UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Bacillus Subtilis NA CRIAÇÃO DE TAMBAQUI EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

DRIELY KATHRINY MONTEIRO DOS SANTOS

MANAUS – AMAZONAS
Junho – 2018

DRIELY KATHRINY MONTEIRO DOS SANTOS

Bacillus subtilis NA CRIAÇÃO DE TAMBAQUI EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

Orientadora: Ligia Uribe Gonçalves, Drª.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas-UFAM como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

MANAUS - AMAZONAS

Junho, 2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Driely Kathriny Monteiro dos
S237b Bacillus subtilis na criação de tambaqui em sistema de bioflocos / Driely Kathriny Monteiro dos Santos. 2018
51 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Ligia Uribe Gonçalves
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas.

1. bft. 2. Colossoma macropomum. 3. desempenho zootécnico. 4. probiótico. I. Gonçalves, Ligia Uribe II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PARECER

A Banca Examinadora composta pelos professores Drª. Ligia Uribe Gonçalves, Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto e Dr. Rafael Yutaka Kuradomi, esteve reunida no dia 31 de julho de 2018, Manaus para analisar a dissertação de Driely Kathriny Monteiro dos Santos – 2160330, intitulada "***Bacillus subtilis* na criação de tambaqui em sistema de bioflocos".** Após a análise do referido trabalho, esta Banca concluiu que o mesmo apresenta as características técnico-científicas de uma dissertação, atendendo desta forma às exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Resolução n° 021/2004 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão – CONSEP e Câmara de Ensino de Graduação – CEG da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Este é o nosso Parecer.

Drª. Ligia Uribe Gonçalves – INPA
Orientadora e Presidente da Banca

Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto - UFAM
Membro da Banca

Dr. Rafael Yutaka Kuradomi
Membro da Banca

“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio”. - ***Martin Luther King Jr***

“Também pensei: Deus prova os homens para que vejam que são como os animais. O destino do homem é o mesmo do animal; o mesmo destino os aguarda. Assim como morre um, também morre o outro. Todos têm o mesmo fôlego de vida; o homem não tem vantagem alguma sobre o animal. Tudo é vaidade”.- ***Eclesiastes 3.18,19***

“Não tente. Faça... ou não faça. Não há tentativa”. – ***Mestre Yoda , Star Wars***

Aos integrantes da Torre Forte, pela amizade, irmandade, por terem paciência e por me aguardarem toda a semana.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Jesus por tudo o que Ele é, por ser meu confidente, por nunca ter me deixado, cumprindo o que foi prometido por Ele.

À minha mãe, Dora Monteiro, por ser a pessoa que mais me entende nesse planeta, por entender minha ausência e ainda assim conseguir ser minha maior incentivadora, e meu pai David Trajano, que mesmo sem saber, sua "implicância" foi um dos combustíveis que precisei.

À minha Orientadora, Dra. Ligia Uribe Gonçalves. Muito obrigada por ser orientadora, professora, amiga, psicóloga, financiadora de lanches e churrascos, por dedicar seu precioso tempo para nos ouvir falar besteiras (às vezes), obrigada por investir confiança em nós, mesmo nos projetos mais "malucos". Obrigada por ser uma inspiração na ciência e no caráter.

Aos Drs. Diogo Castro e Paula - FIOCRUZ, por todo o auxílio na execução das análises microbiológicas, por disponibilizarem as cepas de *Bacillus subtilis*, e por sempre estarem disponíveis para esclarecer as dúvidas que apareceram.

Aos professores, Thyssia e Jony Dairiki, obrigada por todo apoio e companheirismo no tempo em que estivemos trabalhando juntos, principalmente nos fins de semana. Ao Dr. Leandro Godoy - FURGS, por sempre esclarecer as dúvidas.

Aos técnicos e funcionários do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, que auxiliaram em diversas atividades, coletas e análises em laboratório. Sr. Atílio, Sr. Gabriel, Sr. Raimundo, Sr. Olegário (Fininho), Sr. Marquinhos, Dona Suzana e Dona Maria Inês. Quero agradecer especialmente a senhora, Dona Inês, não só porque fez minhas análises bromatológicas (risos), e nem só porque faz nossas "vontades", obrigada por ser do jeito que a senhora é, e por se importar com cada aluno.

Ao LAFAP - INPA, na pessoa da Profa. Dra. Elizabeth Gusmão, por diversas vezes ter nos auxiliado, seja na estrutura do laboratório, em equipamentos ou reagentes.

Aos meus amigos/irmãos, do projeto GIGAS – Aquicultura na Amazônia Ocidental. Obrigada por todo o companheirismo nesse tempo, por todas as refeições que fizemos juntos, por todas as idas ao Barcelona e ao Gusta +, vocês foram a minha família mais presente neste momento.

Ao meu amigo internacional, Gian Marco Dardengo (Dom Quixote - o italiano mais legal que conheço, mesmo não sabendo cozinhar). Obrigada por tudo Gian, por sempre me ajudar no

tempo em que esteve aqui, por me fazer rir e me poupar dos trabalhos mais pesados – porque o que vale é a resistência e não somos os primeiros a cair, como o Rocky: um lutador -, por fazer parte deste capítulo da minha história.

À Allana Feitosa (Allanina), obrigada por todo o companheirismo nesta última fase. Você é exemplo vivo de superação, obrigada por todas as conversas no galpão, pelos "acampamentos" no laboratório e na sala dos alunos, ao seu lado foi mais fácil tocar esse último experimento.

À minha mana Naiara Dantas (Naná), pelas conversas, pelos cafés, cinemas, churrasquinhos, mas principalmente por todo auxílio na vida e nas pesquisas e ao Thiago Santana (Thi), que me ajudou muuuuuuito, e ainda ajuda, e que mesmo trabalhando com pirarucu e ác.graxos, não adianta, nós sempre seremos o "BFT team".

À todos da equipe, - As meninas - Sunique Poá, Cláudia Maiza, Ana Beatriz, Larissa França, Rebeca Moda, Amanda Halum, Hálice Souza, Flavia Cuadal, Vanessa Celyan, obrigada por todo o auxílio nas análises em laboratório e nas coletas. Os meninos – Francisco Dantas, Odair Rodrigues. Obrigada Oda pela amizade, parceiragem, pelos "acampamentos", por a gente ser diferente e ainda assim não se matar. E lembrando mais uma vez que eu não sou sua padawan, eu que sou sua "mestre" Jedi! ;)

Aos meus amigos/irmãos mais velhos, Aline Marculino, obrigada pela amizade, incentivo, por todo carinho e preocupação - você é demaaaais, Flávio Augusto (Guto), obrigada por tudo, por toda a sua ajuda, disposição e não só pelos bolos de cenoura com cobertura de chocolate – você é *Trend*.

A todos que passaram pelo grupo e ajudaram muuuito nas coletas e biometrias, Karla Jaqueline (Karlinha), Eike Batista, Rebeca Machado, Edson Figueiredo, Jéssica Cerdeira, Ricardo Cezar (menino do LEEM – 4ever), todos os que ajudaram direta ou indiretamente.

À FAPEAM, por conceder a bolsa de estudos.

Ao PPGCAN, juntamente com todos os meus colegas de turma, aos quais tive o privilégio de conhecer e conviver. Aos professores, obrigada por toda a dedicação e por nos desafiar para a pesquisa, principalmente o prof. Frank Cruz, Coordenador do Programa, por todo o incentivo e colaboração.

MUITO OBRIGADA MESMO!

RESUMO

Sistemas aquícolas fechados podem ser enriquecidos com probióticos, como o *Bacillus subtilis*, para promover uma piscicultura sustentável. Neste estudo, foi avaliado o efeito de *B. subtilis* em um sistema estático com água clara em comparação com um sistema com tecnologia de bioflocos (BFT). Juvenis de tambaqui foram distribuídos em um dos quatro tratamentos, cada um foi replicado cinco vezes: sistema estático de água clara com (AC + BS) ou sem (AC) *B. subtilis*, e BFT com (BFT + BS) ou sem (BFT) *B. subtilis*. Cada unidade experimental foi constituída de um tanque de 200 L com 20 juvenis de tambaqui. Para os tratamentos com *B. subtilis*, os tanques foram inoculados em intervalos semanais com uma suspensão de 4×10^8 células mL^{-1} de cultura. Todos os peixes foram alimentados (2% da biomassa) três vezes ao dia por 62 dias. Todos os parâmetros da água do BFT estavam dentro dos limites recomendados para a produção de tambaqui. Embora não tenha havido interação entre os fatores para o desempenho zootécnico, peixes criados no sistema BFT foram 50% mais pesados que aqueles no sistema AC, o que foi atribuído ao consumo de bioflocos. Apesar da inoculação com *B. subtilis* não melhoraro crescimento do tambaqui, o BFT é uma tecnologia promissora que pode ser usada para economizar água, diminuir os efluentes da aqüicultura e promover a produção de tambaqui.

Palavras-chave: BFT, *Colossoma macropomum*, desempenho zootécnico, probiótico.

ABSTRACT

Closed aquaculture systems can be enriched with probiotics such as *Bacillus subtilis* to promote a sustainable fish farming. In this study, we focused on the effect of *B. subtilis* on a clear water static system compared with a system based biofloc technology (BFT). Tambaqui juveniles were assigned to one of the four treatments, each of which was replicated five times: clear water static system with (CW+BS) or without (CW) *B. subtilis*, and BFT with (BFT+BS) or without (BFT) *B. subtilis*. Each replicate group comprised 20 tambaqui juveniles in an artificially aerated 200-L tank. For *B. subtilis* treatments, tanks were inoculated at weekly intervals with a 4×10^8 cell mL^{-1}culture suspension. All fish were fed (2% of the estimated biomass) three times a day for 62 days. All water parameters of the BFT were within the recommended limits for tambaqui farming. Although there was no interaction between the factors for zootechnical performance, fish raised in the BFT system were 50% heavier than those in the CW system, which was attributable to biofloc consumption. Despite theinoculation with *B. subtilis* did not improve tambaqui growth, BFT is a promising technology that can be used to save water, decrease aquaculture effluents, and promote tambaqui farming.

Key words: BFT, *Colossoma macropomum*, probiotic, zootechnical performance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Unidades Experimentais 27

Figura 2: *Bacillus subtilis* - Coloração de Gram – Aumento 100X 42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 (A): Ganho em peso médio dos tambaquis dos sistemas (AC, BFT, AC+BS, BFT+BS) em 62 dias de experimento..... 32

Gráfico 1 (B): Peso médio dos tambaquis no início e ao término do experimento..... 32

Gráfico 1 (C): Valores referentes à conversão alimentar do tambaqui nos sistemas (AC, BFT, AC+BS, BFT+BS) 32

Gráfico 1 (D): Consumo total em gramas de ração pelos tambaquis em 62 dias de experimento.....32

Gráfico 2 : Alcalinidade média registrada durante os 62 dias de experimento nos sistemas de criação de juvenis de tambaqui. (AC, BFT, AC+BS, BFT+BS) 36

Gráfico 3 : Concentração média de sólidos suspensos durante os 62 dias de experimento nos sistemas BFT E BFT+BS..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desempenho zootécnico (média ± desvio-padrão) de juvenis de tambaqui mantidos em diferentes sistemas de criação..... 31

Tabela 2: Índices biométricos (média ± desvio-padrão) de juvenis de tambaqui mantidos em diferentes sistemas de criação..... 33

Tabela 3: Composição centesimal (média ± desvio-padrão) de juvenis de tambaqui (peixe inteiro) mantidos em diferentes sistemas de criação..... 34

Tabela 4: Composição centesimal (média ± desvio-padrão) dos bioflocos com e sem a adição de *Bacillus subtilis* em sistemas de criação de juvenis de tambaqui 34

Tabela 5: Variáveis da qualidade de água (média ± desvio-padrão) em diferentes sistemas de criação de tambaqui, *Colossoma macropomum*..... 35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies bacterianas identificadas nos isolados de intestino de tambaqui. 38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. OBJETIVOS 17
2.1. Objetivo geral 17
2.2. Objetivos específicos 17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
3.1. A piscicultura e o tambaqui 18
3.2. Tecnologia de bioflocos para intensificação da aquicultura 19
3.3. *Bacillus subtillis* como probiótico na aquicultura 22
4. MATERIAL E MÉTODOS 25
4.1. Formação e manutenção do biofloco 25
4.2. Delineamento Experimental 26
4.3. Qualidade de água 27
4.4. Coletas e amostras 28
4.5. Dados de desempenho zootécnico 28
4.6. Valores biométricos 29
4.7. Análises microbiológicas 29
4.7.1. Isolamento e identificação das bactérias no tambaqui 29
4.7.2. Identificação de *Bacillus subtilis* 30
4.8. Análises estatísticas 30
5. RESULTADOS 31
5.1 Desempenho zootécnico 31
5.2 Índices biométricos 33
5.3 Composição centesimal 34
5.4 Qualidade de água 35
5.5 Análise microbiológica 38
6. DISCUSSÃO 39
7. CONCLUSÃO 43
8. REFERÊNCIAS 44

1. INTRODUÇÃO

Em 2016, a produção nacional de peixes alcançou 574 mil toneladas, demonstrando um desenvolvimento do setor de mais de 100% nos últimos dez anos. Para os próximos oito anos, a expectativa de crescimento da aquicultura brasileira é de 104%, o que demonstra um aumento constante da demanda por pescado e consequentemente em todos os elos que constituem a sua cadeia produtiva.

Para que a aquicultura se desenvolva, é necessário respeitar as condições ambientais e ajustar a forma de produzir esses organismos aquáticos, considerando os padrões de qualidade de água e destino dos efluentes. Comumente em sistemas intensivos de criação, apenas 20-25% da proteína presente nas rações é metabolizada pelos peixes, o restante é perdido para o sistema por meio das fezes e urina, na forma amônia e nitrogênio orgânico.

A intensificação dos sistemas de produção favorece a geração de compostos nitrogenados, como a amônia e o nitrito, produtos da excreção dos animais e da degradação microbiana da matéria orgânica. Esses nutrientes, quando descartados de maneira incorreta, são poluidores do ambiente natural, principalmente por eutrofizarem as águas. Por outro lado, os compostos nitrogenados, quando bem manejados, podem ser reciclados e reutilizados pelo próprio peixe para geração de proteína.

Em sistemas de produção que utilizam a tecnologia de bioflocos (BFT), o uso e a renovação de água dos meios de criação são mínimos, porém com aeração constante e fertilização adequada, ocorre o favorecimento para o crescimento microbiológico das bactérias heterotróficas. Esta tecnologia caracteriza-se pela formação de floco, substrato destas bactérias, em uma relação entre 15 – 20:1 de carbono e nitrogênio. As bactérias heterotróficas convertem os nutrientes nitrogenados não utilizados ou excretados, em biomassa microbiana. Essa biomassa potencializa a produção, pois melhoram os parâmetros de qualidade da água; pode ser utilizada como fonte suplementar de alimento pelos peixes filtradores, como o tambaqui; propicia um ambiente mais escuro, colaborando para o bem estar animal; e compete com os microrganismos patogênicos, proporcionando um ambiente mais seguro para a criação.

A crescente preocupação com a biosseguridade dos sistemas de criação impulsiona cada vez mais pesquisas relacionadas à prevenção e tratamento de patógenos. Atualmente, o

uso de antibióticos na aquicultura tem sido tachado devido à potencialidade ao desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos e resíduos deixados em corpos d'água. De maneira oposta, o uso de probióticos nas criações tem crescido e apresentado efeito positivo em relação à sobrevivência e o favorecimento da população bacteriana benéfica, promovendo a supressão de bactérias nocivas. Dentre as pesquisas realizadas para o uso de probióticos na aquicultura, destacam-se os produtos que contem *Bacillus subtilis*.

Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito da bactéria *B. subtilis* em dois sistemas de criação, com baixa renovação (sistema com água clara) e sem renovação (sistema de bioflocos).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de *B. subtilis* em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) mantidos em sistema de bioflocos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o desempenho zootécnico de tambaquis em sistemas com a inclusão do *B. subtilis* no ambiente;

Verificar a composição centesimal da carcaça de tambaqui criados em sistemas com a inclusão do *B. subtilis;*

Identificar qualitativamente as mudanças na microbiota intestinal do tambaqui quando criado em sistema BFT e com a presença de *B. subtilis.*

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A piscicultura e o tambaqui

A aquicultura está se expandindo para atender a demanda mundial por pescado, cujo consumo aumentou de uma média de 9,9 Kg em 1960 para 19,7 Kg por pessoa em 2013 (FAO, 2016). No Brasil, a criação de peixes redondos, como o tambaqui, o pacu (*Piaractus mesopotamicus),* a pirapitinga (*P.brachypomus)* e seus híbridos, exibiu um crescimento notável entre os anos de 2013 e 2014, igualando-se à produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*) que foi da ordem de mais 180 mil toneladas (PEDROZA FILHO, 2016). E dentre os peixes redondos, a principal espécie nativa que se destaca neste cenário é o tambaqui, representando 137 mil toneladas e 27% do total de peixes produzidos no País (IBGE, 2016).

O tambaqui, é uma espécie oriunda das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, e apresenta características desejáveis para a piscicultura, pois é de fácil adaptação às condições e sistemas de criação (DA SILVA ; FUJIMOTO, 2015), tem aceitação e bom aproveitamento de rações, rápido crescimento, carne de elevado valor nutricional e apreciada pelo mercado consumidor. Além disso, a espécie possui hábito alimentar onívoro o que possibilita a utilização de uma grande variedade de ingredientes na formulação de suas rações, ainda possui a habilidade em filtrar e aproveitar o alimento natural (plâncton) e tolera baixos níveis de oxigênio dissolvido na água (CAMPOS et al., 2015).

O tambaqui é reconhecido como o segundo maior peixe de escamas da Amazônia, podendo chegar até 30 quilos de peso e 1,5 metros comprimento durante seu ciclo de vida na natureza (GOULDING ; CARVALHO, 1982). Quando manejado em diferentes sistemas de criação, apresenta conversão alimentar aparente entre 1,2 e 1,6 em viveiros e 2,9 quando criados em tanque rede, com produtividade superior a 10 mil Kg/ha ao final do ciclo produtivo em 12 meses (IZEL ; MELO, 2004; CHAGAS, et al., 2005; CAVERO, et al., 2009).

O tambaqui é apreciado em toda a região Norte do país, especialmente pela população de Manaus, uma cidade com aproximadamente 2,3 milhões de habitantes. Somente em Manaus, são consumidos anualmente mais de 17 Kg de tambaqui/habitante/ano e deste valor, 95% é proveniente da piscicultura (SEBRAE, 2015; CAMPOS et al., 2015).

A possibilidade de aumentar a produtividade do tambaqui é animadora, e poder criá-lo em sistema com a tecnologia de bioflocos nos permite enxergar a capacidade de ciclos de produção mais curtos, com reciclagem de nutrientes e reutilização de água, somados a biosseguridade, resultando em menor incidência de doenças. O tambaqui apresenta um conjunto das principais características procuradas para este tipo de sistema, principalmente por ser uma espécie com capacidade de filtrar a água, o que possibilita o aproveitamento do biofloco e a economia na oferta de rações.

3.2. Tecnologia de bioflocos para intensificação da aquicultura

A geração de efluentes com alta concentração de matéria orgânica e nutrientes pela aquicultura (PRIMAVERA, 2006), tem exigido crescentes estudos para a adoção de sistemas de criação com renovação de água e uso mínimo desse recurso (KRUMMENAUER, et al., 2012). Dentre os sistemas e novas tecnologias, destaca-se o sistema com a tecnologia de bioflocos, ou BFT (*Biofloc Technology System*).

O sistema BFT, foi utilizado primeiramente em 1970 com diferentes espécies de peneídios no IFREM – COP (Instituto Francês para Exploração do Mar, Centro de Oceano Pacífico), tendo como alvo a possibilidade de reduzir o uso de água e, consequentemente, diminuir os impactos ambientais (EMERENCIANO et al., 2012).

Os bioflocos são agregados microbianos, constituídos de pequenas partículas na forma de material floculado, colonizados por bactérias heterotróficas, microalgas, protozoários flagelados e ciliados, rotíferos, nematóides, dentre outros microrganismos (HARGREAVES, 2006), que ficam aderidos em superfícies ou em suspensão na coluna d'água. O uso da tecnologia de bioflocos é interessante em comparação à aquicultura tradicional, pois requer baixa ou zero troca de água, recicla o nitrogênio do sistema com auxílio da biomassa bacteriana, e esta fica disponível como fonte alimentar para os animais (HARGREAVES, 2006; AVNIMELECH, 2007).

O sistema BFT exige alta oxigenação, pois ocorre considerável demanda de oxigênio por parte de bactérias autotróficas e heterotróficas, em média 4,48 gramas por litro (EBELING, et al., 2006). Estas bactérias são capazes de utilizar o oxigênio para oxidar a amônia em nitritos e nitratos. Bactérias oxidadoras de amônia do gênero *Nitrossomas* transformam a amônia em nitrito (nitritação) e bactérias oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrobacter* transformam nitrito em nitrato (nitratação) (BUTKOVSKYI, 2009). A alta

concentração de nitrogênio presente nos sistemas provém, principalmente, dos resíduos excretados pelos organismos aquáticos, pois estes aproveitam em média somente 40% do nitrogênio presente na dieta (PÉREZ-FUENTES, 2016) em peixes onívoros, como o tambaqui, o nível de amônia excretada pode alcançar valores próximos a 0,35 mg por dia (ISMIÑO-ORBE, et al,. 2003).

A comunidade bacteriana presente nos bioflocos utiliza o nitrogênio acumulado na água e o transforma em biomassa microbiana, sendo essas partículas ricas em proteína (alcançando níveis de até 50%), aminoácidos e outros elementos nutricionais essenciais, que podem ser utilizados como fonte de alimento na criação. A alta aeração no sistema, além de promover a oxigenação para os organismos aquáticos e para a microbiota, se faz necessária para um revolvimento constante da água, mantendo os bioflocos em suspensão, para que assim estejam disponíveis na coluna d'água e sejam melhor aproveitados pelos peixes (THOMPSON et al., 2002; BURFORD et al., 2004;AZIM ; LITTLE, 2008).

A formação do agregado microbiano se dá pelo aumento da razão Carbono:Nitrogênio (C:N) para níveis entre 15:1 e 20:1, e é dependente de diversos fatores, como: o fornecimento de substratos orgânicos para a comunidade microbiana, o provimento de alimentação na criação, excreção e também componentes alimentares não utilizados pelos organismos aquáticos (AVNIMELECH, 1999; 2007). As bactérias heterotróficas presentes nos agregados microbianos são as responsáveis pelo ciclo do nitrogênio, diminuindo a concentração de amônia dissolvida e proporcionando uma água livre de compostos tóxicos (AVNIMELECH, 1999; HARGREAVES, 2006), uma vez que, ainda que ocorra acúmulo de nitrato, este só é tóxico em elevadas concentrações, acima de 200 mg. L^{-1}.

A biodegradação da matéria orgânica produzida neste sistema dependerá da comunidade microbiana associada aos bioflocos, e todos estes processos podem ser afetados pelas condições ambientais e operacionais, tais como temperatura, salinidade, taxa de troca d'água, intensidade de mistura do floco, dentre outros (AVNIMELECH, 2007).

Este sistema apesar de ser relativamente novo, já foi avaliado em criações de várias espécies de organismos aquáticos, com resultados relevantes, principalmente, para os organismos capazes de filtrar o biofloco e aproveitá-lo como alimento (EMERENCIANO et al., 2012). O sistema BFT vem sendo largamente utilizado na criação de camarões, o que resultou no aumento de 40% em crescimento, 50% de ganho em peso e 80% em biomassa final, em comparação aos sistemas convencionais de troca contínua. O sistema expandiu-se e tem sido bem - sucedido na Ásia, América Latina e América Central, e em estufas de pequena

escala nos EUA, Coréia do Sul, Itália, China, Brasil, e outros (KRUMMENAUER et al., 2011; EMERENCIANO et al., 2012).

Apesar dos diversos benefícios que a tecnologia do BFT proporciona, sua utilização exige elevado investimento inicial e custo operacional, pois se faz necessário o uso de revestimentos de membrana que possuem alto valor e necessitam de manutenção constante, o alto consumo de energia com aeração e bombeamento e aquisição de geradores de energia, a necessidade de mão de obra técnica treinada, elevando assim os custos trabalhistas, (EBELING, et al., 2006; HARGREAVES, 2006; AVNIMELECH, 2009).

Por outro lado, a tecnologia de BFT, aumenta consideravelmente a produtividade do sistema de produção, o que pode resultar em melhor custo benefício em relação aos sistemas tradicionais. As suas principais vantagens são (i) o uso reduzido da água, pois esta pode ser reciclada e utilizada em outros ciclos, permitindo uma maior estabilidade em qualidade de água como, oxigênio e pH; (ii) utiliza menos área e favorece a criação em densidades maiores; (iii) os organismos aquáticos desempenham crescimentos mais rápidos, devido ao aproveitamento do biofloco; (iv) pode ser operado durante todo o ano, independente do clima local (OTOSHI, *et al*. 2001); (v) possui menor suscetibilidade a doenças devido à melhoria da biossegurança (TAW, 2015); (vi) é mais eficiente quando comparado a outros sistemas, pois aproveita de melhor forma a proteína das rações, já que os nutrientes dos resíduos são reciclados em proteína microbiana, na forma de flocos, diminuindo a necessidade de alimentações e despesas com rações, provendo maiores rendimentos e menores impactos ao meio ambiente (BOYD ; TUCKER, 1998; EBELING et al., 2006; SAMOCHA et al., 2007; AVNIMELECH, 2009).

A tecnologia de bioflocos está bem consolidada na criação de camarão marinho no Brasil, e alguns estudos foram realizados com peixes. O uso do BFT na produção de tilápias resultou em sobrevivência de 99%, com índice de conversão alimentar próximo a um (AVNIMELECH, 2007; AZIM ; LITTLE, 2008; KUBITZA, 2011), e em tambaquis, um ganho em peso de 23,36% superior em relação ao tratamento controle (DANTAS et al., 2015).

O biofloco presente no sistema também é exposto como uma estratégia para o controle de doenças, pois apresenta efeito probiótico natural. Este efeito é promovido por grupos de microrganismos, principalmente bactérias que são capazes de favorecer o equilíbrio microbiano do intestino do hospedeiro. Bactérias do gênero *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp. e *Pseudomonas* sp., na presença de carbono orgânico solúvel, são capazes de produzir poliésteres PHB (poli-ß-hidroxibutirato), estes polímeros quando degradados no intestino,

podem ter atividade antibacteriana (YU, et al., 2005, SINHA, et al., 2008, EMERENCIANO et al., 2012).

O uso de probióticos nas criações tem crescido e apresentado efeito positivo em relação à sobrevivência, garantindo a biosseguridade do sistema, e o favorecimento da população bacteriana benéfica, promovendo a supressão de bactérias nocivas (KOLIDA ; GIBSON, 2011; FROZZA, 2017). O uso de probióticos, especificamente o *B. subtilis*, em sistemas com a tecnologia de bioflocos é interessante por poder propiciar o desenvolvimento de bactérias benéficas, contribuindo positivamente com o sistema de produção e, consequentemente, com a saúde dos peixes.

3.3. *Bacillus subtillis* como probiótico na aquicultura

Em 1965, os probióticos foram pela primeira vez definidos como “um fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos” (LILLY ; STIIWEL, 1965). O termo probiótico já foi utilizado para descrever esses aditivos dietéticos como, suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos (FULLER, 1989), como suplementos na dieta promotores de crescimento, contribuindo com o balanço microbiano intestinal (PARKER, 1974). Posteriormente, os probióticos foram definidos como bactérias naturais do intestino, que após positivas ingestões são capazes de colonizar o trato digestivo e até mesmo aumentar a microbiota presente, reduzindo riscos da colonização de organismos patogênicos, garantindo assim, que os alimentos sejam melhor aproveitados (VANBELLE, et al., 1990).

Com o avanço das pesquisas, o termo probiótico passou a ser considerado por qualquer suplemento ou “preparado” microbiano, não necessariamente formado por organismos vivos, em concentração capaz de alterar a microbiota, exercendo efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro (GRAM, et al., 1999; SALMINEN, et al., 1999; SCHREZENMEIR ; VRESE, 2001), o que tornou de certa forma, o conceito de probiótico generalizado e abrangente.

Uma definição bem aceita e que também se refere à aquicultura descreve o probiótico como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, concedem efeito benéfico à saúde do hospedeiro, por modificar e melhorar a microbiota no intestino, e/ou a comunidade microbiana do ambiente aquático (VERSCHUERE, et al., 2000).A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), sugeriu em 2001, como definição para probióticos: “microrganismos

vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro".

Neste contexto, como por vezes a definição não foi harmoniosa, cada vez mais cepas bacterianas foram e ainda são estudadas na aquicultura para afirmar o efeito benéfico e inofensivo ao hospedeiro (VENDRELL, et al., 2008). A utilização de probióticos na aquicultura vem crescendo, e descobertas sobre suas propriedades e funcionalidades tem apoiado a produção. Quando utilizados como suplementos em dietas, são capazes de melhorar o crescimento dos animais, a morfologia intestinal e aumentar a sobrevivência (ADEOYE et al., 2016; CEREZUELA et al., 2016).

Assim, o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (1998; 2017), já estabelecia o registro de produtos probióticos que apresentassem apenas os microrganismos das espécies *B. subtilis, B.toyoi, Lactobacillus acidophilus, Streptococcus faecium e Saccharomyces cerevisiae*. Estudos com o *B.subtilis*, como bactéria probiótica, revelaram propriedades na prevenção de muitas doenças do sistema imune em humanos. Devido sua considerável estabilidade térmica e capacidade de sobreviver à barreira gástrica, mostra-se pertinente como aditivo alimentar, pois promove proteção contra infecções, e melhoras quanto à síndrome do intestino irritável, possuindo capacidade de formar biofilme, ou seja, crescerem organizadamente (CUTTING, 2011; LEFEVRE et al., 2017). O uso de *Bacillus* sp. como probiótico, ou associado como simbiótico, aumenta a imunidade geral em ratos (HAMDY *et al*., 2018), carpa capim, *Ctenopharynodon idellus* (GUO *et al*., 2016), e também na tilápia (TELLI et al., 2014; VAN DOAN et al., 2018).

Quanto ao seu efeito no meio aquático, *Bacillus* sp. mostra-se capaz de remover poluentes das águas residuais, de forma eficaz e com baixo custo, eliminando até mesmo metais pesados, nitrogênio, fósforo e compostos sulfurosos (WU et al., 2012). De uma maneira geral, bactérias autotróficas convertem aproximadamente 6% do nitrogênio inorgânico em nitrogênio orgânico, enquanto bactérias heterotróficas podem alcançar níveis de 100% de conversão de nitrogênio inorgânico em nitrogênio orgânico (EBELING et al., 2006), e uma taxa de crescimento dez vezes superior ao de bactérias autotróficas (CRAB et al., 2007).

Particularmente, para *B.subtilis*, observa-se a capacidade de secretar substâncias poliméricas extracelulares, e também uma excelente capacidade de floculação (SHIH *et al*., 2005), porém, ainda não há muitos estudos que relatem quanto a floculação no tratamento da água na tecnologia de bioflocos (LU et al., 2012).

A busca por sistemas aquícolas cada vez mais sustentáveis, provocou um vasto interesse pelo uso de probióticos de uma forma geral (WANG, et al., 2006). Neste cenário, o sistema de bioflocos tem vantagem por favorecer o crescimento de microrganismos benéficos, garantindo maior biossegurança (KOLIDA ; GIBSON, 2011).

Com isso o presente estudo visou avaliar o desempenho produtivo do tambaqui, bem como as variáveis de qualidade de água do sistema com a inclusão da tecnologia de bioflocos, expostos a *B. subtilis* como agente probiótico, na expectativa de aumento de bactérias benéficas frente a supressão de bactérias patogênicas garantindo um ambiente de criação mais seguro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Aquicultura da Coordenação de Tecnologia e Inovação – COTEI/INPA - (3°05'26,7"S e 59°59'41,1"W). O projeto foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o protocolo n° 031/2017.

4.1. Formação e manutenção do biofloco

O início da formação do biofloco ocorreu em uma caixa de 500 litros com aeração constante, e foi utilizado melaço de cana de açúcar como fertilizante para alcançar uma relação C:N de 20:1. Análises de água foram realizadas semanalmente para medir e controlar as ondulações de compostos nitrogenados no sistema (item 4.3). Para acelerar a formação do biofloco, foi adicionado 5 g de farelo de trigo nos primeiros três dias e diariamente ração comercial (0,8 g), para criar superfície para fixação e desenvolvimento dos microrganismos. As concentrações de nitrogênio e carbono presente na ração foram feitas conforme adaptações dos cálculos propostos por Avnimelech (1999):

C: Kg de ração x (% de MS) x (% de N assimilado pelo peixe) / 2 (~ 50% C)

N: Kg de ração x (% de MS) x (% de N assimilado pelo peixe) x (% de PB) / 6,25

Onde: C = carbono

N = nitrogênio

MS = matéria seca

PB = proteína bruta

Com base nas concentrações de carbono e nitrogênio na ração, foi obtida uma relação C:N de 5:1, e para ajustá-la para 20:1, foi adicionado 19,6 g de melaço de cana de açúcar, e o cálculo da sua concentração de carbono foi realizado pela adaptação do cálculo proposto por Avnimelech (1999):

[ ] de C: 1000 g x % de MS x % de C no melaço

A completa formação do biofloco avaliada pela estabilização na concentração de amônia (nível < 0,5 mg L^{-1}) e nitrito (nível < 0,5 mg L^{-1}) aconteceu aos 29 dias. A partir daí, para a manutenção do sistema foi feita a fertilização com açúcar para manter a relação

C:N de 6:1 ao longo do experimento (AVNIMELECH, 2007), quando a concentração de amônia ($N\text{-}NH_4$) alcançasse valor igual ou superior a 1mg . L^{-1}.

Após o período de estabilização do sistema, foram adicionados 300 litros de água para aumentar o crescimento dos microrganismos. Desse tanque inicial, foram distribuídos 80 litros de bioflocos, mais 120 litros de água de poço artesiano nas dez unidades experimentais que correspondiam aos tanques do tratamento com tecnologia de bioflocos, conforme descrito no item 4.2.

4.2. Delineamento Experimental

Juvenis de tambaqui foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, 2 x 2, totalizando quatro tratamentos: sistema estático com renovação diária de 50% da água clara (AC) e sistema estático com renovação diária de 50% da água clara com a adição de *B.subtilis* (AC+BS), sistema com a tecnologia de bioflocos (BFT) e, sistema com a tecnologia de bioflocos com a adição de *B. subtilis* (BFT+BS), em cinco repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi composta por um tanque de polietileno (Figura 1) com 200 litros de volume útil, com 20 tambaquis cada (23,24 ± 0,34 g; 8,9 ± 0,06 cm; Gráfico 1 B), mantidos por aeração mecânica proveniente de compressor de ar.

Nas unidades experimentais representadas pelos tratamentos com *B. subtilis* (AC+BS; BFT+BS), houve semanalmente a inoculação, 75 ml de volume de suspensão de 4×10^8 células mL^{-1} de cultura com *B. subtilis* (mensurada por densidade óptica em espectrofotômetro, 540 nm). Todos os peixes foram alimentados com ração comercial (NUTRIPISCIS ® 45% de proteína bruta; 2,6 mm) a uma taxa diária média de 2% do peso da biomassa, três vezes ao dia (8h, 12h e 16h), durante 62 dias. Foi realizada uma biometria mensal, para acompanhamento do crescimento e ajuste do fornecimento de ração.

Figura 1: Unidades Experimentais

4.3. Qualidade de água

Ao longo do experimento os parâmetros de qualidade de água como, oxigênio dissolvido, temperatura e pH, foram monitorados diariamente, 30 minutos após a primeira alimentação, utilizando sonda multiparâmetro – PRO ODO (YSI ®). Os níveis de amônia, nitrito, nitrato foram monitorados duas vezes por semana, concentrações de gás carbônico, alcalinidade e dureza foram determinadas semanalmente, utilizando *kits* colorimétricos e titulométricos (Alfakit AT 101, Alfakit, Florianópolis, SC, Brasil). As coletas para a análise de água eram feitas antes das limpezas das unidades experimentais AC e AC+BS, para registrar o momento provável de maior acúmulo de compostos nitrogenados. Para determinação dos sólidos sedimentáveis, foram utilizados cones graduados do tipo Imhooff, onde foi colocado 1 L de água de cada unidade experimental que possuía a tecnologia de BFT, e após 45 minutos, era aferido o valor do floco decantado (AVNIMELECH, 2007). Nas unidades experimentais dos tratamentos com a utilização da tecnologia de bioflocos, foi aplicado bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) quando o pH se encontrava abaixo de 6, para restabelecer o pH 7. Nas unidades experimentais dos tratamentos AC e AC+BS, houve limpeza por sifonagem, sempre antes da segunda alimentação, para retirada das fezes e restos de ração do fundo dos tanques e renovação diária de 50% do volume total, com água proveniente de poço artesiano.

4.4. Coletas e amostras

Previamente ao início do experimento, foi feita uma coleta de 15 tambaquis do lote destinado à realização do estudo. Os peixes foram anestesiados (Benzocaína 100 mg L^{-1}) e em seguida medidos e pesados para anotação de seus dados biométricos. Estes peixes foram eutanasiados por secção medular, e posteriormente congelados e encaminhados para análise de composição centesimal. Os dados obtidos serviram como amostra de caracterização do lote, referente à retenção proteica.

Ao término do experimento, após a anestesia (Benzocaína 100 mg L^{-1}) e biometria, seis peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados por secção da medula espinhal. Dois peixes foram enviados ao laboratório de microbiologia da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, para identificação do *B. subtilis* presente no intestino por meio de testes bioquímicos, dois peixes foram utilizados para aferição de variáveis biométricas das vísceras, dois peixes de cada unidade foram congelados, moídos e secos em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 55 °C, por 24h. Houve uma coleta do filtrado de 50 litros de cada unidade contendo bioflocos, com uma fina malha (120 micras), que foi igualmente seco em estufa, para análise da composição centesimal (AOAC, 2010).

4.5. Dados de desempenho zootécnico

Os dados obtidos das biometrias serviram de base para o cálculo dos parâmetros:

Ganho de Peso – GP (g) = peso final – peso inicial;

Conversão Alimentar Aparente – C.A.A = consumo de ração/ganho de peso;

Eficiência Alimentar – EA = ganho em peso/alimento consumido;

Taxa de Crescimento Relativo – TCR = [(ln Peso final – ln peso inicial)/ n° de dias] x 100;

Sobrevivência – SOB (%) = 100 x (número de peixes final/número de peixes inicial).

Fator de Condição – K = 100 x (peso corporal/comprimento $total^3$);

Taxa de Retenção Proteica – TRP = 100 x [(proteína corporal final x peso final) – (proteína corporal inicial x peso inicial)]/consumo em proteína na matéria seca.

4.6. Valores biométricos

Os valores dos pesos do fígado, baço e da gordura foram utilizados para obtenção dos índices:

Índice Hepato-Somático = (peso do fígado ÷ peso do peixe) x 100;

Índice Esplênico-Somático = (peso do baço ÷ peso do peixe) x 100;

Índice Gordura Víscero-Somática = (peso da gordura ÷ peso do peixe) x 100.

4.7. Análises microbiológicas

4.7.1. Isolamento e identificação das bactérias no tambaqui

Foi realizado o isolamento das enterobactérias contidas no trato gastrointestinal do tambaqui. Ao final do experimento dez animais de cada tratamento foram encaminhados para o laboratório de microbiologia da FIOCRUZ. Na capela de fluxo laminar, os animais foram eutanasiados, eviscerados, e a abertura do intestino foi realizada com lâminas de bisturi para o raspado do material contido no intestino do peixe.

O conteúdo de 1 g foi transferido para tubo de ensaio contendo 3mL de caldo BHI (Broth Heart Infusion) e incubado em estufa a 37^{o}C *overnight*. Passado este período, o crescido foi inoculado em placas seletivas de ágar MacConkey (MC), ágar *Pseudomonas* Isolation (PIA), ágar *Shigella* e *Samonella* (SS). Ao surgirem as unidades formadoras de colônias, foram quantificadas e as que morfologicamente diferiram foram separadas para identificação bioquímica.

Para identificação bioquímica foram realizados testes bioquímicos para enterobactérias da galeria MIli, EPM e citrato: descarboxilação da lisina, motilidade, produção de indol, fermentação de açúcares, produção de urease, de H_2S e utilização de citrato (ANVISA, 2004).

Para a identificação, os resultados foram inseridos na plataforma Online ABBIS disponível em http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html.

4.7.2. Identificação de *Bacillus subtilis*

Para a identificação de *B. subtilis* o conteúdo crescido em 3mL de caldo BHI, foi inoculado em placas ágar Sangue (AS). Ao surgirem as unidades formadoras de colônias, foi analisada a presença de formação de colônias com característica de hemólise. As amostras positivas foram inoculadas em meio bioquímico MILi para verificação de motilidade.
Para a identificação, os resultados foram inseridos na plataforma Online ABBIS disponível em http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html.

4.8. Análises estatísticas

A distribuição dos peixes foi em desenho experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial 2 x 2 (2 = sem e com BFT; 2= sem e com *B. subtilis*) e 5 repetições. Dados de desempenho zootécnico, índices biométricos, composição centesimal e variável de qualidade de água, foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homocedasticidade de Bartlett, em nível de significância de 5%. Aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA Two-way), quando a interação entre os fatores foi significativa, foram feitos desdobramentos e as médias comparadas por teste de Tukey ($P < 0,05$). Para os dados referentes a composição centesimal do biofloco, utilizou-se os testes de Mann-Whitney e t de Student ($P<0,05$). O programa estatístico utilizado foi o Statistica 10.0.

5. RESULTADOS

5.1 Desempenho zootécnico

O ganho em peso médio final dos juvenis de tambaqui criados em sistema com BFT foram superiores ao dos tratamentos em AC, com destaque para o tratamento sem a adição do *B. subtilis*, que apresentou a maior média, 33,57 g ± 4,08 (Gráfico 1 A). Os tratamentos em água clara não diferiram entre si, e não houve efeito significativo do *B. subtilis* no sistema (Tabela 1).

Tabela 1: Desempenho zootécnico (média ± desvio-padrão) de juvenis de tambaqui mantidos em diferentes sistemas de criação

Análise	Sistema	*Bacillus subtilis*		Média	P Valor		
		Presente	Ausente		*B.subtilis*	Sistema	*B.subtilis**Sistema
GP (g)	AC	19,97 ± 5,42	20,24 ± 4,02	20,10 ± 1,42B	0,490	<0,001	0,572
	BFT	30,96 ± 4,57	33,57 ± 4,08	32,26 ± 1,36A			
	MÉDIA	26,90 ± 2,53a	25,47 ± 2,36a				
GPD (g)	AC	0,32 ± 0,09	0,33 ± 0,07	0,32 ± 0,02B	0,482	<0,001	0,557
	BFT	0,50 ± 0,07	0,54 ± 0,07	0,52 ± 0,02A			
	MÉDIA	0,43 ± 0,04a	0,41 ± 0,04a	.			
CAA	AC	1,06 ± 0,18	0,84 ± 0,40	0,95 ± 0,10A	0,159	0,076	0,532
	BFT	0,80 ± 0,10	0,71 ± 0,08	0,75 ± 0,04A			
	MÉDIA	0,78 ± 0,09a	0,93 ± 0,06a				
TCR (%)	AC	4,78 ± 0,36	4,83 ± 0,24	371,09 ± 3,36B	0,529	<0,001	0,748
	BFT	5,52 ± 0,18	5,66 ± 0,17	396,42 ± 2,61A			
	MÉDIA	385,19 ± 5,17a	382,33 ± 5,16a				
K	AC	2,20 ± 0,12	2,10 ± 0,08	2,15 ± 0,03B	0,06	0,016	0,849
	BFT	2,30 ± 0,09	2,22 ± 0,07	2,26 ± 0,03A			
	MÉDIA	2,16 ± 0,03a	2,25 ± 0,04a				
SOB (%)	AC	96,00 ± 4,18	95,00 ± 7,07	95,50 ± 1,74A	0,214	0,989	0,401
	BFT	98,00 ± 2.74	93,00 ± 5,70	95,50 ± 1,57A			
	MÉDIA	94,00 ± 1,94a	97,00 ± 1,11a				

Ganho em peso (GP), ganho em peso diário (GPD), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento relativo (TCR), fator de condição (K) e sobrevivência (SOB) de juvenis de tambaqui . Letras minúsculas em linha ou maiúsculas em coluna, respectivamente diferem pelo teste de Tukey (P<0,05) ANOVA Bifatorial e teste de Tukey.

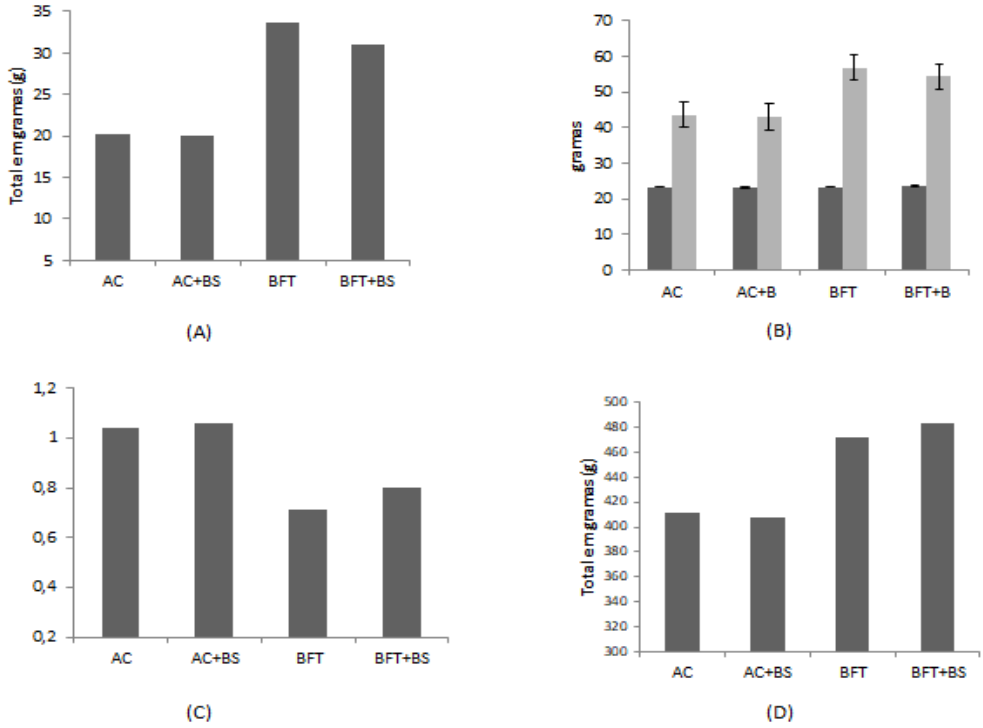

Gráfico 1: (A) Ganho em peso médio dos tambaquis aos 62 dias de experimento; (B) Peso médio dos tambaquis no início e ao término do experimento; (C) Valores referentes à conversão alimentar do tambaqui aos 62 dias de experimento; (D) Consumo total em gramas de ração pelos tambaquis aos 62 dias de experimento.

Os valores das médias para conversão alimentar aparente não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (Gráfico 1 C). Considerando a taxa de crescimento relativo, houve efeito do sistema BFT sobre os juvenis de tambaqui, promovendo assim as maiores médias, 5,66 e 5,52 % para os tratamentos BFT e BFT+BS, respectivamente. Os melhores valores para fator de condição foram observados nos peixes do tratamento BFT, porém não houve efeito da inclusão de *B. subtilis* nos dois sistemas de criação. As médias para fator de condição nos tambaquis dos tratamentos BFT e AC+BS não diferiram estatisticamente entre si. Os valores médios para a sobrevivência, não diferenciaram estatisticamente entre os tratamentos, apresentando sobrevivência média durante o experimento de 95,5%.

5.2 Índices biométricos

Não houve diferença estatística para os índices víscero - somáticos, esplênico – somático e gordura víscero-somática (Tabela 2).

Tabela 2: Índices biométricos (média ± desvio-padrão) de juvenis de tambaqui mantidos em diferentes sistemas de criação.

Análise	Sistema	*Bacillus subtilis*		Média	P Valor		
		Presente	Ausente		*Bacillus*	Sistema	*Bacillus**Sistema
I VISC – S (%)	AC	6,94 ± 4,61	6,03 ± 1,02	6,51 ± 3,36A	0,184	0,641	0,663
	BFT	7,83 ± 3,76	6,06 ± 0,60	6,95 ± 2,77A			
	MÉDIA	7,38 ± 4,12a	6,05 ± 0,81a				
RHS (%)	AC	1,39 ± 0,27	1,84 ± 0,49	1,60 ± 0,44B	0,317	0,002	0,049
	BFT	2,16 ± 0,64	2,01 ± 0,34	2,09 ± 0,50A			
	MÉDIA	1,77 ± 0,62a	1,93 ± 0,42a				
RSS (%)	AC	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,03A	0,202	0,698	0,557
	BFT	0,07 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,04A			
	MÉDIA	0,06 ± 0,05a	0,04 ± 0,02a				
RVGV (%)	AC	0,37 ± 0,20	0,43 ± 0,18	0,40 ± 0,18A	0,793	0,582	0,885
	BFT	0,40 ± 0,28	0,44 ± 0,21	0,43 ± 0,22A			
	MÉDIA	0,38 ± 0,22a	0,44 ± 0,19a				

Índice víscero-somático (I VISC-S), índice hepato-somático (RHS), índice-esplênico-somático (RSS), índice gordura víscero-somática (RVGV). Letras minúsculas em linha ou maiúsculas em coluna, respectivamente diferem entre os tratamentos (P < 0,05) ANOVA Bifatorial e teste de Tukey.para N desigual.

Apenas na resposta sobre o índice hepato-somático observou-se efeito do sistema, sem apresentar diferença em relação à adição de *B. subtilis*, apesar de os tratamentos do sistema BFT com a adição de *Bacillus* terem apresentado média de maior valor, 2,16±0,64.

5.3 Composição centesimal

Não houve diferença significativa na composição centesimal dos tambaquis em nenhuma variável analisada. Porém os peixes do tratamento BFT + BS, apresentaram um maior percentual de proteína corporal (Tabela 3).

Tabela 3: Composição centesimal (média ± desvio-padrão) de juvenis de tambaqui (peixe inteiro) mantidos em diferentes sistemas de criação.

Análise	Sistema	*Bacillus subtilis*		Média	P Valor		
		Presente	Ausente		*Bacillus*	Sistema	*Bacillus**Sistema
MS (%)	AC	89,64 ± 0,49	88,97 ± 0,95	89,31 ± 0,80A	0,252	0,192	0,854
	BFT	88,29 ± 0,64	87,80 ± 1,78	88,04 ± 1,29A			
	MÉDIA	88,96 ± 0,89a	88,38 ± 1,48a				
UM (%)	AC	10,36 ± 0,49	11,03 ± 0,95	10,69 ± 0,80A	0,252	0,192	0,854
	BFT	11,71 ± 0,64	12,20 ± 1,78	11,96 ± 1,29A			
	MÉDIA	11,04 ± 0,89a	11,62 ± 1,48a				
PT (%)	AC	49,22 ± 1,90	50,95 ± 0,82	50,09 ± 1,65A	0,235	0,541	0,090
	BFT	51,57 ± 2,88	47,34 ± 2,82	49,45 ± 3,49A			
	MÉDIA	50,40 ± 2,61a	49,14 ± 2,73a				
LP (%)	AC	24,35 ± 1,66	21,96 ± 3,10	23,16 ± 2,66A	0,08	0,812	0,742
	BFT	23,72 ± 3,03	22,07 ± 1,54	22,89 ± 2,42A			
	MÉDIA	24,03 ± 2,33a	22,02 ± 2,31a				

Matéria seca (MS), umidade (UM), proteína (PT), lipídio (LP). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas em linha ou maiúsculas em coluna, respectivamente diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na composição centesimal dos bioflocos, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 4: Composição centesimal (média ± desvio-padrão) dos bioflocos com e sem a adição de *Bacillus subtilis* em sistemas de criação de juvenis de tambaqui.

Sistema	Matéria Seca* (%)	Umidade* (%)	Proteína** (%)	Lipídios* (%)
BFT	90,30 ± 0,16	9,70 ±0,16	31,36 ±1,40	0,22 ±0,07
BFT+BS	89,68 ± 0,76	10,32 ±0,76	32,41 ±0,80	0,44 ±0,29
Valor de P	0,210	0,210	0,183	0,174

Os dados em valores percentuais foram transformados pelo arco seno da sua raiz quadrada antes da análise estatística. Os tratamentos foram comparados pelos testes de Mann-Whitney* e t de Student* (P<0,05).

5.4 Qualidade de água

As concentrações de nitrogênio da amônia, do nitrito e do nitrato, foram registradas diferenças significativas entre os sistemas de criação. As maiores concentrações de amônia na água foram registradas nos tratamentos AC e AC+ BS, com médias superiores a 1,93 mg L^{-1}, contrastando com o sistema BFT que apresentou as menores concentrações, inferiores a 0,34 mg L^{-1}, destacando -se o tratamento com a inclusão de *B. subtilis* que expôs média de 0,28 mg L^{-1} ± 0,04 (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis (média ± desvio-padrão) da qualidade de água em diferentes sistemas de criação de tambaqui (*Colossoma macropomum).*

Análise	Sistema	*Bacillus subtilis*		Média	P Valor		
		Presente	Ausente		*Bacillus*	Sistema	*Bacillus**Sistema
Amônia (mg L^{-1})	AC	1,93±0,16	1,98 ±0,20	1,96 ± 0,18ª	0,357	<0,001	0,959
	BFT	0,28 ±0,04	0,34 ±0,11	0,31 ± 0,08B			
	MÉDIA	1,10 ± 0,88a	1,16 ± 0,88a				
Nitrito (mg L^{-1})	AC	0,86 ±0,13Aa	0,59 ±0,20Ab	0,73 ± 0,21	0,224	0,194	0,036
	BFT	0,60 ±0,11Ab	0,67 ±0,10Ab	0,63 ± 0,15			
	MÉDIA	0,73 ± 0,06	0,63 ± 0,06				
Nitrato (mg L^{-1})	AC	3,28 ±0,25	2,60 ±0,67	2,94 ± 0,60B	0,056	<0,001	0,1514
	BFT	5,19 ±0,35	5,09 ±0,29	5,14 ± 0,31ª			
	MÉDIA	4,23 ± 0,14a	3,84 ± 0,14a				
Gás Carbônico (mg L^{-1})	AC	7,93 ±1,94	6,50 ±1,19	7,22 ± 0,87B	0,328	<0,001	0,908
	BFT	26,20±4,80	25,07 ±1,89	25,63 ± 0,85ª			
	MÉDIA	17,07 ± 0,85a	15,78 ± 0,88a				
Alcalinidade (mg L^{-1})	AC	6,13 ±0,74Bb	6,67 ±1,31Ba	6,40 ± 0,73	0,016	<0,001	0,004
	BFT	16,33 ±3,32Aa	11,13 ±1,32Ab	13,73 ± 0,77			
	MÉDIA	11,23 ± 0,77	8,90 ± 0,77				
Dureza (mg L^{-1})	AC	7,31 ±1,04Ba	8,51 ±1,42Ba	7,91 ± 1,33	1,00	<0,001	0,020
	BFT	114,80 ±0,43Aa	113,59 ±1,06Aa	114,20 ± 0,99			
	MÉDIA	61,05 ± 0,38	61,05 ± 0,38				
Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})	AC	6,01 ±0,02	6,02 ±0,03	7,22 ± 1,69ª	0,995	0,422	0,419
	BFT	6,01 ±0,04	6,00 ±0,03	25,63 ± 3,53ª			
	MÉDIA	6,01 ± 0,01a	6,01 ± 0,01a				
pH	AC	6,72 ± 0,11Aa	6,97± 0,07Aa	6,84 ± 0,05	0,132	<0,001	0,004
	BFT	6,41 ± 0,18Ba	6,32± 0,06Ba	6,37 ± 0,06			
	MÉDIA	6,65 ± 0,07	6,56 ± 0,05				
Temperatura (°C)	AC	26,09 ±0,04	25,97 ±0,02	26,03 ± 0,01ª	<0,001	<0,001	0,343
	BFT	25,86 ±0,05	25,78 ±0,03	25,82 ± 0,01B			
	MÉDIA	25,98± 0,03a	25,87 ± 0,02b				

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas em linha ou maiúsculas em coluna, respectivamente indicam diferenças entre os tratamentos (P < 0,05) ANOVA Bifatorial e teste de Tukey.

As concentrações de nitrito foram distintas no tratamento AC+BS, exibindo média de 0,86 mg L^{-1} ± 0,13, paralelos aos dois tratamentos com o BFT (BFT e BFT+BS) que não diferiram entre si e apresentaram 0,67 e 0,60 mg L^{-1}, respectivamente. O tratamento AC, apresentou menor média de concentração de nitrito, com média de 0,59 mg L^{-1} ± 0,20.

Níveis de nitrato foram encontrados em maior concentração nos tratamentos com BFT (BFT e BFT+BS) que não diferiram entre si, e marcaram médias de 5,09 e 5,19 mg L^{-1}, respectivamente. A menor concentração de nitrito foi registrada no tratamento AC, 2,60 mg L^{-1} ± 0,67. Os valores para a concentração de gás carbônico - CO_2 diferenciaram-se entre os sistemas, porém a inclusão do *B.subtilis* não causou alteração em seus níveis. Nos tratamentos AC e AC+BS as médias encontradas foram 6,50 e 7,93 mg L^{-1}, e nos tratamentos BFT e BFT+BS, registrou-se níveis de 25,07 e 26,20 mg L^{-1}, evidenciando a maior concentração de CO_2 nas unidades em que foi incluído o *B. subtilis*.

Nos níveis de alcalinidade, o maior valor médio foi registrado no tratamento BFT+BS (16,33 mg L^{-1} ± 3,32), diferindo significativamente do tratamento BFT, 11,13 mg L^{-1} ±1,32 (Gráfico 2). Entre os tratamentos de AC e AC+BS, não houve diferença significativa, exibindo níveis médios de sais de carbonato e bicarbonato inferiores a 6,67 mg L^{-1}. Os valores para a dureza marcaram médias para as unidades de AC entre 7,5 e 11,0 mg L^{-1}, e nas unidade de AC+BS médias entre 5,5 e 8,0 mg L^{-1} , não registrando diferença significativa entre estes tratamentos. Por outro lado, as águas dos tratamentos BFT e BFT+BS, apresentaram uma maior concentração de sais de cálcio e magnésio, exibindo valores médios de 113,59 e 114,80 mg L^{-1}, respectivamente.

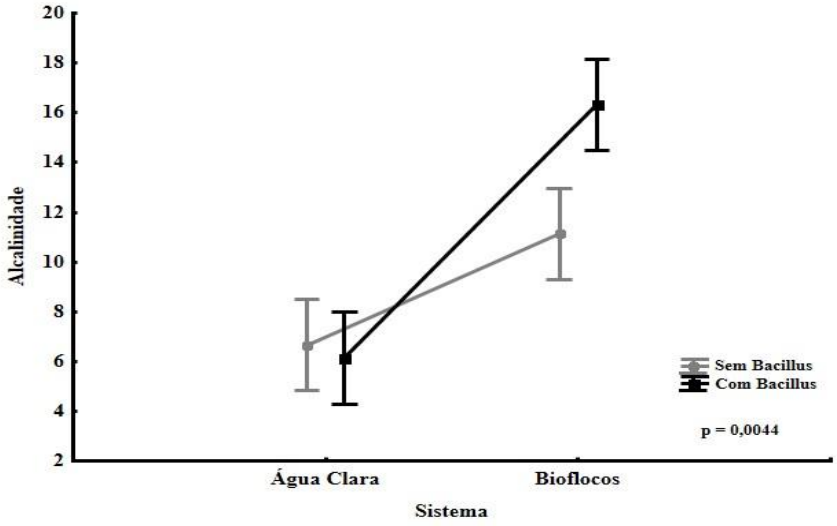

Gráfico 2: Alcalinidade média registrada durante os 62 dias de experimento nos sistemas de criação de juvenis de tambaqui.

Não foram encontradas diferenças significativas na variável oxigênio dissolvido na água ($P \geq 0,05$), que manteve uma média 6,01 mg L^{-1}. Porém, dentre as variáveis aferidas diariamente, durante os 62 dias de experimento, a temperatura e o pH apresentaram diferença estatística. O maior valor médio de pH na água, foi observado no tratamento do sistema AC (pH 6,97), diferindo do tratamento com a inclusão de *B. subtilis* (pH 6,72). Nos tratamentos do sistema BFT, o pH foi inferior e não apresentou diferença estatística sobre a inclusão de *B. subtilis* (pH 6,32 e 6,41, respectivamente). Apesar de apresentar diferença estatística entre os tratamentos, a média da temperatura foi de 25,93°C na maior parte do experimento, não apresentando grandes variações. O tratamento composto pelo sistema de água clara acrescida do *B. subtilis*, apresentou temperaturas mais elevadas na água, com média de 26,09 °C, e o tratamento BFT as temperaturas mais baixas, com média de 25,78 °C.

O volume do floco decantado que representa a concentração de sólidos suspensos dos tratamentos BFT e BFT+BS, foi aferido por meio de cones Imhoff, e não apresentou diferenciação estatística entre os tratamentos. Durante o experimento a concentração de sólidos no tratamento com o uso do sistema BFT, teve média de 8,1 mL L^{-1} e o tratamento com a inclusão de *B. subtilis*, média de 9,3 mL L^{-1} (Gráfico 3).

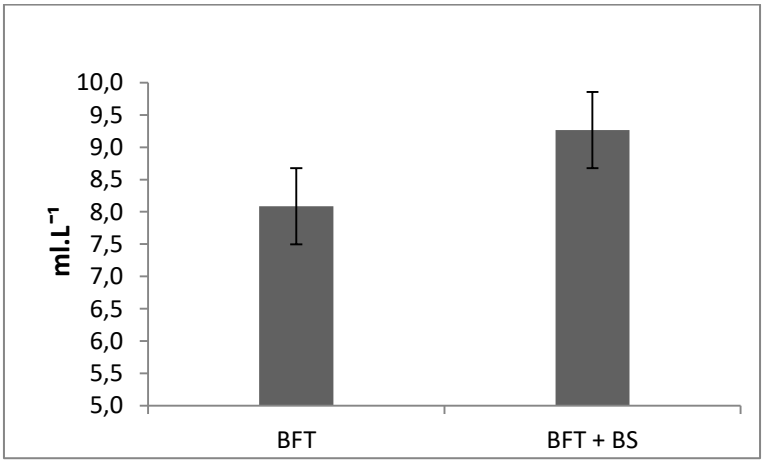

Gráfico3: Concentração média de sólidos suspensos, nos dois tratamentos com a utilização de BFT, durante os 62 dias de experimento.

5.5 Análise microbiológica

Do total de intestinos de tambaqui analisados, foram identificadas 15 espécies de bactérias (Quadro 1), com destaque para as enterobactérias, identificadas pelo crescimento em ágar MC, ágar SS, ágar PI e provas bioquímicas EPM, MiLi, Citrato, Arginina e Ornitina.

Quatro bactérias isoladas ocorreram no intestino dos peixes de todos os tratamentos, que são: *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp. e *B. subtilis. Bacillus subtilis* foi identificado no intestino do tambaqui de uma das unidades experimentais de água clara.

Quadro 1. Espécies bacterianas identificadas nos isolados de intestino de tambaqui. O número entre parênteses corresponde ao total de isolados encontrados (ocorrência) nos tratamentos.

Espécies isoladas no intestino do tambaqui			
Água Clara	**Água Clara + *Bacillus subtilis***	**Bioflocos**	**Bioflocos + *Bacillus subtilis***
Citrobacter (2)	*Citrobacter*	*Citrobacter* (2)	*Citrobacter*
Brenneria nigrefluens	*E. coli* (2)	*B.nigrefluens*	*Klebsiella*
Klebsiella (2)	*Proteus* (2)	*Klebsiella*	*E. coli* (2)
Escherichia coli (3)	*Salmonella*	*E. coli*	*Shigella (2)*
Shigella (2)	*B. subtilis* (2)	*Pseudomonas*	*Pseudomonas* (2)
Pseudomonas (2)	*Enterobacter*	*Proteus*	*Proteus* (2)
		Salmonella	
Proteus	*Providencia*		*B. subtilis* (2)
Salmonella (2)	*Moganella*	*B. subtilis* (2)	*Edwarsiella*
Bacillus subtilis		*Enterobacter*	
		Yersinia	
		E. vulneris	

6. DISCUSSÃO

Ambos os sistemas, com ou sem *B. subitilis,* apresentaram boas condições para desenvolvimento da espécie, haja vista a alta sobrevivência dos peixes e o consumo das rações. O reflexo do maior ganho em peso dos peixes nos tratamentos com a utilização da tecnologia de bioflocos pode ser esclarecido pelo fato do tambaqui ser uma espécie com habilidade em filtrar a água (CAMPOS et al., 2015), o que permitiu aproveitar os bioflocos em suspensão 24 horas por dia ao longo de todo o experimento (AVNIMELECH, 2007).

Os bioflocos são fonte adicional de nutrientes e possuíam em média 31,9% de proteína bruta, esse valor foi similar ao encontrado nos bioflocos constatados em outros estudos (WASIELESKY et al., 2006; AZIM ; LITTLE, 2008; EMERENCIANO et al., 2011), em que se observou melhor desempenho em camarões (*Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus vannamei*) e tilápias, espécies com grande capacidade filtradora. O conteúdo proteico do biofloco colaborou para melhor desempenho zootécnico, porém, sem alterar significamente a composição centesimal do peixe.

Os resultados favoráveis sobre o ganho em peso e o fator de condição dos peixes estão intimamente ligados ao fato do sistema com a tecnologia BFT possuir a água escura devido aos sólidos em suspensão. Isso promoveu ao tambaqui um ambiente com fotoperíodo constante e proporcionou melhor bem-estar, pois simulou um ambiente mais parecido ao natural. Tambaquis que são mantidos sob iluminação contínua, apresentam sinais de estresse e revelam desempenho inferior, quando comparados aos que são mantidos em total escuridão (ARIDE *et al*., 2006).

A inclusão de *B. subtilis* nos sistemas de criação não promoveu melhor desempenho zootécnico em tambaquis, pois a assimilação da bactéria pelo peixe provavelmente foi dificultada por ter sido adicionada na água. Outro fato a se considerar, é o tempo experimental, pois respostas positivas quanto ao desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com rações suplementadas com *B. subtilis* só foram efetivas após 120 dias de experimento (HAROUM et al., 2006; CARVALHO et al., 2011). Além disso, o uso de *B. Subtilis* pode ser mais eficaz em fases iniciais, como demonstrado em melhores resultados nodesempenho de larvas do que de juvenis de truta arco-íris (MERRIFIELD et al. 2009).

Ainda que os resultados de desempenho zootécnico sejam divergentes na literatura no que se refere à inclusão de *B. subtilis* na água de organismos aquáticos, os animais que são criados em boas condições, sejam nutricionais ou sanitárias, podem não apresentar respostas

positivas de desempenho com a inclusão de probióticos, pois estão sob menor contato com microrganismos patogênicos, diminuindo assim o efeito do probiótico (LODDI et al., 2000).

O índice hepato-somático dos peixes nos tratamentos do sistema BFT, foram maiores que os dos tambaquis criados em viveiros (FIM et al., 2008), logo, é possível observar que o sistema BFT, por ter como característica os flocos suspensos, promoveu uma melhor condição para armazenamento de energia, refletida no estado biométrico hepático. Os peixes podem estocar grande quantidade de energia no fígado e este é o principal sítio de armazenamento de glicogênio no tambaqui (SAINT-PAUL, 1984; GERMAM ; KOZLOVSKAYA, 2001).

As concentrações de oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água, mantiveram-se dentro da faixa considerada ideal para a recria de juvenis de tambaqui (CAVERO et al., 2009) durante o período experimental. Apesar da temperatura ter apresentado diferença entre todos os tratamentos, a variação foi menor que 0,3 °C.

Apesar do pH mínimo, 6,32, registrado nas águas do tratamento BFT, encontrar-se dentro do intervalo aceitável para a criação de tambaquis, este estava abaixo do recomendado para o desenvolvimento de microrganismos que é pH 7 (BOYD et al., 2011). Baixos valores de pH em sistemas de bioflocos, podem proceder da respiração dos microrganismos existentes no sistema (WASIELESKY et al., 2006), e aumento do gás carbônico dissolvido (BOYD et al., 2011). A maior concentração de gás carbônico nos tratamentos dos sistemas BFT e BFT+BS, é resultado dos processos de respiração realizada pelos peixes e microrganismos e também da decomposição da matéria orgânica, liberando CO_2 (VAN WYK ; SCARPA, 1999).

Alterações em níveis de pH e alcalinidade podem ocorrer devido ao consumo de carbono inorgânico feito por bactérias heterotróficas e nitrificantes, que consomem em média 7,07 gramas de alcalinidade para cada grama de nitrogênio amoniacal total oxidado a nitrato (EBELING et al., 2006). Nas condições experimentais, este estudo comprovou ser possível a formação de bioflocos durante a criação de tambaquis sem renovação de água em níveis de alcalinidade menores que 16 mg L^{-1} .

A baixa concentração de alcalinidade na água, não favoreceu a manutenção da biomassa bacteriana em nenhum dos sistemas de criação. Apesar das adições de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o nível de alcalinidade ideal não foi alcançado, pois este deveria ser o mais elevado possível, para o melhor equilíbrio da população microbiana nos sistemas de bioflocos (FURTADO et al., 2014). Porém, níveis menores de alcalinidade em sistema de bioflocos não afetaram a formação do floco, a sobrevivência e o crescimento de peixes de

água doce, como a tilápia, em 61,75 mg L^{-1} (KUBITZA, 2011), e o tambaqui em 8,27 mg L^{-1} (DANTAS et al., 2015) .

A tecnologia de bioflocos proporcionou maiores valores de dureza que se mantiveram dentro da variação ideal (40-120 mg L^{-1}) para a criação de juvenis de tambaqui (CAVERO et al., 2009). A dureza total da água é representada pela soma dos cátions divalentes, porém o Ca^{+2} é o que possui maior afinidade de ligação nos bioflocos (LUO et al., 2013). Assim, acréscimo dos níveis de Ca^{+2} pode inferir à estrutura e/ou composição dos bioflocos, promovendo maior densidade e menor tamanho (LUO et al., 2013). Os níveis elevados da dureza na água no BFT e BFT+BS estão relacionados ao acúmulo de cálcio e fosfato proveniente da ração e da adição de bicarbonato utilizado para correção do pH (POLEO et al., 2011). Níveis mais baixos de dureza encontrados na água dos tratamentos AC e AC+BS, são explicados pelo fato de a água dos sistemas serem provenientes de poço artesiano.

O volume do floco decantado nas unidades do sistema BFT permaneceu dentro do índice adequado de até 10 ml L^{-1} para o sistema (SAMOCHA et al., 2007). Esse nível foi suficiente para metabolizar a concentração de amônia, que foi registrada em concentrações dentro da faixa desejável para a criação de juvenis de tambaqui (< 0,5 mg L^{-1}) (CAVERO et al., 2009). Por outro lado, AC e AC+BS apresentaram valores superiores de concentração de amônia (> 1,93 mg L^{-1}), devido à baixa troca de água durante o experimento. Esses valores não são indicados para criação da espécie, porém não afetaram a sobrevivência dos peixes.

Os níveis de nitrito na água dos sistemas permaneceram altos em todos os tratamentos em relação ao nível recomendado para a criação de tambaquis (CAVERO et al., 2009), pois provavelmente, bactérias do gênero *Nitrobacter* sp., não foram eficientes na transformação do nitrito em nitrato. O nitrito se torna preocupante em altas concentrações, pois, possui capacidade de oxidar a hemoglobina sanguínea, convertendo-a em uma molécula incapaz de transportar oxigênio (ARANA, 2004).

O nitrato oriundo do nitrito, oxidado pelas bactérias nitrificantes, foi acumulado nas águas dos sistemas BFT e BFT+BS. Para peixes de água doce, ainda é muito rara a toxicidade por nitrato, somente em altas concentrações. Em criações de organismos marinhos recomenda-se que se mantenham concentrações abaixo de 500 mg L^{-1} (COLT, 2006).

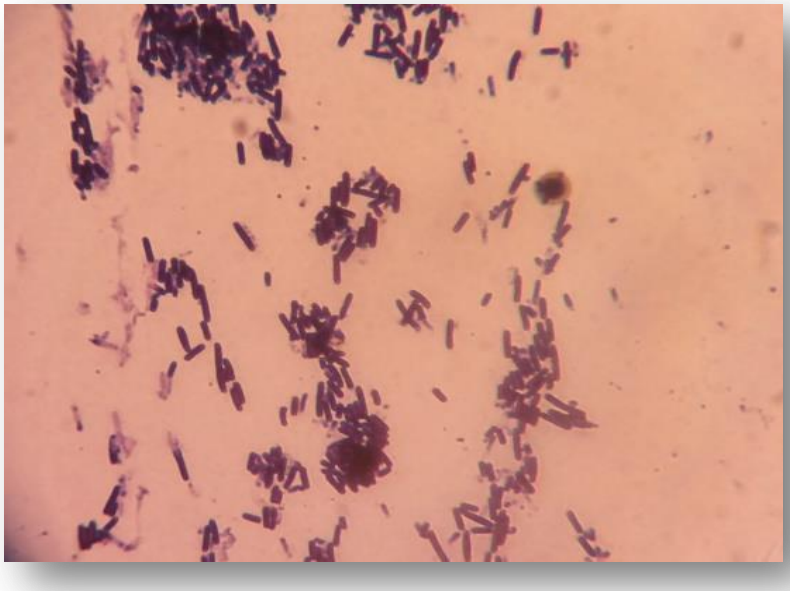

Figura 2: *Bacillus subtilis* - Coloração de Gram – Aumento 100X
Fonte: (Castro, 2018)

Referente à identificação das bactérias, muitas das presentes no intestino não são cultiváveis *in vitro* (HUBER et al., 2004), e existe grande dificuldade em analisar a microbiota do intestino de peixes de uma forma geral, pois há uma variação individual (SPANGGAARD et al., 2000), principalmente em relação ao ambiente e à alimentação.

As bactérias identificadas nos intestinos dos peixes formam em sua maioria a microbiota natural de diferentes ambientes. Os peixes do sistema com a tecnologia de bioflocos apresentaram uma maior variedade de bactérias presentes no intestino, provavelmente pela presença dos flocos microbianos, e por estes comporem a sua dieta. A adição de probióticos à dieta estimula o crescimento e a estabilidade de populações bacterianas, que reduzem o pH do lúmem, por produzirem ácidos orgânicos, e inibem o crescimento de bactérias nocivas (RADECKI & YOKOYAMA, 1991). A melhora no ambiente intestinal, tem como resultado o favorecimento da saúde e do desempenho em peixes (RINGO *et al.*, 2010).

Apesar da presença de bactérias patogênicas como *Shigella* sp. no tratamento BFT+BS, não houve interferência no desempenho dos peixes em comparação ao tratamento BFT. Mais pesquisas são necessárias para identificar de uma melhor forma a microbiota intestinal dos peixes, pois os meios de cultura podem ser deficitários quanto à sua exigência nutricional, e técnicas bacteriológicas de cultivo com moleculares, são um meio para estudo mais completo da população existente (POND et al., 2006).

7. CONCLUSÃO

O uso do *B. subtilis* na criação de tambaqui mostrou relevância quanto ao fator de condição dos peixes mantidos no sistema principalmente quando empregada à tecnologia de bioflocos. A pesquisa sobre probióticos na aquicultura ainda é muito escassa, e possivelmente estudos com a utilização de ácidos orgânicos, produto da fermentação das bactérias, torna-se interessante neste momento para um real efeito sobre a criação de uma forma geral.

A utilização da tecnologia de bioflocos promoveu maior produção, economia de 61.850 litros de água e como resultado menor volume de efluentes em 62 dias de experimento. Sobre o acúmulo de alguns compostos nitrogenados como o nitrato, pode-se sugerir para um melhor aproveitamento, a associação com cultivo de plantas capazes de utilizar tais compostos (sistemas aquapônicos).

8. REFERÊNCIAS

ADEOYE, A. A. et al., Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. **Aquaculture,** *463*, 61-70. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de detecção e identificação: bactérias de importância médica. Brasília, Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf 2004.

AOAC. Official Methods of Analysis of the AOAC. 18 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2010.

ARANA, L.V. **Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aquicultura: uma Revisão para Peixes e Camarões.** 2ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

ARIDE, P. H. R.; et al. Tambaqui growth and survival when exposed to different photoperiods, **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 381-384, 2006.

AVNIMELECH, Y. Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture,** v. 176, p. 227-2351, 1999.

AVNIMELECH, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. **Aquaculture,** v.264: p. 140-147. 2007.

AZIM, M. E.; LITTLE, D. C.. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 29-35, 2008.

BOYD, C. E.; TUCKER C. S. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Pub., Boston, Massachusetts, USA. 1998.

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S.; VIRIYATUM, R. Interpretation of pH, acidity, and alkalinity in aquaculture and fisheries. **North American Journal of Aquaculture**, v. 73, p. 403-408. 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. ANFAR/CBNA/SDR, 1998.

BUTKOVSKYI, A. **Leachate treatment at filborna landfill with focus on nitrogen removal**. Master's Thesis, Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden. 2009.

CAMPOS, J.L.; ONO, E.A.; ISTCHUK, P.I. A cadeia de produção e preço do Tambaqui. **Panorama da aquicultura**, v. 25, n. 49, p. 42-45, 2015.

CARVALHO, J.V., et al. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com Bacillus subtilis ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saude e Produção Animal.** v. 12, p. 176–187, 2011.

CAVERO, B. A. S; RUBIM, M. A. L; PEREIRA, T. M. Criação comercial do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá**, v. 1, p. 33-46, 2009.

CEREZUELA, R., GUARDIOLA, F. A., CUESTA, A., & ESTEBAN, M. Á. Enrichment of gilthead seabream (Sparus aurata L.) diet with palm fruit extracts and probiotics: effects on skin mucosal immunity. **Fish & shellfish immunology,** v.49, p.100-109. 2016.

CHAGAS, E. C., de CARVALHO GOMES, L., JÚNIOR, H. M., ROUBACH, R., & de PAULA LOURENÇO, J. N. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação**. Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 8, p. 833-835, 2005.

COLT, J. Water quality requirements for reuse systems. **Aquacultural Engineering**, v. 34, n. 3, p. 143-156, 2006.

CRAB, R., AVNIMELECH, Y., DEFOIRDT, T., BOSSIER, P., & VERSTRAETE, W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**, v. 270, p. 1-4, 2007.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DA SILVA, C.A.; FUJIMOTO, R.Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazônica.** 2015.

DANTAS, N. S. M.; et al., Análise sensorial de tambaqui (Colossoma macropomum) produzido em sistema bioflocos. Projeto de Iniciação Científica. Manaus – Amazonas. 2015.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 346-358, 2006.

EMERENCIANO, M., BALLESTER, E. L., CAVALLI, R. O., & WASIELESKY, W.. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). **Aquaculture Research,** *43*(3), 447-457. 2012.

EMERENCIANO, M., BALLESTER, E. L., CAVALLI, R. O., & WASIELESKY, W. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp Farfantepenaeus paulensis: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. **Aquaculture International**, v.19, n. 5, p.891-901, 2011.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture - Opportunities and challenges, Rome, 2016.

FIM, J. D.I, TAVARESDIAS, M., AFFONSO, E. G., ONO, E. A., & LEMOS, J. L. A. Índices de condição corporal em juvenis de Brycon amazonicus (Spix & Agassiz, 1829) e Colossomoma macropomum (Cuvier, 1818) na Amazônia. 2008.

FROZZA, Amábile. Probiótico na criação de juvenis do camarão de água doce Mcrobrachium rosenbergii (de Man, 1879) em sistema BFT. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. 2017.

FULLER. R. A. Probiotics in man and animals. **Journal of applied bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FURTADO, PS, CAP GAONA, LH POERSCH & W WASIELESKY. Application of diferente doses of calcium hydroxide in the farming shrimp *Litopenaeus vannamei* with the biofloc technology (BFT). **Aquacultulture Internacional**., v. 22: pg. 1009–1023. 2014.

GERMAM, A.V. e KOZLOVSKAYA, V.I. Hepatosomatic index e the biochemical composition of the liver in Abramis brama in the Sheksna Stretch of the Rybinsk reservoir at different levels of toxicant accumulation. **Journal of Ichthyology**, New Yok, v. 41, p.,160-163, 2001

GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.

GRAM, L., MELCHIORSEN, J., SPANGGAARD, B., HUBER, I., & NIELSEN, T. F. . Inhibition of Vibrio anguillarum byPseudomonas fluorescens AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 969-973, 1999.

GUO, X., CHEN, D. D., PENG, K. S., CUI, Z. W., ZHANG, X. J., LI, S., & ZHANG, Y. A. Identification and characterization of Bacillus subtilis from grass carp (Ctenopharynodon idellus) for use as probiotic additives in aquatic feed. **Fish & shellfish immunology**, v. *52*, p. 74-84., 2016.

HAMDY, A. A., ELATTAL, N. A., AMIN, M. A., ALI, A. E., MANSOUR, N. M., AWAD, G. E., ... & ESAWY, M. A. In vivo assessment of possible probiotic properties of Bacillus subtilis and prebiotic properties of levan. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v. *13* n, 190-197. 2018.

HARGREAVES, J.A., Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquaculture Engineering**, v. 34, p. 344-363, 2006.

HAROUM, E.R.; GODA, A.M.; CHOWDHMY, M.A.K. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L**.**). **Aquaculture Research**, v.37, p. 1473-1480, 2006.

HUBER, I., SPANGGAARD, B., APPEL, K. F., ROSSEN, L., NIELSEN, T., & GRAM, L. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p.17-132, 2004.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, v. 43, p.1-39, 2016.

ISMIÑO-ORBE, R. A.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. de C. Excreção de amônia por tambaqui *(Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1243-1247, 2003.

IZEL, A.C.U; MELO, L. A. S. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2004.

KOLIDA, S; GIBSON, G. R. Synbiotics in health and disease. **Annual review of food science and technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

KRUMMENAUER, D., C. A. et al., Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: aná lise da reutilizacxão da água. **Atlantica,** v. 34, p.103–111, 2012.

LEFEVRE, M., RACEDO, S. M., DENAYROLLES, M., RIPERT, G., DESFOUGÈRES, T., LOBACH, A. R., ... & URDACI, M. C. Safety assessment of Bacillus subtilis CU1 for use as a probiotic in humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology,** v. 83, p.54-.65, 2017.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LODDI, M. M., GONZALES, E., TAKITA, T. S., MENDES, A. A., & ROÇA, R. D. O. Effect of the use of probiotic and antibiotic on the performance, yield and carcass quality of broilers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n. 4, p.1124-1131, 2000.

LU, L. et al. The effects of *Bacillus subtilis* on nitrogen recycling from aquaculture solid waste using heterotrophic nitrogen assimilation in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v.124, p.180-185, 2012.

LUO, G, W LIANG, H TAN, C YAO, N ZHANG & L LU. Effects of calcium and magnesium addition on the start-up of sequencing batch reactor using biofloc technology treating solid aquaculture waste. **Aquaculture Engieneering**, v.57, p.32–37, 2013.

MERRIFIELD DL, BRADLEY G, BAKER RTM et al., Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) I. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. **Aquaculture Nutrition** v.16, p. 504–510, 2009.

OTOSHI, C. A., A. D. MONTGOMERY, A. M. LOOK, and S. M. MOSS. Effects of diet and water source on the nursery production of Pacific white shrimp, *L. vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society** v.32, p.243-249, 2001.

PEDROZA FILHO, M. X. ; RODRIGUES, A. P. O; REZENDE, F. P. Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil. **Boletim Ativos da Aquicultura,** ano 2, p. 1-5, 2016.

PÉREZ-FUENTES, J. A. HERNÁNDEZ-VERGARA, M. P., PÉREZ-ROSTRO, C. I., & FOGEL, I. C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia Oreochromis niloticus raised in a biofloc system under high density cultivation. **Aquaculture**, v. 452, p. 247-251, 2016.

POLEO, G., ARANBARRIO, J. V., MENDOZA, L., & ROMERO, O. . Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. **Pesquisa agropecuária brasileira,** Brasília, v.46, n.4, p.429-437, 2011.

POND, M. J.; STONE, D. M.; ALDERMAN, D. J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). **Aquaculture**, v. 261, n. 1, p. 194-203, 2006.

PRIMAVERA, JH. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean & Coastal Management**, v. 49, n. 9-10, p. 531-545, 2006.

RADECKI S.V. & YOKOYAMA M.T. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition, p.439-447. In: Miller E.R., Duane E.U. & Lewis A.J. (Eds), **Swine Nutrition**. Butterworth-Heinemann, Boston. 1991.

RINGO E., LOVMO L., KRISTIANSEN M., SALINAS I., MYKLEBUST R., OLSEN R.E. & MAYHEW T.M. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture**. v.41, p.451-467, 2010.

SAINT-PAUL, U. Investigations on the seasonal changes in the chemical composition ofliver and condition from a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). **Amazoniana** v.9, n.1, p.147-158, 1984.

SAMOCHA, T. M., S. PATNAIK, M. SPEED, A. M. Ali, J. M. BURGER, R. V. ALMEIDA, Z. AYUB, M. HARISANTO, A. HOROWITZ, and D. L. BROCK. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *L. vannamei*. **Aquacultural Engineering** v. 36, p.184-191, 2007.

SEBRAE. Aquicultura no Brasil - Série Estudos Mercadológicos. Disponível em: <http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/. 2015.

SHIH, L ; WU, P-J; SHIEH, C-J. Microbial production of a poly (γ-glutamic acid) derivative by Bacillus subtilis. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2827-2832, 2005.

SINHA AK, BARUAH K, BOSSIER P. Horizon Scanning: the potential use of biofloc as an anti-infective strategy in aquaculture – an overview. **Aquaculture Health International** v.13, p.8-10, 2008.

SPANGGAARD, B., HUBER, I., NIELSEN, J., NIELSEN, T., APPEL, K. F., & GRAM, L. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. **Aquaculture**, v.182, n.1-2, p.1-15, 2000.

TAW, N. Biofloc Technology: Possible prevention for shrimp diseases. **Global Aquaculture Advocate** v.18, n.1, p.36-37, 2015.

TELLI, G. S., RANZANI-PAIVA, M. J. T., DE CARLA DIAS, D., SUSSEl, F. R., ISHIKAWA, C. M., & TACHIBANA, L. Dietary administration of Bacillus subtilis on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia Oreochromis niloticus raised at different stocking densities. **Fish & shellfish immunology,** v.39, n.2, p. 305-311, 2014.

VAN DOAN, H., HOSEINIFAR, S. H., KHANONGNUCH, C., KANPIENGJAI, A., UNBAN, K., & SRICHAIYO, S. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). **Aquaculture**. 2018.

VAN WYK, Peter; SCARPA, John. Water quality requirements and management. **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**, p. 128-138, 1999.

VANBELLE, Marcel; TELLER, E.; FOCANT, Michel. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition,** v. 40, n. 7, p. 543-567, 1990.

VENDRELL, D., BALCAZAR, J. L., de BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., GIRONÉS, O., & MUZQUIZ, J. L. . Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.*31*, n.4, p.337-345, 2008.

WASIELESKY W, ATWOOD H, STOKES A, BROWDY CL. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc-based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** v.258, p.396–403, 2006.

WU, Y.; LI, T.; YANG, L. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 10-18, 2012.

YU J, PLACKETT D, CHEN LXL. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R) -3-hydroxybutyrate] under acidic and alcaline conditions. **Polym Degrad Stabil** v.89, p.289-299, 2005.