

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO SISTEMA DE BIOFLOCO
FORNECIDO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL PARA TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE ÁGUA CLARA**

Renato Filho da Silva Juvenal

Orientadora: Prof^a. Dra. Claire Juliana Francisco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Janeiro - 2024

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO SISTEMA DE BIOFLOCO
FORNECIDO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL PARA TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE ÁGUA CLARA**

Renato Filho da Silva Juvenal

Orientadora: Prof^a. Dra. Claire Juliana Francisco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Janeiro - 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca, São Paulo

J98c. Juvenal, Renato Filho da Silva
Comunidade bacteriana presente no sistema de biofloco fornecido como suplemento nutricional para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de água clara / Renato Filho da Silva Juvenal – São Paulo, 2024.
v, 41f. ; fig 1. ; tab.5.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Claire Juliana Francisco

1. Probiótico. 2. Desempenho zootécnico. 3. Qualidade da água.

I. Francisco, Claire Juliana. II. Título.

CDD 574



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
INSTITUTO DE PESCA


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO SISTEMA DE BIOFLOCO FORNECIDO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL PARA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus*, EM SISTEMA DE AGUA CLARA

AUTOR(A): RENATO FILHO DA SILVA JUVENAL

ORIENTADOR(A): Claire Juliana Francisco

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

 Documento assinado eletronicamente
CLAIRE JULIANA FRANCISCO
Data: 12/02/2024 12:22:29 -0300
Web: https://sistemas.dia.se.gov.br

Prof(a). Dr(a) Claire Juliana Francisco

Prof(a). Dr(a) Adjaci Uchoa Fernandes

Prof(a). Dr(a) William Cristiane Teles Tonini

Data da Realização: 31 de Janeiro de 2024, às 09:00



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo presente da vida, e as pessoas que o senhor vem colocando em meu caminho, as que me inspiram a ser cada dia melhor e as pessoas que posso contribuir para tornar suas vidas melhores, são estas pessoas que me fizeram ser quem eu sou hoje.

A minha orientadora, Dr^a. Claire Juliana Francisco primeiramente pela oportunidade concedida de orientação no mestrado, ao apoio e disponibilidade, e por todas as valiosas contribuições na dissertação.

Processo nº 2020/05915-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos de mestrado, Processo - 440026/2023-7.

A comissão examinadora Dr. Adjaci Uchôa Fernandes (Universidade Anhembi Morumbi – UAM, São Paulo, Brasil) e Dr. William Cristiane Teles Tonini (Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Bahia, Brasil) pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

A todos os professores do Instituto de Pesca da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo pelo excelente trabalho em transmitir o conteúdo ministrado durante o mestrado.

Ao professor Dr. Wagner Cotroni Valenti pela sugestão do livro *How to Write and Publish a Scientific Paper*, mencionado durante as aulas da disciplina Metodologia Científica.

Aos amigos Ocimar Pedro e Fabiana Garcia Scaloppi por toda atenção em elucidar perguntas e fornecer informações fundamentais no decorrer desta jornada.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Mercado global de probióticos	1
1.2 Sistema de bioflocos	1
1.3 Qualidade da água em sistema de bioflocos	2
1.4 Prebiótico, probiótico e simbiótico na aquicultura	2
1.5 Uso de antibióticos na aquicultura	4
2. REFERÊNCIAS	6

CAPÍTULO 1

EFEITO DE DOIS PROBIÓTICOS E COMUNIDADE BACTERIANA DO BIOFLOCOS COMO SUPLEMENTO NO DESEMPENHO DE CRESCIMENTO DA TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) SOB SISTEMA DE ÁGUA CLARA.	9
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Sistema experimental	13
2.2 Produção do suplemento bioflocos	14
2.2.1 Sistema produção do bioflocos	14
2.2.2 Parâmetros de qualidade de água do bioflocos	14
2.2.3 Identificação dos isolados bacterianos do bioflocos	15
2.2.4 Parâmetro nutricional do bioflocos	16

2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão do bioflocos ..	16
2.3 Parâmetros de qualidade de água	17
2.4 Desempenho zootécnico.....	18
2.5 Análises estatísticas.....	18
3. RESULTADOS	19
3.1 Identificação dos isolados bacterianos do bioflocos	19
3.2 Parâmetro nutricional do bioflocos	20
3.3 Parâmetro de qualidade de água	20
3.4 Desempenho zootécnico	21
4. DISCUSSÃO	22
4.1 Identificação dos isolados bacterianos do bioflocos	22
4.2 Parâmetro nutricional do bioflocos	23
4.3 Qualidade de água	24
4.4 Desempenho zootécnico.....	24
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
AGRADECIMENTOS	25
REFERÊNCIAS.....	26
APÊNDICE	30

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água da produção juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema bioflocos.

Figura 1. Caracterização da estrutura bioflocos liofilizado por microscopia eletrônica de varredura e transmissão coletado da produção juvenis tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Estrutura do bioflocos (A), fungos e microalgas (B), *Enterobacter* spp. (C) e *Bacillus* spp (D).

Tabela 2. Isolados bacterianos identificados a partir do suplemento bioflocos e composição dos probióticos comerciais utilizados na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Tabela 3. Análise de umidade, cinzas e proteínas totais do bioflocos obtido da produção juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema bioflocos.

Tabela 4. Parâmetros de qualidade de água do sistema de Produção de pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com bioflocos e probiótico.

Tabela 5. Parâmetros de desempenho zootécnico das pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com bioflocos e probióticos comerciais.

COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO SISTEMA DE BIOFLOCO FORNECIDO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL PARA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE ÁGUA CLARA

RESUMO GERAL

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade bacteriana do biofoco e avaliar o efeito como suplemento alimentar comparando com dois probióticos comerciais (Proquatic Pond Plus® e N-Acqua®) sobre o desempenho zootécnico de pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de água clara. Para produção do biofocos foram preparados dois tanques (1 m³) instalados em área fechada. Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados. Os isolados bacterianos foram identificados por MALDI-TOF MS. Os parâmetros nutricionais do biofoco verificados foram umidade, cinzas e proteína total. A estrutura do biofoco foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições, sendo: T1 - Ração + Biofoco, T2 - Ração + Probiótico Proquatic Pond Plus® e T3 = Ração + Probiótico N-Acqua®. Ao final do experimento foram avaliados os Parâmetros de desempenho zootécnico das tilápias. No presente estudo não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no desempenho zootécnico das tilápias, entre tanto, o suplemento biofoco melhorou substancialmente o ganho de peso das tilápias em relação aos tratamentos com o uso dos probióticos comerciais. A cepa bacteriana *Agromyces lapidis* presente na composição do biofoco foi identificada no presente estudo pela primeira vez no Brasil, e avaliada como integrante na composição de suplemento na alimentação pela primeira vez no mundo. No suplemento biofoco foi identificado a presença das cepas bacterianas *Agromyces lapidis*, *Arthrobacter sulfonivorans* e *Enterobacter asburiae* que aumentaram substancialmente a sobrevivência das tilápias, mesmo sendo fornecido junto com bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas caricapapayae* na alimentação.

Palavras chaves: Probiótico, Desempenho zootécnico, Qualidade de água.

**BACTERIAL COMMUNITY PRESENT IN THE BIOFLOC SYSTEM
PROVIDED AS A NUTRITIONAL SUPPLEMENT FOR NILE TILAPIA
(*Oreochromis niloticus*) IN A CLEAR WATER SYSTEM**

ABSTRACT

The present study aimed to characterize the bacterial community of the biofloc and evaluate the effect as a food supplement compared to two commercial probiotics (Proquatic Pond Plus® and N-Acqua®) on the zootechnical performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) postlarvae in the clear water system. For the production of bioflocs, two tanks (1 m³) were prepared and installed in a closed area. Water quality parameters were monitored. Bacterial isolates were identified by MALDI-TOF MS. The biofloc nutritional parameters verified were moisture, ash, and total protein. The biofloc structure was evaluated by scanning and transmission electron microscopy. Tilapia larvae were randomly distributed in plastic tanks with a density of 1 tilapia larvae/liter of water. The experiment was conducted in a completely randomized design with three treatments and three replications, being: T1 - Feed + Biofloc, T2 - Feed + Probiotic Proquatic Pond Plus® and T3 = Feed + Probiotic N-Acqua®. At the end of the experiment, the zootechnical performance parameters of the tilapia were evaluated. In the present study, there was no significant difference ($P > 0.05$) in the zootechnical performance of tilapia, however, the biofloc supplement was substantially superior to the weight gain of tilapia of treatments using commercial probiotics. The bacterial strain *Agromyces lapidis* present in the composition of the biofloc was identified in the present study for the first time in Brazil, and evaluated as an integral part of the composition of dietary supplements for the first time in the world. In the biofloc supplement, the presence of the bacterial strains *Agromyces lapidis*, *Arthrobacter sulfonivorans* and *Enterobacter asburiae* substantially increased tilapia survival, even though it was supplied together with pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas caricapapayae* in food.

Keywords: Probiotic, Zootechnical performance, Water quality

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Mercado global de probióticos

O mercado global de ingredientes probióticos, suplementos e alimentos, alcançou \$ 15,900 milhões em 2008, cinco anos depois \$ 20.000 milhões (Soccol et al., 2010). Segundo a Variant Marketing Research (2017), prevê que o mercado global de probióticos deverá atingir \$ 136,5 bilhões em 2024, ante \$ 71,9 bilhões em 2016, CAGR de 8,4% de 2016 a 2024. Prevê-se o aumento da demanda por produtos alimentícios com alto teor de fibra para impulsionar o mercado de 2013 à 2024 com investimentos consideráveis em alimentos e bebidas pela indústria para o desenvolvimento de novos produtos provavelmente aumentará o crescimento do mercado em cerca de 10% CAGR durante o período previsto (Research Grand View, 2018).

1.2 Sistema de bioflocos

O sistema de bioflocos surgiu recentemente como uma solução para a manutenção da qualidade da água, sendo caracterizado pela reduzida renovação de água e adição de compostos orgânicos como fonte de carbono. No sistema de aquicultura os desperdícios de nutrientes são provenientes da ração não consumida e do processo metabólico da digestão do alimento, no sistema de bioflocos estes nutrientes que seriam desperdiçados podem ser convertidos em biomassa microbiana e reutilizado como fonte de alimento (Bossier & Ekasari, 2017). O sistema de bioflocos tem como princípio básico a reciclagem e transformação do excesso de nutrientes e resíduos presentes na água como o nitrogênio inorgânico (NH_3 e NO_2^-) gerado à partir das excretas e alimentos não consumidos em biomassa microbiana (Kumar et al., 2021). Quando há baixas concentrações de carboidratos no sistema é necessário a incorporação de fontes adicionais de carbono para manter altas densidades de bactérias nitrificantes no sistema (Das & Mandal, 2018). A presença destes compostos no sistema permite que as bactérias heterotróficas tornem-se mais ativas do que outras bactérias,

removendo o nitrogênio e carbono da água e produzindo biomassa microbiana (Kumar et al., 2021). O aumento da entrada da razão Carbono/Nitrogênio diminuiu a diversidade α da microbiota intestinal e altera a estrutura da comunidade microbiana através do aumento da abundância relativa de Actinobacteria, Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae e inibindo o crescimento de Cyanobacteria, certas Rhodobacteraceae, Mycoplasmataceae e Vibrio (Guo et al., 2020). A microfauna associada ao sistema de bioflocos compõem diferentes grupos planctônicos representado por microalgas, protozoários e rotíferos (Becerril-Cortés et al., 2018).

1.3 Qualidade da água em sistema de bioflocos

A qualidade da água é mantida pela atuação dos microrganismos heterotróficos na transformação dos compostos nitrogenados (amônia tóxica (NH_3) \rightarrow nitrito (NO_2^-) \rightarrow nitrato (NO_3^-)) gerando proteína microbiana (Das & Mandal, 2018). Os microrganismos fotossintéticos presentes no sistema de bioflocos como as microalgas e cianobactérias atuam na transformação do carbono inorgânico (CO_2) em carbono orgânico pela via fotoautotrófica e depois usam ácidos orgânicos e amônia para formar aminoácidos (Fimbres-Acedo et al., 2020). O crescimento de animais aquáticos depende muito do ambiente hídrico e, portanto, os microrganismos aquáticos provavelmente afetam a colonização microbiana no intestino da tilápia (Giatsis et al., 2015). O bioflocos inclui numerosos micróbios heterotróficos que são ingeridos por animais aquáticos, e certas bactérias também podem colonizar o intestino (Xu et al., 2015).

1.4 Prebiótico, probiótico e simbiótico na aquicultura

Prebiótico são “ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro” (WGO, 2017). Os probióticos são ingredientes alimentares não digeríveis para o hospedeiro, tendo como função estimular o crescimento e atividade de bactérias

no sistema digestivo (Vetvicka, 2016). O prebiótico β -glucano é normalmente utilizado na aquicultura, sendo compreendido como um grupo de polissacarídeos encontrado naturalmente na parede celular de bactérias, fungos e leveduras (Mohammadian et al., 2019). A inclusão do β -glucano na alimentação de peixes traz melhorias ao sistema imunológico devido a fermentação no intestino grosso ou cólon por bactérias produtoras de ácido láctico, aumentando a colonização e melhorando suas populações relativas (Mohammadian et al., 2019).

Probióticos são “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico que significa “contra-vida”. O probiótico proporciona um equilíbrio no trato gastrointestinal das populações microbianas através do fornecimento de microrganismos benéficos (Vetvicka, 2016). Proporcionando a multiplicação de bactérias benéficas no organismo e supressão de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos de defesa do hospedeiro (Zago et al., 2021). A suplementação adicional de cepas probióticas é uma tecnologia eficiente para a aquicultura, sendo aferidos genes relacionados a expressão de enzimas imunes e digestivas, além do aumento em relação ao crescimento, imunidade e sobrevivência (Asaduzzaman et al., 2018). Os probióticos podem produzir moléculas funcionais como bacteriocinas, enzimas, peróxido de hidrogênio e alteração do pH intestinal devido à geração de ácidos orgânicos (Ringø et al., 2020).

Simbióticos são “produtos que contêm tanto probióticos como prebiótico, que conferem benefícios à saúde ao hospedeiro” (WGO, 2017). O uso de simbióticos (prebiótico e probiótico) para a manipulação da microbiota intestinal de animais aquáticos vem se tornando uma prática comum para o favorecimento de certas espécies bacterianas (Mohammadian et al., 2019). Podendo ser uma opção bastante estimulante na melhoria da eficiência da dieta e do bem-estar na

aquicultura (Amenyogbe et al., 2020). A suplementação dietética com enzimas exógenas e probióticos aumenta a abundância de bactérias de ácido láctico no trato gastrointestinal da tilápia do Nilo, aumentando a disponibilidade de nutrientes e contribuindo para um microbioma intestinal mais estável (Maas et al., 2021). A administração da ração suplementada com simbióticos também provou ser um dos caminhos a seguir ao longo prazo como estratégia no controle de patógenos na aquicultura (Amenyogbe et al., 2020).

1.5 Uso de antibióticos na aquicultura

Com a intensificação da atividade aquícola aumentou também o aparecimento de doenças causadas por bactérias e outros patógenos presentes no ambiente de cultivo, podendo causar graves prejuízos econômicos (Belem-Costa et al., 2021). O uso de bactérias benéficas (probióticos) tem sido recomendado como alternativa ao uso de antibióticos (Daniel & Nageswari, 2017; Ringø et al., 2020; Vieco-Saiz et al., 2019). A aplicação de antibióticos para o tratamento de doenças bacterianas foi incentivada no passado (Daniel & Nageswari, 2017). Porém, observações sobre os efeitos da tecnologia de bioflocos na redução de surtos de doenças virais (Avnimelech, 2003). Levou a aquicultura buscar alternativas ao uso de antibióticos, pois um antibiótico pode eliminar os microorganismos desfavoráveis, mas também os benéficos ao intestino dos animais. Além disso, uso contínuo de antibióticos leva os microorganismos a se tornarem resistentes e diminuem o efeito ao tratamento. Na produção de alimentos de origem animal, o uso indiscriminado de antimicrobianos ou o desrespeito ao intervalo após o tratamento, pode levar à presença de resíduos de antibióticos nos alimentos. Esses resíduos podem promover o crescimento de cepas bacterianas patogênicas resistentes a medicamentos e também causar reações alérgicas em alguns indivíduos hipersensíveis (Wang, 2009). Assim, a rápida disseminação de bactérias com resistência à antibióticos na aquicultura é uma séria ameaça a produção de organismos aquáticos e à saúde humana.

A maioria dos trabalhos publicados sobre a produção de tilápia através da tecnologia bioflocos estão intimamente ligados ao desenvolvimento econômico da atividade, aprofundando as pesquisas nas técnicas de cultivo, custos de produção e desempenho zootécnico da tilápia (Tavares et al., 2021). Por tanto, flocos microbianos gerados no sistema de bioflocos são considerados fonte de proteínas, minerais e uma comunidade de microorganismos. Dessa maneira, a identificação da comunidade bacteriana do bioflocos faz-se necessário para uso como suplemento alimentar. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade bacteriana do bioflocos e avaliar o efeito como suplemento alimentar comparando com dois probióticos comerciais (Proquatic Pond Plus® e N-Acqua®) sobre o desempenho zootécnico de pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de água clara.

O artigo a ser apresentado a seguir está intitulado como “EFEITO DE DOIS PROBIÓTICOS E COMUNIDADE BACTERIANA DO BIOFLOCOS COMO SUPLEMENTO NO DESEMPENHO DE CRESCIMENTO DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB SISTEMA DE ÁGUA CLARA.” O presente artigo será submetido para publicação consecutivamente para as seguintes revistas: AQUACULTURE REPORTS (ISSN 2352-5134) Área de avaliação Zootecnia/recursos pesqueiros; AQUACULTURE AND FISHERIES (ISSN 2468-550X) Área de avaliação Zootecnia/recursos pesqueiros; BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY (ONLINE) (ISSN 1678-4405) Área de Avaliação Ciências agrárias I e demais revistas as quais o artigo se enquadrar ao escopo até a publicação.

2. REFERÊNCIAS

- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J. S., Huang, B., & Li, H. (2020). The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions. : a review. *Aquaculture International*, 28(3), 1017–1041. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>
- Asaduzzaman, M., Shumpei, I., Sumi, A., Abdul Kader, M., Ghosh, S. K., Khan, M. N. A., & Abol-MunafiAndani, A. B. (2018). Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports*, 9(January), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.12.003>
- Avnimelech, Y. (2003). World Aquaculture Control of microbial activity in aquaculture systems: active suspension ponds. *Reprinted from World Aquaculture*, 34(4), 19–21.
- Becerril-Cortés, D., Monroy-Dosta, M. D. C., Emerenciano, M. G. C., Castro-Mejía, G., Bermúdez, B. S. S., & Correa, G. V. (2018). Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 541–547.
- Belem-Costa, A.; Gomes, A.L.S.; Carvalho, E.; Nocif-Marçal, L.; Silva, T.B.A.; Soares, J.S. (2021). Protocolos para diagnostico de doenças em peixes – 1.ed. Curitiba. 103p.
- Bossier, P., & Ekasari, J. (2017). Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1012–1016. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12836>
- Daniel, N., & Nageswari, P. (2017). Exogenous Probiotics on Biofloc based Aquaculture: A Review. *Current Agriculture Research Journal*, 5(1), 88–107. <https://doi.org/10.12944/carj.5.1.11>
- Das, S., & Mandal, A. (2018). Biofloc Technology (BFT): An Effective Tool for Remediation of Environmental Issues and Cost Effective Novel Technology in Aquaculture. *International Journal of Oceanography & Aquaculture*, 2(2). <https://doi.org/10.23880/ijoac-16000135>
- FAO/WHO. (2001). Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 1-4 October 2001.

- Fimbres-Acedo, Y. E., Magallón-Servín, P., Garza-Torres, R., Emerenciano, M. G. C., Servín-Villegas, R., Endo, M., Fitzsimmons, K. M., & Magallón-Barajas, F. J. (2020). *Oreochromis niloticus* aquaculture with biofloc technology, photoautotrophic conditions and *Chlorella* microalgae. *Aquaculture Research*, 51(8), 3323–3346. <https://doi.org/10.1111/are.14668>
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., & Verdegem, M. (2015). The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Scientific Reports*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep18206>
- Guo, H., Huang, L., Hu, S., Chen, C., Huang, X., Liu, W., Wang, S., Zhu, Y., Zhao, Y., & Zhang, D. (2020). Effects of Carbon/Nitrogen Ratio on Growth, Intestinal Microbiota and Metabolome of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00652>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Swain, H. S., & Das, B. K. (2021). Biofloc Microbiome With Bioremediation and Health Benefits. *Frontiers in Microbiology*, 12(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741164>
- Maas, R. M., Deng, Y., Li, Y. D., Petit, J., Verdegem, M. C. J., Schrama, J. W., & Kokou, F. (2021). Exogenous enzymes and probiotics alter digestion kinetics , volatile fatty acid content and microbial interactions in the gut of Nile tilapia. *Scientific Reports*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87408-3>
- Mohammadian, T., Mosavi, M., Alishahi, M., & Khosravi, M. (2019). Effects of dietary β -1,3-glucan and host gut-derived probiotic bacteria on hemato-immunological indices and gut microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 2(21). <https://doi.org/10.22067/veterinary.v11i2.80505>
- Research Grand View (2018). Prebiotics Market To Be Driven By Rising Demand For High Fiber [Http://www.kfmbfm.com/story/38073222/prebiotics-market-to-be-driven-by-rising-demand-for-high-fiber-food-products-till-2024-grand-view-research-inc](http://www.kfmbfm.com/story/38073222/prebiotics-market-to-be-driven-by-rising-demand-for-high-fiber-food-products-till-2024-grand-view-research-inc), 21:36hs(02/05/2018).
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1), 116–136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.

- Tavares, S. G., Queiroz, S. S. de, Bertolini, G. R. F., Grandi, A. M. de, Rodrigues, M. L., & Signor, A. (2021). A produção científica mundial sobre a tecnologia bioflocos na tilapicultura como propulsora do desenvolvimento sustentável. *Research, Society and Development*, 10(5), 1-13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.15200>
- Variant Marketing Research (2017). Probiotics Market Overview. <https://www.variantmarketresearch.com/report-categories/food-beverages/probiotics-market>, 21:41(30/04/2018), 1-7.
- Vetvicka, V. J. (2016). Glucan as Prebiotic or Probiotic? *International Clinical Pathology Journal*, 2(2), 8-10. <https://doi.org/10.15406/icpjl.2016.02.00035>
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Wang, J. (2009). Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *Wiley InterScience*, 28, 50-92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mas.20189>
- WGO. (2017). Probióticos e prebióticos. *Diretrizes Mundiais Da Organização Mundial de Gastroenterologia*, 1-35.
- Xu, W. J., Morris, T. C., & Samocha, T. M. (2015). Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>
- Zago, D., Santos, I. C. dos, Alves, G., Gonçalves, D. D., & Martins, L. de A. (2021). Viabilidade do *Lactobacillus casei* ssp. *casei* em queijo tipo Minas frescal e a competição com *Staphylococcus aureus*. *Revista Thêma et Scientia*, 11(1), 107-118.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE DOIS PROBIÓTICOS E COMUNIDADE BACTERIANA DO BIOFLOCOS COMO SUPLEMENTO NO DESEMPENHO DE CRESCIMENTO DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB SISTEMA DE ÁGUA CLARA

EFEITO DE DOIS PROBIÓTICOS E COMUNIDADE BACTERIANA DO BIOFLOCOS COMO SUPLEMENTO NO DESEMPENHO DE CRESCIMENTO DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) SOB SISTEMA DE ÁGUA CLARA

Renato Filho da Silva Juvenal ^{a,*}

^a Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca, Instituto de Pesca - São Paulo, Brasil

* renatojuvenaleng.pesca@hotmail.com

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade bacteriana do biofloco e avaliar o efeito como suplemento nutricional comparando com dois probióticos comerciais (Proquatic Pond Plus[®] e N-Acqua[®]) sobre o desempenho zootécnico de pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de água clara. Para produção do bioflocos foram preparados dois tanques (1 m³) instalados em área fechada. Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados. Os isolados bacterianos semeados em placas de petri com ágar nutriente foram identificados por MALDI-TOF MS. Os parâmetros nutricionais do biofloco verificados foram umidade, cinzas e proteína total. A estrutura do biofloco foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições, sendo: T1 - Ração + Biofloco, T2 - Ração + Probiótico Proquatic Pond Plus[®] e T3 = Ração + Probiótico N-Acqua[®]. O presente estudo não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos, entre tanto, o suplemento biofloco melhorou substancialmente o ganho de peso em relação aos tratamentos com o uso dos probióticos. A cepa bacteriana *Agromyces lapidis* presente na composição do biofloco foi identificada no presente estudo pela primeira vez no Brasil, e avaliada como integrante na composição de suplemento alimentar pela primeira vez no mundo. No suplemento biofloco foi identificado a presença das cepas bacterianas *Agromyces lapidis*, *Arthrobacter sulfonivorans* e *Enterobacter asburiae* que aumentaram substancialmente a sobrevivência das tilápias, mesmo sendo fornecido junto com bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas caricapapayae* na alimentação das tilápias.

Palavras chave: Probiótico, Desempenho zootécnico, Qualidade de água.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de biofoco surgiu recentemente como uma solução para a manutenção da qualidade da água, sendo caracterizado pela não renovação de água e adição de compostos orgânicos como fonte de carbono. O sistema de biofoco tem como princípio básico a reciclagem e transformação do excesso de nutrientes e resíduos presentes na água como o nitrogênio inorgânico (NH_3 e NO_2^-) gerado à partir das excretas e alimentos não consumidos em biomassa microbiana (Kumar et al., 2021). O aumento da razão Carbono/Nitrogênio altera a estrutura da comunidade microbiana através do aumento da abundância relativa de Actinobacteria, Rhodobacteraceae, Alteromonadaceae e inibindo o crescimento de Cyanobacteria, certas Rhodobacteraceae, Mycoplasmataceae e Vibrio (Guo et al., 2020). A microfauna associada ao sistema de biofoco compõem diferentes grupos planctônicos representado por microalgas, protozoários e rotíferos (Becerril-Cortés et al., 2018). O perfil dos microrganismos do biofoco varia ao longo do tempo, a comunidade de microalgas diminui, possivelmente devido à redução na penetração da luz como resultado do aumento da turbidez e aumento da população dos dinoflagelados ao longo do tempo (Durigon, et al., 2019).

A qualidade da água é mantida pela atuação dos microrganismos heterotróficos na transformação dos compostos nitrogenados (amônia tóxica (NH_3) → nitrito (NO_2^-) → nitrato (NO_3^-)) gerando proteína microbiana (Das & Mandal, 2018). Os microrganismos fotossintéticos presentes no sistema de biofoco como as microalgas e cianobactérias atuam na transformação do carbono inorgânico (CO_2) em carbono orgânico pela via fotoautotrófica e depois usam ácidos orgânicos e amônia para formar aminoácidos (Fimbres-Acedo et al., 2020). O biofoco inclui numerosos microrganismos heterotróficos que são ingeridos por animais aquáticos, e certas bactérias também podem colonizar o intestino (Xu et al., 2015).

Probióticos são “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico que significa “contra-vida”. O probiótico proporciona a multiplicação de bactérias benéficas no organismo e supressão de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos de defesa do hospedeiro (Zago et al., 2021). A suplementação adicional de cepas probióticas é uma tecnologia eficiente para a aquicultura, expressando enzimas imunes e digestivas, além do aumento em relação ao crescimento, imunidade e sobrevivência (Asaduzzaman et al., 2018). Os probióticos podem produzir moléculas funcionais como bacteriocinas, enzimas, peróxido de hidrogênio e alteração do pH intestinal devido à geração de ácidos orgânicos (Ringø et al., 2020).

A intensificação da atividade aquícola aumentou também o aparecimento de doenças causadas por bactérias e outros patógenos presentes no ambiente de cultivo, podendo causar graves prejuízos econômicos (Belem-Costa et al., 2021). O uso de bactérias benéficas (probióticos) tem sido recomendado como alternativa ao uso de antibióticos (Daniel & Nageswari, 2017; Ringø et al., 2020; Vieco-Saiz et al., 2019). A aplicação de antibióticos para o tratamento de doenças bacterianas foi incentivada no passado (Daniel & Nageswari, 2017). Porém, observações sobre os efeitos da tecnologia de bioflocos na redução de surtos de doenças virais (Avnimelech, 2003) levou a aquicultura buscar alternativas ao uso de antibióticos, pois um antibiótico pode eliminar os microorganismos desfavoráveis, mas também os benéficos ao intestino dos animais. Na produção de alimentos de origem animal, o uso indiscriminado de antimicrobianos ou o desrespeito ao intervalo após o tratamento, pode levar à presença de resíduos de antibióticos nos alimentos. Assim, a rápida disseminação de bactérias com resistência à antibióticos na aquicultura é uma séria ameaça a produção de organismos aquáticos e à saúde humana. Por tanto, flocos microbianos gerados no sistema de bioflocos são considerados fonte de proteínas, minerais e uma

comunidade de microorganismos. Dessa maneira, a identificação da comunidade bacteriana do biofoco faz-se necessário para uso como suplemento alimentar. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade bacteriana do biofoco e avaliar o efeito como suplemento alimentar comparando com dois probióticos comerciais (Proquatic Pond Plus® e N-Acqua®) sobre o desempenho zootécnico de pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de água clara.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sistema experimental

O experimento foi conduzido na área experimental do Centro Universitário Sudoeste Paulista-Unifsp, localizado na cidade de Avaré, SP. Foram adquiridos de uma piscicultura larvas de tilápia do Nilo (8 dias após eclosão) com peso corporal de 3,68 mg e comprimento total de 3,708 mm, e aclimatadas para condições de laboratório. As tilápias foram distribuídas aleatoriamente em tanques abastecidos com 60 Litros de água. Densidade de estocagem de 1 larva de tilápia/litro de água. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e três repetições, sendo: T1 - Ração + Biofoco, T2 - Ração + Probiótico Proquatic Pond Plus® e T3 = Ração + Probiótico N-Acqua®. Durante período experimental de 35 dias, as pós larvas de tilápia foram alimentadas com dieta ad libitum duas vezes ao dia (8:00 e 16:00) com ração comercial para peixes 55% de proteína bruta (Guabi - Pirá Alevino 55). Foi coletado 2 litros do biofoco diretamente dos tanques e filtrado para ser fornecido as tilápias, o biofoco úmido fornecido obteve concentração média de $20,54 \pm 2,99$ g. Os dois probióticos comerciais foram fornecidos seguindo recomendação do fabricante. O Probiótico Proquatic Pond Plus® e Probiótico N-Acqua® foram fornecidos 0,9 mg/dia em cada tratamento junto com o fornecimento da ração comercial. Cada unidade experimental teve 20% da água renovada diariamente.

2.2 Produção do suplemento biofloco

2.2.1 Sistema produção do biofloco

Para produção do bioflocos foram preparados dois tanques (1 m³) instalados em área fechada. Controle da exposição a luz solar restrito a nove horas diárias. Os tanques foram abastecidos com água, nenhuma troca de água foi realizada, somente reposição das perdas por evaporação. Cada tanque recebeu aeração contínua. A formação do biofloco foi realizada previamente com a fertilização da água clara. Foram adicionados aos tanques os compostos (nitrito de sódio, superfosfato simples, melão de cana líquido e Açúcar). A relação C/N foi ajustada para 15:1 por aplicação de melão de cana líquido como fonte de carbono (Avnimelech, 2009). Após trinta dias da fertilização os tanques foram povoados com mil alevinos de tilápia/m³ de água no tanque.

2.2.2 Parâmetros de qualidade de água do biofloco

Os parâmetros de qualidade de água monitorados foram temperatura (T°C), oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito, alcalinidade, fosfato (PO₄), Clorofila-a (Chl-a), clorofila-b (Chl-b), sólidos em suspensão total (TSS), sólidos em suspensão voláteis (VSS) e Sólidos Fixos (SF) foram aferidos três vezes por semana. Todas as análises da qualidade da água seguiram procedimentos da (APHA, 1998). Os parâmetros de qualidade da água do sistema de biofloco estão disponível na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de qualidade de água da produção juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema biofoco.

Parâmetros	Média ± (DP)
Temperatura (T °C)	26,24 ± 1,77
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	7,14 ± 2,77
pH	7,44 ± 0,13
Sólidos em Suspensão Total (g/L)	10,27 ± 2,99
Sólidos em Suspensão Voláteis (g/L)	7,70 ± 3,30
Sólidos Fixos (g/L)	2,57 ± 0,90
Alcalinidade (mg.L ⁻¹)	142,90 ± 29,34
Fosfato (PO ₄)	1,5 ± 0,51
Clorofila-a (mg.L ⁻¹)	0,21 ± 0,03
Clorofila-b (mg.L ⁻¹)	0,26 ± 0,02
Clorofila total (mg.L ⁻¹)	0,55 ± 0,03
Amônia (mg.L ⁻¹)	1,77 ± 2,55
Nitrito (mg.L ⁻¹)	1,74 ± 1,22

Os dados são valores médios (± desvio padrão).

2.2.3 Identificação dos isolados bacterianos do biofoco

Para verificar a comunidade bacteriana do biofoco uma amostra foi semeada em placas de petri com o meio de cultura ágar nutriente, os isolados bacterianos foram identificados por MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry) em equipamento Microflex-Bruker, Daltonics/BioTyper™. Realizado no laboratório da Universidade Federal de Lavras em Minas Gerais. A cepa *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para a calibração externa (Lima-Neto et al., 2014).

2.2.4 Parâmetro nutricional do biofloco

Para verificar o parâmetro nutricional do biofloco foi coletado amostras (20 litros) de biofloco no período de 15 e 30 dias do início da produção alevinos de tilápia. A umidade, cinzas e proteínas totais foram avaliadas seguindo o protocolo recomendado pela AOAC Official Method 950.46 (1997). Para o teor de umidade, amostras foram secas em estufa a 105 °C até atingirem peso constante e, a seguir, utilizadas para análise de cinzas e proteínas. Para o teor de cinzas, uma quantidade de 8 mL do biofloco foi inicialmente seca em estufa a 105 °C e posteriormente queimada em forno Mufla a 550 °C por 4 h. As cinzas resultantes foram pesadas e calculadas descontando o peso das cápsulas utilizadas. Para análise de proteínas totais foram utilizadas amostras de biofloco liofilizado. A distribuição do peso molecular dos hidrolisados de proteínas foi determinada utilizando dodecil de sódio eletroforese em gel de poli-acrilamida de sulfato (SDS). A eletroforese foi realizada utilizando um dispositivo de eletroforese vertical MiniProtean III. (Bio-Rad Laboratories Chemical, Hercules, CA, EUA). Após análise, a concentração de proteínas foi ajustada para peso fresco com base na umidade calculada das amostras.

2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão do bioflocos

Para verificar a estrutura foram coletado amostras (20 litros) de biofloco. As amostras foram liofilizadas (Terroni - model LS 3000, São Carlos, Brasil) conservada em temperatura 25°C e armazenado para posterior análise. As amostras foram enviadas ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP para processamento por microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Figura 1).

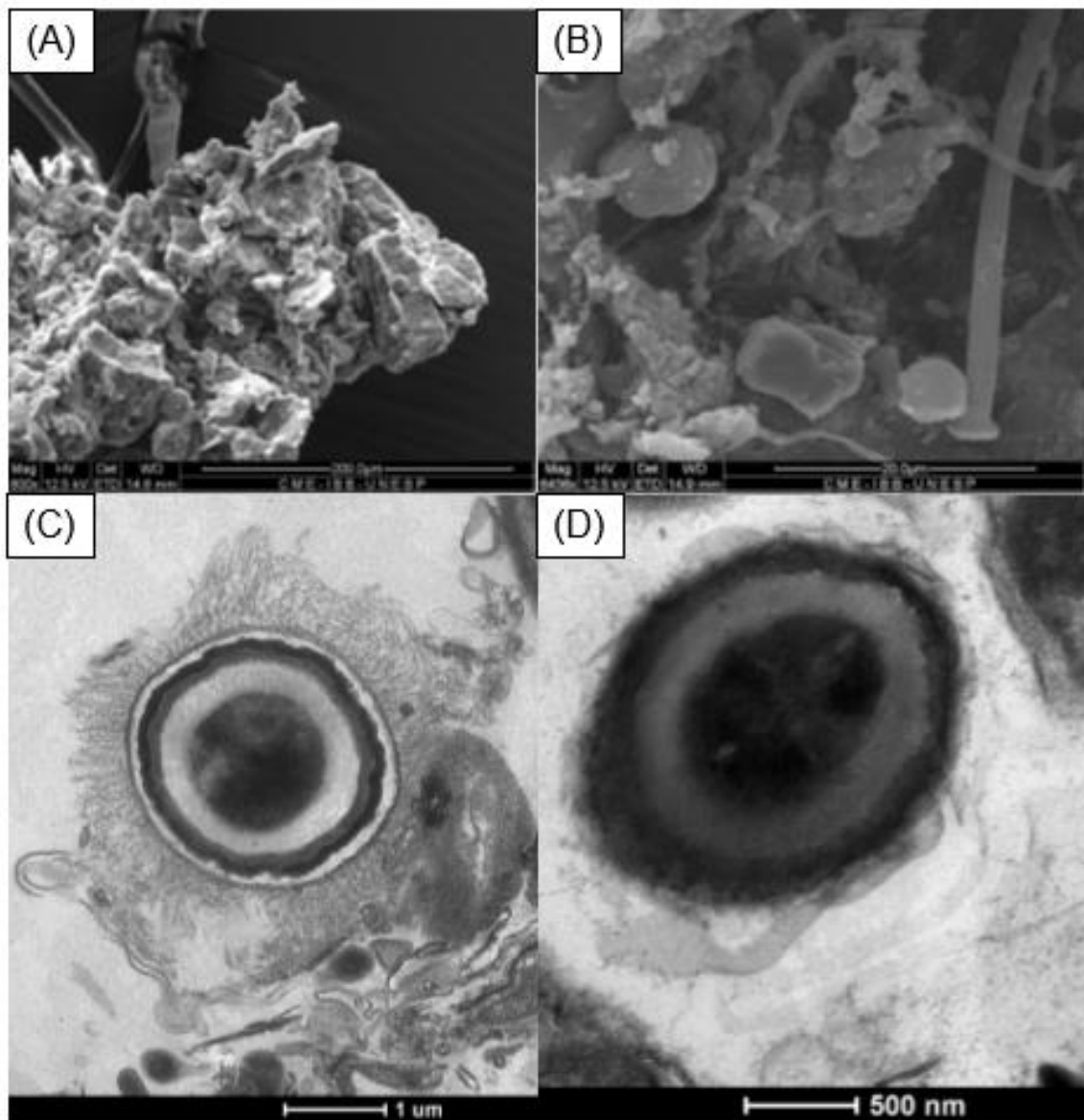


Figura 1: Caracterização da estrutura biofilme liofilizado por microscopia eletrônica de varredura e transmissão coletado da produção juvenis tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Estrutura do biofilme (A), fungos e microalgas (B), *Enterobacter* spp. (C), *Bacillus* spp. (D).

2.3 Parâmetros de qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água monitorados foram temperatura da água (T°C), oxigênio dissolvido (OD) e pH aferidos a cada dois dias com uso de kit comercial. Todas as análises da qualidade da água seguiram procedimentos da (APHA, 1998).

2.4 Desempenho zootécnico

As características avaliadas ao final do experimento foram comprimento total (CT) (mm), utilizando paquímetro digital e peso total (PT) (mg) utilizando balança micro analítica (precisão de 0,001 mg), os índices zootécnicos foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

Ganho de peso (mg) = peso final - peso inicial

Ganho de biomassa (mg) = biomassa final - biomassa inicial

Taxa de crescimento absoluta (TCA) ($\text{mg}/\text{dia}^{-1}$) = (peso final - peso inicial) / número de dias de cultivo.

Taxa de crescimento específico (TCE) (% do peso. dia^{-1}) = [(logaritmo natural do peso final - logaritmo natural do peso inicial) \times 100] / número de dias de cultivo.

Taxa de sobrevivência (%) = (número de peixes no final experimento / número de peixes inicial) \times 100.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS para Windows (IBM SPSS Statistics, versão 29.0). Uma análise de variância unidirecional (ANOVA) foi utilizada para acessar o desempenho. Em caso de diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação dos isolados bacterianos do biofloco

No biofloco foram identificadas oito cepas bacterianas, o probiótico Proquatic Pond Plus® possui cinco cepas e o probiótico N-Acqua® possui nove cepas bacteriana em sua composição (Tabela 2). No suplemento biofloco foi identificado seis cepas bacteriana distintas da composição dos probióticos comerciais utilizados. O suplemento biofloco possui a bactéria *Bacillus subtilis* em comum com ambos os probióticos e *Bacillus megaterium* em comum com o probiótico Pond Plus®.

Tabela 2: Isolados bacterianos identificados a partir do suplemento biofloco e composição dos probióticos comerciais utilizados na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Suplemento Biofloco	Proquatic Pond Plus®	N-Acqua®
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Agromyces lapidis</i>		<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>		<i>Paracoccus denitrificans</i>
<i>Pseudomonas caricapapayae</i>		<i>Nitrosomonas</i>
		<i>Nitrobacter</i>
5,1 x 10⁵ UFC/ml	1,0 x 10⁹ UFC/g	7,4 x 10⁹ UFC/g

3.2 Parâmetro nutricional do biofloco

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na umidade, cinzas e proteínas totais observados entre os diferentes tratamentos. Os parâmetros nutricionais do biofloco que foram monitorados são apresentados na (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de umidade, cinzas e proteínas totais do biofloco obtido da produção juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema biofloco.

	Dia 15	Dia 30
Umidade (%)	98,85 ± 0,1 ^a	98,66 ± 0,2 ^a
Cinzas (g/dL)	0,37 ± 0,17 ^a	0,33 ± 0,12 ^a
Proteínas Totais (g/dL)	5,28 ± 2,99 ^a	6,60 ± 3,78 ^a

Os dados são valores médios (± desvio padrão).

3.3 Parâmetro de qualidade de água

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na temperatura, Oxigênio dissolvido e no pH observados entre os diferentes tratamentos. Os parâmetros físicos e químicos de qualidade da água monitorados são apresentados na (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros de qualidade de água do sistema de Produção de pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com biofloco e probiótico.

Parâmetros	Biofloco	Pond Plus®	N-Acqua®
Temperatura (T °C)	20,97 ± 2,12 ^a	21,33 ± 2,07 ^a	21,10 ± 2,09 ^a
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,96 ± 0,16 ^a	5,88 ± 0,48 ^a	6,00 ± 0,00 ^a
pH	7,5 ± 0,0 ^a	7,5 ± 0,0 ^a	7,5 ± 0,0 ^a

Os dados são valores médios (± desvio padrão). Letras diferentes seguidas mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

3.4 Desempenho zootécnico

As médias de peso final das pós larvas de tilápia do Nilo variaram de 19,1 a 15,4 mg, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos (Tabela 5). Entre tanto, as tilápias alimentadas com o suplemento bioflocos tiveram aumento no ganho de peso de 23,02% e 32,48% com relação aos probióticos Pond Plus® e N-Acqua® respectivamente. Apesar do tratamento com probiótico N-Acqua® ter apresentado menor variância, as tilápias do tratamento com suplemento bioflocos apresentaram semelhança com o probiótico Pond Plus® na variância do peso final.

Tabela 5: Parâmetros de desempenho zootécnico das pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com bioflocos e probióticos comerciais.

Índices	Bioflocos	Pond Plus®	N-Acqua®
Peso Final (mg)	19,1 ± 14,4 ^a	16,2 ± 14,8 ^a	15,3 ± 7,6 ^a
Comprimento Final (mm)	1,26 ± 0,14 ^a	1,33 ± 0,11 ^a	1,32 ± 0,12 ^a
Ganho de Peso (mg)	15,5 ± 18,8 ^a	12,6 ± 4,3 ^a	11,7 ± 4,6 ^a
Ganho de Biomassa (mg)	1462 ± 353 ^a	1253 ± 195 ^a	842 ± 116 ^a
TCA (mg.dia ⁻¹)	0,44 ± 0,54 ^a	0,35 ± 0,12 ^a	0,33 ± 0,13 ^a
TCE (%.dia ⁻¹)	4,7 ± 1,95 ^a	4,2 ± 0,79 ^a	4,0 ± 0,86 ^a
Variância	210 ± 115 ^a	221 ± 153 ^a	58 ± 39 ^a
Sobrevivência (%)	62 ± 10,14 ^a	66 ± 3,51 ^a	54 ± 3,51 ^a

Os dados são valores médios (\pm desvio padrão). Letras diferentes seguidas mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Abreviaturas: TCA: Taxa de crescimento absoluta, TCE: Taxa de crescimento específico.

4. DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos isolados bacterianos do biofloco

A presença das cepas bacterianas *Agromyces lapidis*, *Arthrobacter sulfonivorans* e *Enterobacter asburiae* na composição do suplemento biofloco agiram positivamente impedindo o surgimento de doenças e mortalidade provocadas por bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas caricapapayae* nas tilápias. A cepa bacteriana *Agromyces lapidis* presente na composição do biofloco foi identificada no presente trabalho pela primeira vez no Brasil, e avaliada como integrante na composição de suplemento na alimentação pela primeira vez no mundo. O primeiro registro da bactéria *Agromyces lapidis* foi com o isolamento da cepa de uma parede de pedra esculpida das Catacumbas Domitilla, Roma, Itália (Jurado, et al., 2005). A cepa bacteriana *Arthrobacter sulfonivorans* foi identificada pela primeira vez em isolados de solo do sistema radicular de *Allium aflatunense* no jardim de Warwickshire, Inglaterra (Borodina et al., 2002). A cepa bacteriana *Enterobacter asburiae* coloniza diferentes tecidos da cana-de-açúcar, e usam vários substratos para crescimento (carbono e nitrogênio) e estão envolvidos na fixação de nitrogênio e promoção do crescimento na cana-de-açúcar (Singh et al., 2021). Estudos com diagnóstico de doenças em peixes mostram que a cepa bacteriana *Aeromonas hydrophila* é considerada uma ameaça substancial para a aquicultura e que tem provocado surtos de doenças infecciosas com grandes perdas econômicas (Mastrochirico-Filho et al., 2020). A cepa bacteriana patogênica *Enterobacter cloacae* foi identificada em isolados de peixes sintomáticos vivos e moribundo (Nair et al., 2019). A cepa bacteriana *Pseudomonas caricapapayae* encontrada em tecidos vegetais foi identificada bioquimicamente como patógeno de planta (Zenelt et al., 2021). No presente estudo a cepa probiótico *Bacillus subtilis* esteve presente em todos os tratamentos, porém não houve diferenças significativas no ganho de peso e comprimento final entre nenhum tratamento. Está de acordo com um estudo que avaliou o efeito da adição da cepa probiótico *Bacillus subtilis* ao

bioflocos na criação de tilápia cujo as variáveis peso e comprimento não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Cienfuegos et al., 2018). Esses resultados indicam que a presença ou ausência da cepa probiótico *Bacillus subtilis* não interfere no ganho de peso e comprimento final na criação de tilápia. O biofoco tem um efeito probiótico no sistema de produção com a competição entre os microrganismos do flocos e o patógeno por espaço e alguns nutrientes essenciais, bloqueando a multiplicação de bactérias patogênicas (Ogello et al., 2021). Com tudo, mostrasse necessário estudos de prospecção com as cepas *Agromyces lapidis*, *Arthrobacter sulfonivorans* e *Enterobacter asburiae* isolada e avaliação frente a bactérias patogênicas para maiores esclarecimentos sobre o seu efeito como aditivo suplementar na alimentação de peixes.

4.2 Parâmetro nutricional do biofoco

O valor médio das Proteínas Totais do biofoco obtido no presente estudo foi 5,94 (g/dL). A proteína do biofoco aumentou positivamente durante o período de cultivo da tilápia do Nilo. Esse resultado está de acordo com o estudo que avaliou diferentes taxas de alimentação no desempenho da tilápia do Nilo sob sistema de bioflocos, observando que a proteína do biofoco aumentou positivamente com o aumento da taxa de alimentação. (Magouz, et al., 2021). Outro estudo que ajustou os níveis de proteína digestível e energia digestível em dietas de juvenis de tilápia do Nilo criados em bioflocos com água salobra obteve os resultados 17,39% para proteína bruta e 28,84% para conteúdo de cinzas (Durigon, et al., 2019). Diferentes tipos de bioflocos (autotróficos, quimioautotróficos e heterotróficos) podem produzir diferentes efeitos na qualidade nutricional dos flocos produzidos e influenciar no crescimento e a conversão alimentar de peixes (Oliveira, et al., 2022).

4.3 Qualidade de água

As concentrações médias de temperatura, oxigênio dissolvido e pH mensurados no presente estudo estavam dentro da faixa aceitável para cultivo de tilápia (Kubitza, 2000).

4.4 Desempenho zootécnico

O ganho de peso das tilápias obtido no presente estudo não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos, entre tanto, o suplemento biofloco melhorou substancialmente o ganho de peso em relação aos tratamentos com o uso dos probióticos comerciais. Esse resultado está de acordo com o estudo que avaliou o ganho de peso e taxa de crescimento específico em juvenis de tilápia com fornecimento de dieta 100% ração e a dieta 75% ração mais 25% de bioflocos úmidos não houve diferença significativa, porém ambos os tratamentos diferiram positivamente da dieta 75% ração (Caldini et al., 2015). Em outro estudo, verificou-se que a tilápia alimentada com ração incorporada com bioflocos apresentaram aumento significativo no ganho de peso e taxa de crescimento comparado ao tratamento controle somente ração (Menaga et al., 2019). Estes resultados sugerem que o uso do bioflocos como suplemento alimentar pode aumentar o ganho de peso em alevinos de tilápias.

A taxa de sobrevivência das tilápias obtida no presente estudo não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos, entre tanto, as tilápias alimentada com suplemento biofloco (62%) foi semelhante aos tratamentos com probiótico Pond Plus® (66%) e substancialmente superior ao probiótico N-Acqua® (54%). Esse resultado está de acordo com o estudo que observou maior taxa de sobrevivência das tilápias alimentada com ração incorporada com bioflocos (89%) comparado ao tratamento controle somente ração (83%) (Menaga et al., 2019). Em outro estudo, a taxa de sobrevivência das tilápias nos tratamentos enriquecido com probióticos (89%) apresentaram

aumento significativo na taxa de sobrevivência das tilápias com relação ao tratamento controle sem probióticos (71%) (Cienfuegos et al., 2018). A taxa de sobrevivência de juvenis de tilápia alimentados com taxas crescentes de ração variou de 76 a 96% no sistema de bioflocos, sendo superior a sobrevivência em sistema de recirculação de água clara (65%) (Oliveira et al., 2021). A taxa de sobrevivência obtida pelos autores foi superior ao encontrado no presente estudo devido a diferença do peso inicial das tilápias no sistema experimental. As pós-larvas de tilápias tem maior susceptibilidade a mortalidade e alevinos são mais resistentes devido a formação do sistema imunológico. Esses resultados indicam que ao adicionar a comunidade bacteriana presente no suplemento bioflocos à dieta de tilápias, a sua resposta imunológica aumenta, e portanto, melhora a taxa de sobrevivência das tilápias.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo mostram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no desempenho das tilápias entre os tratamentos com suplemento bioflocos e probióticos comerciais. No suplemento bioflocos foi identificado a presença das cepas bacterianas *Agromyces lapidis*, *Arthrobacter sulfonivorans* e *Enterobacter asburiae* que aumentaram substancialmente a sobrevivência das tilápias, mesmo sendo fornecido junto com bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas caricapapayae* na alimentação.

AGRADECIMENTOS

Processo nº 2020/05915-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos de mestrado, Processo - 440026/2023-7.

REFERÊNCIAS

- AOAC Official Methods of Analysis. (1997). Official Method 950.46 (16th ed.). Gaithersburg, Maryland, USA.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater. 22nd ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Asaduzzaman, M., Shumpei, I., Sumi, A., Abdul Kader, M., Ghosh, S. K., Khan, M. N. A., & Abol-Munafi Andani, A. B. (2018). Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports*, 9(January), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2017.12.003>
- Avnimelech, Y. (2003). World Aquaculture Control of microbial activity in aquaculture systems: active suspension ponds. *Reprinted from World Aquaculture*, 34(4), 19–21.
- Avnimelech, Y., (2009). Biofloc Technology: A Practical Guide Book. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 182 pp.
- Becerril-Cortés, D., Monroy-Dosta, M. D. C., Emerenciano, M. G. C., Castro-Mejía, G., Bermúdez, B. S. S., & Correa, G. V. (2018). Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 541–547.
- Belem-Costa, A.; Gomes, A.L.S.; Carvalho, E.; Nocif-Marçal, L.; Silva, T.B.A.; Soares, J.S. (2021). Protocolos para diagnóstico de doenças em peixes – 1.ed. 103 p. – Curitiba: Appris, 2021.
- Borodina, E., Kelly, D. P., Schumann, P., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., & Wood, A. P. (2002). Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 177(2), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0373-3>
- Caldini, N. N., Cavalcante, D. D. H., Filho, P. R. N. R., & Sá, M. V. do C. e. (2015). Feeding Nile tilapia with artificial diets and dried bioflocs biomass. *Acta Scientiarum*, 37(4), 335–341. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i4.27043>
- Cienfuegos, K. M., Monroy, C. D. M. D., Hamdan, A. P., Castro, J. M., Aguirre, J. F. G., & Bustos, M. J. A. (2018). Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 525–533. <https://www.researchgate.net/publication/326019551>

- Daniel, N., & Nageswari, P. (2017). Exogenous Probiotics on Biofloc based Aquaculture: A Review. *Current Agriculture Research Journal*, 5(1), 88–107. <https://doi.org/10.12944/carj.5.1.11>
- Das, S., & Mandal, A. (2018). Biofloc Technology (BFT): An Effective Tool for Remediation of Environmental Issues and Cost Effective Novel Technology in Aquaculture. *International Journal of Oceanography & Aquaculture*, 2(2). <https://doi.org/10.23880/ijoac-16000135>
- Durigon, E. G., Lazzari, R., Uczay, J., Lopes, D. L. A., Jeronimo, G. T., Sgnaulin, T., & Emerenciano, M. G. C. (2019). Biofloc technology (BFT): Adjusting the levels of digestible protein and digestible energy in diets of Nile tilapia juveniles raised in brackish water. *Aquaculture and Fisheries*, 5, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.07.001>
- Fimbres-Acedo, Y. E., Magallón-Servín, P., Garza-Torres, R., Emerenciano, M. G. C., Servín-Villegas, R., Endo, M., Fitzsimmons, K. M., & Magallón-Barajas, F. J. (2020). *Oreochromis niloticus* aquaculture with biofloc technology, photoautotrophic conditions and Chlorella microalgae. *Aquaculture Research*, 51(8), 3323–3346. <https://doi.org/10.1111/are.14668>
- Guo, H., Huang, L., Hu, S., Chen, C., Huang, X., Liu, W., Wang, S., Zhu, Y., Zhao, Y., & Zhang, D. (2020). Effects of Carbon/Nitrogen Ratio on Growth, Intestinal Microbiota and Metabolome of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00652>
- Jurado, V., Groth, I., Gonzalez, J. M., Laiz, L., Schuetze, B. & Saiz-Jimenez, C. (2005). *Agromyces italicus* sp. nov., *Agromyces humatus* sp. nov. and *Agromyces lapidis* sp. nov., isolated from Roman catacombs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 871–875. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63414-0>
- Khanjani, M. H., Sharifinia, M., & Hajirezaee, S. (2023). Biofloc: A sustainable alternative for improving the production of farmed cyprinid species. *Aquaculture Reports*, 33, 101748. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101748>
- Kubitza, F. (2000) *Tilápia: Tecnologia e Planejamento na Produção Comercial*; Fernando Kubitza: Jundiaí, Brazil. 316p.
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Swain, H. S., & Das, B. K. (2021). Biofloc Microbiome With Bioremediation and Health Benefits. *Frontiers in Microbiology*, 12(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741164>
- Lima-Neto, R., Santos, C., Lima, N., Sampaio, P., Pais, C., & Neves, R. P. (2014). Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolates culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 515–522. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000044>

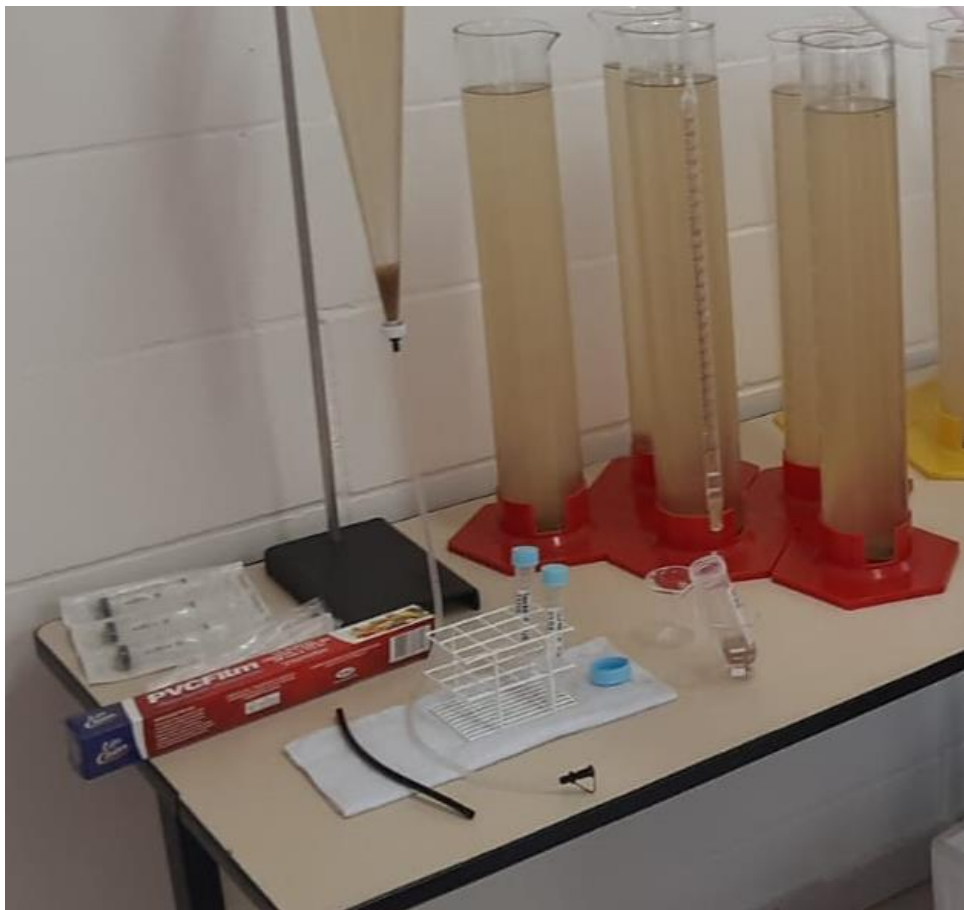
- Magouz, F., EL-Hamady, A., Moustafa, E., & Mansour, A. (2021). Assessing the Impact of using biofloc system with different feeding rates on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Performance. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 72(2), 2935–2944. <https://doi.org/10.12681/jhvms.27535>
- Mastrochirico-Filho, V. A., Hata, M. E., Kuradomi, R. Y., de Freitas, M. V., Ariede, R. B., Pinheiro, D. G., Robledo, D., Houston, R., & Hashimoto, D. T. (2020). Transcriptome Profiling of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Challenged With Pathogenic *Aeromonas hydrophila*: Inference on Immune Gene Response. *Frontiers in Genetics*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00604>
- Menaga, M., Felix, S., Charulatha, M., Gopalakannan, A., & Panigrahi, A. (2019). Effect of in-situ and ex-situ biofloc on immune response of Genetically Improved Farmed Tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 698–705. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.031>
- Nair, S. G., Lipton, A. P., De Los Ríos-Escalante, P., & Ibáñez-Arancibia, E. (2019). Isolation and characterization of bacterial pathogens, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* from the moribund fish, *Etioplos maculatus*. *J. Mater. Environ. Sci*, 10(10), 1332–1349. <http://www.jmaterenvirosci.com>
- Ogello, E. O., Outa, N. O., Obiero, K. O., Kyule, D. N., & Munguti, J. M. (2021). The prospects of biofloc technology (BFT) for sustainable aquaculture development. *Scientific African*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e01053>
- Oliveira, L. K., Pilz, L., Furtado, P. S., Ballester, E. L. C., & Bicudo, Á. J. de A. (2021). Growth, nutritional efficiency, and profitability of juvenile GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in biofloc system on graded feeding rates. *Aquaculture*, 541(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736830>
- Oliveira, L. K., Wasielesky Jr, W., & Tesser, M. B. (2022). Fish culture in biofloc technology (BFT): Insights on stocking density carbon sources, C/N ratio, fish nutrition and health. *Aquaculture and Fisheries*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.08.010>
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1), 116–136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- Singh, P., Singh, R. K., Li, H. B., Guo, D. J., Sharma, A., Lakshmanan, P., Malviya, M. K., Song, X. P., Solanki, M. K., Verma, K. K., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2021). Diazotrophic Bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* Promote Sugarcane Growth by Inducing Nitrogen Uptake and Defense-Related Gene Expression. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600417>

- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Xu, W. J., Morris, T. C., & Samocha, T. M. (2015). Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>
- Zago, D., Santos, I. C. dos, Alves, G., Gonçalves, D. D., & Martins, L. de A. (2021). Viabilidade do *lactobacillus casei ssp. casei* em queijo tipo minas frescal e a competição com *staphylococcus aureus*. *Revista Thêma et Scientia*, 11(1), 107-118.
- Zenelt, W., Krawczyk, K., & Borodynko-Filas, N. (2021). Biodiversity and scope of endophytic and phytopathogenic bacterial species identified in plant samples investigated in the Plant Disease Clinic laboratory. *Journal of Plant Protection Research*, 61(1), 63-82. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.136274>

APÊNDICE



Anexo 1. Sistema de biofoco para coleta do suplemento nutricional.



Anexo 2. Analise dos parâmetros de qualidade de água do biofoco.



Anexo 3. Amostra de biofloc coletada para liofilização e posterior análise de proteínas totais e Microscopia eletrônica de varredura e transmissão.



Anexo 4. Povoamento com pós larvas tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no sistema experimental com água clara.