteos, com destaque para famílias como Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae, Micrococcaceae e Microbacteriaceae.

Liu *et al.* (2014), em seu estudo de caracterização do microbioma de ovos de salmão do Atlântico, relatou os riscos e influências de contaminações fúngicas na fase embrionária dessa espécie, e como isso afeta a estrutura das comunidades microbianas. Nesse estudo, foi observado um maior domínio de Enterobacteriaceae detendo 44% das estirpes identificadas. Vibrionaceae e Aeromonadaceae também apresentaram grande representatividade populacional.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os achados de Sanyal *et al.* (2018), que identificaram *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. e Enterobacteriaceae como os principais microrganismos associados à microbiota de carpas cultivadas na Índia. A similaridade entre os perfis microbianos da tilápia analisada neste estudo e das carpas indianas sugere a existência de um padrão comum na composição da microbiota intestinal de peixes cultivados, com a predominância desses grupos bacterianos.

O Gráfico 3 traz a predominância bacteriana nos períodos amostrais, abordando o processo de desenvolvimento bacteriano durante a fase de larvicultura. A partir dos resultados encontrados, foi possível observar o aumento do desenvolvimento do bacterioma dos animais cultivados, tanto em quantidade quanto diversidade.

Gráfico 3 - Desenvolvimento da microbiota identificada da tilápia do Nilo durante a fase de larvicultura.



Os resultados revelaram uma dinâmica microbiana complexa ao longo do cultivo, caracterizada por uma crescente diversidade bacteriana. As famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae demonstraram dominância desde as primeiras etapas de vida, persistindo mesmo após o tratamento com formaldeído. No entanto, após 28 dias de cultivo, observou-se um equilíbrio quantitativo entre essas famílias e membros da família Vibrionaceae e Aeromonadaceae, indicando uma adaptação da comunidade microbiana às condições do cultivo. Essa dinâmica pode estar relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos como, disponibilidade de nutrientes e condições físicas e químicas da água.

A teoria de Vellend (2016), propõe que os principais processos moldadores da estrutura e dinâmica de comunidades ecológicas estão baseados em quatro princípios: seleção, dispersão, especiação e deriva. Esse entendimento oferece um arcabouço teórico robusto para interpretar os resultados obtidos neste estudo. A compreensão da interação desses processos é fundamental para elucidar os padrões de diversidade e sucessão microbiana observados nos organismos cultivados, uma vez que eles atuam em conjunto, influenciando a composição, abundância e dinâmica do microbioma da espécie ao longo do tempo.

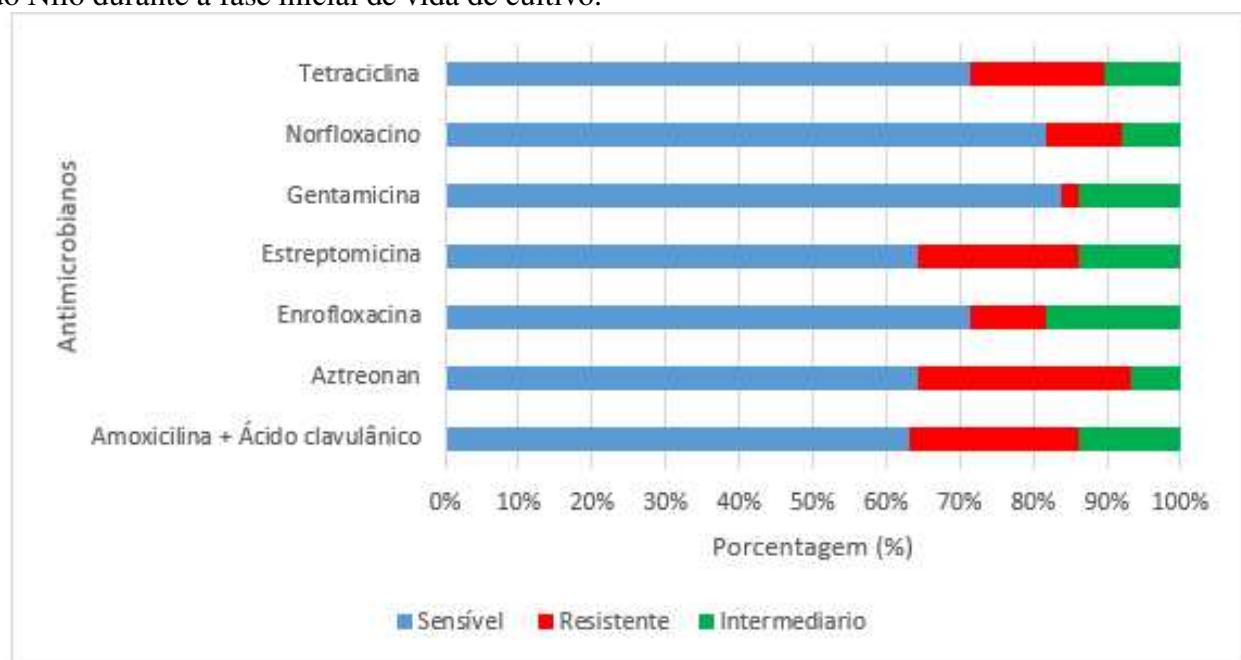
A análise da relação entre o microbioma da tilápia e o ambiente de cultivo, conforme demonstrado por McMurtie *et al.* (2022), evidencia a influência de fatores geográficos, ambientais e de manejo na modulação da comunidade microbiana tanto dos peixes quanto do meio aquático. A presente pesquisa corrobora com os achados de McMurtie *et al.* (2022), ao identificarem uma notável diversidade microbiana, com destaque para a

predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas*.

### 5.3.3 Resistência a antimicrobianos

Entre as 87 estirpes bacterianas identificadas, a maior taxa de resistência foi observada para o antibiótico aztreonam (28,3%), seguido por amoxicilina + ácido clavulânico (23,5%). Tetraciclina apresentou resistência em 18,82% das cepas, enquanto enrofloxacino e norfloxacino em 10,5% e gentamicina em apenas 2,35%, como apresentado no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Percentual de resistência a diferentes antimicrobianos de cepas isoladas de tilápia do Nilo durante a fase inicial de vida de cultivo.



Em um estudo com carpas cultivadas na Índia, Sanyal *et al.* (2018) identificaram uma alta prevalência de *Aeromonas*, *Pseudomonas* e Enterobacteriaceae. As análises de sensibilidade a antimicrobianos revelaram baixa eficácia da amoxicilina + ácido clavulânico (2,38%) e tetraciclina (40,48%) contra esses isolados. Em contrapartida, a gentamicina demonstrou alta taxa de eficiência inibitória (83,3%), destacando seu potencial como quimioterápico para o controle dessas bactérias nessa espécie de peixe.

Os antimicrobianos são amplamente utilizados para o tratamento e controle de enfermidades no cultivo de peixes. Seus usos prolongados provocam a seleção de bactérias resistentes e também aumentam a taxa de transferência horizontal de genes patogênicos, tanto para humanos quanto animais de cultivo. A presença residual de antibióticos no ambiente favorece o processo bioacumulativo em peixes comercializados, tornando-se um risco também para os consumidores finais desses produtos (CABELLO *et al.*, 2013).

Preena, Dharmaratnam e Swaminathan (2020) identificaram um alto índice de multirresistência a antimicrobianos em isolados bacterianos de tilápia do Nilo, com destaque para a resistência a glicopeptídeos e tetraciclinas. Os autores observaram taxas menores de resistência para quinolonas, betalactâmicos e aminoglicosídeos, corroborando com os achados do presente estudo.

Dos isolados analisados, duas cepas apresentaram perfil de resistência enquadrada como MDR – multidroga resistente, suportando a presença de ao menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos, sendo elas duas cepas de *Aeromonas hydrophyla* com resistência ao aztreonam, amoxicilina + ácido clavulânico, tetraciclina e norfloxacino. O resultado completo e detalhado dos resultados obtidos nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos testados estão apresentados na Tabela 8.

A presença de bactérias multirresistentes a drogas tem se tornado algo cada vez mais comum, devido a mutações genéticas aleatórias adquiridas por células durante o processo de crescimento bacteriano. Nesse processo, cepas resistentes são formadas a partir dessas células, e disseminados por transferência horizontal de genes (DROPA, 2012). A avaliação da susceptibilidade e grau de resistência de antimicrobianos a determinados patógenos garante uma maior eficiência na tomada de decisões de tratamentos, minimizando gastos com tratamentos ineficientes e maximizando a saúde e segurança do ambiente.

NHINH *et al.* (2021), avaliando a presença de *Aeromonas hydrophyla* em surtos de doenças em pisciculturas de água doce, observaram que 100% dos isolados apresentaram algum grau de resistência para 16 agentes de 11 subclasses de antibióticos, contendo também uma elevada presença de multirresistência, com as maiores taxas observadas para o grupo das penicilinas, vancomicinas, betalactâmicos e fluoroquinolonas.

Tabela 8 - Resultados susceptibilidade a antibióticos dos isolado bacterianos da microbiota da fase larval de tilápias.

Antibióticos	Fase de cultivo larval																	
	Dia zero (Ovo 1) n = 7			Dia zero (Ovo 2) n= 12			Dia 7 n = 20			Dia 14 n = 18			Dia 21 n = 15			Dia 28 n = 13		
	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)
Amoxicilina + Ácido clavulânico	2 (29%)	1 (14%)	4 (57%)	5 (42%)	2 (17%)	7 (58%)	3 (15%)	4 (20%)	13 (65%)	3 (17%)	2 (11%)	13 (72%)	3 (20%)	2 (13%)	10 (67%)	4 (30%)	1 (8%)	8 (62%)
Aztreonan	4 (57%)	0	3 (43%)	4 (33%)	1 (8%)	8 (67%)	5 (25%)	1 (5%)	14 (70%)	7 (38,8%)	3 (17%)	8 (44%)	3 (20%)	0	12 (80%)	2 (15%)	0	11 (85%)
Enrofloxacino	2 (29%)	1 (14%)	4 (57%)	1 (8%)	3 (25%)	11 (92%)	2 (10%)	5 (25%)	13 (65%)	3 (17%)	3 (17%)	12 (66,6%)	1 (7%)	2 (13%)	12 (80%)	0 (15%)	2 (15%)	11 (85%)
Estreptomicina	3 (43)	1 (14%)	3 (43%)	3 (25%)	4 (33%)	9 (75%)	6 (30%)	3 (15%)	11 (55%)	2 (11%)	1 (5,5%)	15 (83%)	4 (27%)	1 (7%)	11 (73%)	2 (15%)	2 (15%)	9 (69%)
Gentamicina	2 (29%)	2 (29%)	3 (43%)	0	1 (8%)	12 (100%)	0	3 (15%)	17 (100%)	0	0	18 (100%)	0	3 (20%)	12 (80%)	0 (23%)	3 (23%)	10 (76%)
Norfloxacino	1 (14%)	1 (14%)	5 (71%)	2 (17%)	2 (17%)	10 (83%)	2 (10%)	1 (5%)	17 (90%)	2 (11%)	2 (11%)	14 (78%)	1 (7%)	1 (7%)	13 (87%)	1 (8%)	0	12 (92%)
Tetraciclina	2 (29%)	0	5 (71%)	1 (8%)	2 (17%)	11 (92%)	7 (35%)	4 (20%)	9 (45%)	3 (17%)	1 (5,5%)	14 (78%)	2 (13%)	1 (%7)	12 (80%)	1 (8%)	1 (8%)	11 (85%)

Legenda: n = número; R = resistente; I = intermediário; S = sensível; Ovo 1 = Ovos não sanitizados; Ovo 2 = ovos sanitizados

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos revelaram resultados de inibição intermediária para todos os quimioterápicos avaliados. De acordo com Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST/BrCAST, tais resultados indicam uma possível ineficácia ou insuficiência desses fármacos frente às estirpes bacterianas desse estudo. Embora tais resultados não descartem a utilidade terapêutica dos antibióticos, têm-se a necessidade de ajustes nos protocolos de exposição e concentração para garantir a otimização da terapia antimicrobiana (EUCAST/BrCAST, 2024).

## 6 CONCLUSÃO

A aplicação do procedimento de sanitização se mostrou eficaz para redução da carga microbiana dos ovos de tilápia, contudo, pode ter alterado a dinâmica de colonização bacteriana inicial nas larvas, modulando sua microbiota e potencialmente impactando o desenvolvimento e a saúde dos peixes.

A diversidade microbiana encontrada demonstra a complexidade das interações entre o hospedeiro e a comunidade bacteriana. A abundância encontrada, bem como a sucessão ecológica observada ao longo da larvicultura sugere que fatores extrínsecos, como a alimentação e as condições de cultivo, exercem uma influência significativa na composição e dinâmica da microbiota. Foi observado maior predominância de bactérias pertencentes às famílias das Enterobacteriaceae (26%) e Pseudomonadaceae (24%).

Os parâmetros da qualidade da água permaneceram dentro dos limites adequados para o cultivo da espécie, e os índices zootécnicos obtidos foram satisfatórios para a fase avaliada, sendo condizentes com a bibliografia comparada. Esses resultados indicam condições de cultivo favoráveis para o crescimento saudável das tilápias.

Nos testes de sensibilidade a antimicrobianos, foi observada resistência para todos os antibióticos testados. Esses resultados possivelmente estão associados ao uso indiscriminado das fazendas aquícolas, bem como pelo descarte indevido desses fármacos no ambiente.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a importância da adoção de estratégias inovadoras para o manejo da saúde de peixes em sistemas de produção intensivos. A necessidade de reduzir o uso de antimicrobianos e o controle rigoroso das condições de cultivo são cruciais para garantir a sustentabilidade da aquicultura e a segurança alimentar. O desenvolvimento de probióticos, prebióticos e outras ferramentas biotecnológicas pode representar uma alternativa promissora para a prevenção e o controle de doenças em peixes.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M. *et al.* Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. **Fish physiology and biochemistry**, [s. l.], v. 45, p. 997-1013, 2019.
- ABD EL-HACK, M. E. *et al.* Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International journal of biometeorology**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 2183-2194, 2022.
- ALVES, L. S. A. *et al.* Qualidade microbiológica da água para fins de aquicultura no estado do Maranhão: levantamento das análises realizadas em laboratório de controle da qualidade no período de 2015 a 2021. **Tecnologia e microbiologia sob a perspectiva da segurança dos alimentos**, [s. l.], v. 2, p. 140-150, 2022.
- ANA - Sistema de Acompanhamento de Reservatórios (SAR), Disponível em: <https://www.ana.gov.br/sar/>, 2017. Acesso em: 17 setembro de 2024.
- ANDRADE, A.S. Aquicultura brasileira: a visão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a partir do Sistema de Registro Geral da Pesca e Aquicultura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e2759108398, 2020
- ASAD, F. *et al.* Effect of natural and synthetic androgen hormone on sex reversal of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 84, p. e272413, 2023.
- AUCLERT, L. Z.; CHHANDA, M. S. ; DEROME, N. Interwoven processes in fish development: microbial community succession and immune maturation. **PeerJ**, [s. l.], v. 12, p. e17051, 2024.
- AUSTIN, B. ; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens:** disease of farmed and wild fish. Godalming, 4 ed., 732 p. Springer, 2016.
- BAKER-AUSTIN, C. *et al.* *Vibrio* spp. infections. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1-19, 2018.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2009.
- BALDO, L. *et al.* Phylogeography and ecological niche shape the cichlid fish gut microbiota in Central American and African Lakes. **Frontiers in microbiology**, Barcelona, v. 10, p. 471825, 2019.
- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testins by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Oxford University Press, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. **Symbiosis**, [s. l.], Springer v. 72, p. 1-11, 2017.

- BEREDED, N. K. *et al.* Metabarcoding analyses of gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Awassa and Lake Chamo, Ethiopia. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1040, 2020.
- BEVERIDGE, C. M; MCANDREW, B. (ed.). **Tilapias: biology and exploitation**. University of Stirling. Springer Science & Business Media, 2012.
- BORGES, N. *et al.* Bacteriome structure, function, and probiotics in fish larviculture: the good, the bad, and the gaps. **Annual Review of Animal Biosciences**, [s. l.], ed. 9, p. 423-452, 2021.
- BRCAST. **Brazilian Committee on Antimicrobial susceptibility testing – BrCAST**. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos (Versão 11.0), 2021b. 2021.
- BRCAST. **Brazilian Committee on Antimicrobial susceptibility testing**. Tabelas e ponto de corte para interpretação de CIMs e diametros de halos. Versão BrCAST válida a partir de 13-04-2024.
- CAI, Y. *et al.* Case of *Vibrio vulnificus* Infection in *Orechromis niloticus* during Suspension of Recirculating Aquaculture System. **Water**, [s. l.], v. 16, n. 13, p. 1878, 2024.
- CABELLO, F. C. *et al.* Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental microbiology**, [s. l.], v. 15, ed. .7, 2013.
- CLAVER, Z. E. A.; OUATTARA, I. N.; BERTE, S. Effect of stocking density on the growth and food use parameters of larvae of the Brazil strain of tilapia of the Nile *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) during periods of sexual inversion by hapa installed in a pond in the ground. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, Houphouët Boigny University, ed. 7, v. 5, p. 370-375 2019.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th ed. Informational supplement, M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2024.
- COSTA, F. F. B. **Efeito agudo e subcrônico da amônia sobre a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. Dissertação (Mestrado), 52 f. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.
- DENG, Y. *et al.* Impact of early-life rearing history on gut microbiome succession and performance of Nile tilapia. **Animal microbiome**, [s. l.], v. 3, p. 1-17, 2021.
- DIWAN, A. D.; HARKE, S. N.; PANACHE, A. N. Host-microbiome interaction in fish and shellfish: An overview. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, [s. l.], p. 100091, 2023.

DONG, H. T. *et al.* Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. **Aquaculture**, [s. l.], v. 448, p. 427-435, 2015.

DOTTA, G.; PIAZZA, R. S. **Manejo e sanidade no cultivo.** Dados eletrônicos (1 arquivo: 6 megabytes). Curitiba: Instituto Federal do Paraná, 2012.

DROPA, M. **Disseminação de resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de Enterobacteriaceae:** identificação e mapeamento genético de genes codificadores ESBL. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, 118p. São Paulo, 2012

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen** GmbH [citado 02 de Out. 2024]. Disponível em: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.html>

EGGER, R. C. *et al.* Emerging fish pathogens Lactococcus petauri and L. garvieae in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, [s. l.], v. 565, p. 739093, 2023.

EISSA, A. E. *et al.* Streptococcus, Centrocestus formosanus and Myxobolus tilapiae concurrent infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 158, p. 105084, 2021

ELBAZ, N. F.; ABD AL FATAH, M. E. Bacterial diseases outbreaks in some freshwater fish farms in Kafr El-Sheikh, Egypt. **Journal of Applied Aquaculture**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1-23, 2024.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc technology (BFT) in tilapia culture. In: Lopes-Olmeda, J. F.; Sánchez-Vazquez, F. J.; Forte-Silva, R., (edição). **Biology and Aquaculture of Tilapia**, Florida, ed. 1, p. 258-293. Editora CRC Press/Taylor & Francis Group, 2021.

EUCAST. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing - EUCAST disk diffusion method (Version 9.0), 2021.

FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2024.** Rome: FAO, 2024, 264 p.

FIEDLER, A. W. *et al.* The stability and composition of the gut and skin microbiota of Atlantic salmon throughout the yolk sac stage. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 1177972, 2023.

FOX, C. H. *et al.* Formaldehyde fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [s. l.], ed. 8, p. 845-853, 1985.

FRANCIS-FLOYD, R. Use of formalin to control fish parasites. **Institute of Food and Agriculture Sciences**, University of Florida Cooperative Extension Service, EDIS; 1996.

GEREMIA, D. A. A. *et al.* The role of the intestine in immunological homeostasis. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 55181-55191, 2021.

GODINHO, M. et al. Aquicultura no Brasil: perspectivas para 2030. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1-17, 2021.

GUAN, B. et al. Pathogen identification, risk factor and preventive measure of a columnaris disease outbreak in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) eggs and larvae from a tilapia hatchery. **Aquaculture**, [s. l.], v. 561, p. 738718, 2022.

GULE, T. T. et al. Dietary strategies for better utilization of aquafeeds in Tilapia farming. **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 2022, p. 9463307, 2022.

HANSEN, G. H.; OLAFSEN, J. A. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. **Microbial ecology**, [s. l.], v. 38, p. 1-26, 1999.

**IBGE - Censo Agropecuário:** Características gerais das produções agropecuária e extrativista. Brasil, disponível em:  
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html>. Acesso em: 23 setembro de 2024.

ISHIKAWA, M. M. et al. Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros. **Documentos: Embrapa Agropecuária Oeste**. Dourados, Minas Gerais, ed. 1, 47 p., 2012.

ISHIKAWA, M. M. et al. Uso de biomarcadores em peixe e boas práticas de manejo sanitário para a piscicultura. **Embrapa Meio Ambiente**, São Paulo, ed. 1, 29 p. 2020.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], p. 35-73. 2010

KAPER, J. B., NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic escherichia coli. **Nature reviews microbiology**, [s. l.], p. 123-140, 2004.

KOBAYASHI, M. et al. **Fish to 2030: The Role and Opportunity for Aquaculture**. Aquaculture economics & management, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 282-300, 2015.

KUBITZA, F. **Tilápis: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Kubitza Ed., 316p., 2011.

KUBITZA, F; KUBITZA, L. M. M. **Saúde e Manejo Sanitário na Criação de Tilápias em Tanques-Redes**. Jundiaí, 1<sup>a</sup> ed., 203 p. 2013.

LAGO, A. A. et al. The development of genetically improved red tilapia lines through the backcross breeding of two *Oreochromis niloticus* strains. **Aquaculture**, [s. l.], v. 472, p. 17-22, 2017.

LEAL, J. F. et al. Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 281-295, 2018.

LEGRAND, T. P. et al. The inner workings of the outer surface: skin and gill microbiota as indicators of changing gut health in yellowtail kingfish. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v.

8, p. 2664, 2018.

LEIRA, M. H. *et al.* Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do brasil – uma revisão. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016.

LINDHOLM-LEHTO, P. Water quality monitoring in recirculating aquaculture systems. **Aquaculture, Fish and Fisheries**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 113-131, 2023.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature reviews microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 661-672, 2014.

LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 68, [s. l.], 1825-1829, 2018.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiology spectrum**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. arba-0007-2017, 2018.

LUZ, R. K. *et al.* Larvicultura de tilápis em água doce e água salinizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** Universidade Federal de Minas Gerais (Escola de Veterinária), v. 48, p. 1150-1157, 2013.

MACÊDO, E. S. *et al.* Efeito da xilanase e da β-glucanase no desempenho de crescimento, atividade de enzimas digestivas, digestibilidade e diversidade do microbioma de tilápias-donilo juvenis alimentadas com farelo de soja e/ou grãos secos de sorgo destilado com dietas baseadas em solúveis. **Aquaculture**, [s. l.], v. 565, p. 739134, 2023.

MARQUES, K. D. *et al.* Anesthesia and analgesia in teleost fish. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 79603-79608, 2021.

MANNAN, M. *et al.* Antibacterial activity of oxytetracycline on microbial ecology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) gastrointestinal tract under laboratory condition. **Aquaculture research**, [s. l.], v. 51, n. 5, pág. 2125-2133, 2020.

MARTINS, P. R. F. *et al.* Antimicrobial resistance in aquaculture: a global overview and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 1988, 2017.

MCMURTRIE, J. *et al.* Relationships between pond water and tilapia skin microbiomes in aquaculture ponds in Malawi. **Aquaculture**, [s. l.], v. 558, p. 738367, 2022

MERRIFIELD, D. L.; RODILES, A. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: BECK, B. H.; PEATMAN, E. (edição). **Mucosal health in aquaculture**. Editora: Academic Press, p. 273-295, 2015.

MONTEIRO, S. H. **Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, Reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo.** 111 p. Tese (Doutorado), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

- MUGWANYA, M. *et al.* Anthropogenic temperature fluctuations and their effect on aquaculture: A comprehensive review. **Aquaculture and Fisheries**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 223-243, 2022.
- MURSIDI, F. A. *et al.* Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. **Journal of Aquatic Animal Health**, [s. l.], v. 31, n. 1, 2019.
- MURRAY, E. G. D.; BREED, R. S.; SMITH, N. R. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7<sup>a</sup>. ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company, v. Único, 1957.
- NASCIMENTO, C. C. *et al.* Aquicultura no Brasil: panorama atual e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 1949-1962, 2020.
- NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture research**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 1553-1573, 2010.
- NHINH, D. T. *et al.* Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, ed. 5, p. 532, 2021
- NIKOULI *et al.* Host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Genes**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 483, 2019.
- OLIVEIRA, A. M. S. *et al.* Padrões de crescimento de machos e fêmeas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da variedade GIFT. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 1891-1900, 30 ago. 2013.
- OLIVEIRA, E. G. *et al.* Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. Circular técnica 45, **Embrapa Meio-Norte**, Teresina, Piauí. 2007.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais. **Perspectivas da População Mundial 2022**. Nova York: ONU, 2022. p. 35.
- PADUA, S. B.; FILHO, R. N. M. Antibióticos na aquicultura: critérios para o uso racional. **Panorama da aquicultura**, Rio de Janeiro, v.24, n°145, Setembro/Outubro, 2014.
- PADUA, S. B.; FILHO, R. N. M. Controle e erradicação de doenças na produção de alevinos de tilápia. **Panorama da aquicultura**, Rio de Janeiro, v.25, n°150, Julho/Agosto, 2015.
- PECH, Z. G. H.; CHAVEZ, M. R. C.; REYNOSO, F. L. Pathogenic bacteria in *Oreochromis niloticus* var. Stirling tilapia culture. **Fisheries and Aquaculture Journal**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1I-1I, 2017.
- PEIXES BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2023. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2023.

PRABU, E. *et al.* Tilapia an excellent candidate species for world aquaculture: a review. **Annual Research & Review in Biology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 14. 2019.

PREENA, P. G.; DHARMARATNAM, A.; SWAMINATHAN, T. R. Antimicrobial resistance analysis of pathogenic bacteria isolated from freshwater Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in Kerala, India. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 11, p. 3278-3287, 2020.

RAMÍREZ, J. F. P. *et al.* Reduction of methyltestosterone concentration in feed during masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in biofloc system. **Aquaculture**, [s. l.] v. 593, p. 741253, 2024.

RAN, C. *et al.* Thymol and carvacrol affect hybrid tilapia through the combination of direct stimulation and an intestinal microbiota-mediated effect: insights from a germ-free zebrafish. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 146, 2016.

REVERTER, M. *et al.* Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. **Nature communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1870, 2020.

RIBEIRO, V. S. *et al.* Tilapicultura no Brasil: uma análise regional a partir de indicadores de upgrading. **Informe GEPEC**, Universidade Federal do Oeste do Paraná, v. 28, n.1, p. 366-383, jan./jun. 2024.

RINGØ, E. *et al.* Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 227, n. 1-4, p. 395-415, 2003.

SÁ, M. V. C. **Limnocultura:** limnologia para aquicultura. ed. 2 São Paulo: Blucher, 346 p. 2023.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; FORTES-SILVA, R. **Biology and aquaculture of tilapia.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 2021.

SANYAL, K. B. *et al.* Phenotypic and molecular identification of bacterial species in Indian major carps and exotic carps from south 24 Parganas, West Bengal, India. **Int J Curr Microbiol Appl Sci** 7.1, [s. l.], p.534-547, 2018.

SCHAR, *et al.* Surveillance of antimicrobial consumption in animal production sectors of low-and middle-income countries: Optimizing use and addressing antimicrobial resistance. **PLoS medicine**, California, USA, v. 15, n. 3, p. e1002521, 2018.

SEMAR. Coleção SENAR 197. **Piscicultura:** reprodução, larvicultura e alevinagem de tilápias. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. – Brasília: SENAR, 2017

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. Universidade Estadual de Maringá, Animal Sciences**, v. 38, n. 3, p. 233-241, 2016.

SILVA, U. L. *et al.* Larviculture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in biofloc and clear water systems: masculinization with 17 α-methyltestosterone. **Boletim do Instituto de**

**Pesca**, São Paulo, v. 50, 2024.

SILVA, R. R. *et al.* Mortalidade em tilápias (*Oreochromis niloticus*) provocada por falhas de manejo e o desafio diagnóstico para os serviços veterinários oficiais. **Pubvet**, [s. l.], v. 15, p. 188, 2021.

SILVA, W. L. M. *et al.* Sustentabilidade na aquicultura: dimensões social, econômica e ambiental—uma revisão de literatura. **Educamazônia- Educação, Sociedade e Meio Ambiente**, Universidade Federal do Amazonas, v. 20, n. 1, Jan-Jun, p. 87-108, 2018.

SU, X.; SUTARLIE, L.; LOH, X. J. Sensors, biosensors, and analytical technologies for aquaculture water quality. **Research**, [s. l.], 2020.

TANCREDO, K. R. **Dinâmica de especificidade de parasitos Monogenea dactilogirídeos em seus hospedeiros e eficácia da formalina contra *Dactylogyrus minutus***. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 108 p., 2019.

TAWFEEK, W. S. *et al.* The phenotypic and genetic characteristics of *Pseudomonas anguilliseptica* strains associated with mortalities in farmed sea bream and sea bass. **Aquaculture International**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 3973-3992, 2024.

THAOTUMPITAK, V. *et al.* Insights into antimicrobial and multidrug resistance of *Escherichia coli* in hybrid red tilapia cultivation. **Aquaculture**, [s. l.], v. 588, p. 740927 2024.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. São Paulo, ed. 12. Artmed Editora, 2017.

UTETE, B. *et al.* Impact of aquaculture on water quality in lake kariba, Zimbabwe. **International Journal of Aquaculture**, [s. l.], v. 3, n. 4, 2013.

VELLEND, M. The theory of ecological communities . 1 ed. **Princeton University Press**, 2016.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Reducing antimicrobial use in food animals. **Science**, [s. l.], v. 357, n. 6358, p. 1350-1352, 2017.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo, Livraria Varela, 380 p., 2004.

YADA, T.; TORT, L. Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. **Fish physiology**, [s. l.], Academic Press, p. 365-403. 2016.

**ANEXO A – CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO  
DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO**



UNIVERSIDADE  
FEDERAL do CEARÁ

Uso exclusivo da CEUAP-UFC  
Protocolo N°: 0901202401  
Data de entrada: 09/01/2024  
Data de aprovação: 01/03/2024

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

CEUAP-UFC

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização da microbiota total de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nos primeiros estágios de vida", protocolada sob o CEUAP nº 0901202401, sob a responsabilidade de Francisca Gleire Rodrigues de Menezes e equipe; Célio Henrique Alexandrino Cavalcante - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal do Ceará (CEUAP-UFC) na reunião de 01/03/2024.

We certify that the proposal "Characterization of the total microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the first stages of life.", protocol number CEUAP 0901202401, under the responsibility of Francisca Gleire Rodrigues de Menezes and team; Célio Henrique Alexandrino Cavalcante - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Farm Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUAP-UFC) in the meeting of 01/03/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de mar/2024 a abr/2024 Área: LABOAR – CEAC – Laboratório multiuso

Origem: Fishtec Aquicultura Eireli ME

Espécie: *Oreochromis niloticus* sexo: ovos (não sexados) idade: ovos N: 100g de ovos

Linhagem: Tilápia nilótica Peso: 100 g de ovos

Fortaleza, 01 de março de 2024.

Prof. Dr. Pedro Henrique Watanabe  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção  
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Elzânia Sales Pereira  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção  
Universidade Federal do Ceará