

Avaliação do efeito dos bioflocos produzidos com bactérias autóctones e com probióticos comerciais no cultivo intensivo de camarão marinho *Penaeus vannamei* em sistema de baixa salinidade

Evaluation of the effect of bioflocs produced with autochthonous bacteria and commercial probiotics in the intensive cultivation of marine shrimp *Penaeus vannamei* in a low salinity system

Jéssica Lucinda Saldanha da Silva¹ , Marina Teresa Torres Rodríguez¹ , Danyela Carla Elias Soares² , Ricardo Rios Marques³, Oscarina Viana de Sousa² 

¹Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP¹, Av. Oliveira Paiva, 941 – Cidade dos Funcionários – CEP: 60822-130 – Fortaleza, Brasil

²Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará ², Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil

³Agromais Comercial, Zona Rural SN – 5960000, Mossoró-RN, Brasil

Correspondência: Jéssica Lucinda Saldanha da Silva **E-mail:** oscarinaviana@hotmail.com

Artigo original | Artículo original

Palavras-chave

Biotecnologia,
aquicultura,
probiótico,
nitrificação.

Keywords

biotechnology,
aquaculture,
probiotic,
nitrification.

RESUMO | O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos bioflocos formados com bactérias autóctones nitrificantes e probióticos comerciais na qualidade da água e no crescimento do camarão marinho *Penaeus vannamei* em sistema intensivo de baixa salinidade. O experimento foi conduzido com a avaliação de dois grupos experimentais: suplementado com probiótico comercial (BF-PC) e suplementado com bactérias probióticas autóctones (BF-PA). Nos resultados obtidos, os camarões cultivados com o tratamento BF-PA apresentaram maior taxa de sobrevivência, crescimento em peso médio, biomassa final e produtividade em comparação com os animais do tratamento BF-PC. As variáveis ambientais da água de cultivo (pH, oxigênio dissolvido e temperatura) apresentaram o mesmo comportamento nos tratamentos. Dessa forma, o uso de estirpes bacterianas autóctones nitrificantes no sistema de bioflocos, empregado no tratamento BF-PA, promoveu um ambiente mais estável o que refletiu numa melhora do desempenho zootécnico dos camarões.

ABSTRACT | The objective of the present work was to evaluate the effect of bioflocs formed with autochthonous nitrifying bacteria and commercial probiotics on water quality and the growth of marine shrimp *Penaeus vannamei* in an intensive low salinity system. The experiment was conducted with the evaluation of two experimental groups: supplemented with commercial probiotic (BF-PC) and supplemented with autochthonous probiotic bacteria (BF-PA). In the obtained results, shrimp cultivated with the BF-PA treatment showed higher survival rate, growth in average weight, final biomass and productivity compared to animals in the BF-PC treatment. The environmental variables of the cultivation water (pH, dissolved oxygen, and temperature) showed the same behaviour in the treatments. Therefore, the use of autochthonous nitrifying bacterial strains in the biofloc system, used in the BF-PA treatment, promoted a more stable environment, which resulted in an improvement in the zootechnical performance of the shrimp.

INTRODUÇÃO

O camarão marinho *Penaeus vannamei* é a espécie de crustáceo mais cultivado no mundo, alcançando produção de 4.966,2 mil toneladas (FAO 2020). O maior percentual dessa produção é oriunda de cultivos em regiões costeiras, entretanto tem-se adaptado o cultivo desses animais em águas oligohalinas em vários países como Estados Unidos (Alabama, Flórida, Texas), Brasil (região Nordeste), Equador, México (Pinto *et al.* 2020, Roy *et al.* 2010). Esse tipo de cultivo apresenta benefícios sociais, econômicos e ambientais (Pinto *et al.* 2020; Cavalheiro *et al.* 2016; Davis *et al.* 2005).

A criação de camarões em águas oligohalinas enfrenta alguns entraves, como o surgimento de mortalidades dos animais associadas ao desequilíbrio da concentração de alguns íons da água, que são requeridos para os processos de osmorregulação e para a formação do exoesqueleto (Davis *et al.* 2005, Jaime-Ceballos *et al.* 2012, Moura *et al.* 2021, Li *et al.* 2017). Outro problema é a toxidez dos compostos nitrogenados que se acumulam nos

tanques de criação com o aumento da intensificação da produção, sendo oriundos de restos de ração não consumida mais as excretas dos animais (Martínez-Cordova *et al.* 2017, Panigrahi *et al.* 2018, Neto *et al.* 2019). Foi detectado que altas concentrações de metabólitos nitrogenados juntamente com baixa salinidade da água contibuem para o estresse osmorregulatório dos camarões, ocasionando mortalidades (González-Félix *et al.* 2007).

Diante disso, vários estudos tem focado no uso de sistemas baseados na manipulação da comunidade microbiana buscando efeitos benéficos no ambiente de cultivo, como melhoria da qualidade de água (biorremediação), fonte de proteína microbiana extra, incremento de metabólitos e enzimas digestivas dos animais, que auxiliam no melhor aproveitamento do alimento artificial (Martínez-Córdova *et al.* 2015, Silva *et al.* 2016, Soares *et al.* 2021). O aumento da produção por meio da intensificação dos sistemas de cultivo causa alguns impactos negativos na qualidade de água podendo gerar efeitos diretos no desempenho zootécnico e na sanidade animal (Martínez-Cordova *et al.* 2017, Panigrahi *et al.* 2018).

Uma das tecnologias empregadas é a de bioflocos, com altas densidades de estocagem e troca mínima ou zero da água, tendo como base a proliferação de microrganismos através da manipulação da relação carbono: nitrogênio (C: N) da água com emprego de uma fonte de carbono (Martínez-Córdova *et al.* 2015, Silva *et al.* 2016, Soares *et al.* 2021). Os flocos são agregados em suspensão formados por bactérias, microalgas, agregados de matéria orgânica particulada, protozoários e metazoários (Crab *et al.* 2007). As bactérias heterotróficas compõem a maior parte dos flocos, elas assimilam os compostos nitrogenados incorporando em sua biomassa (Santos *et al.* 2019). Apesar do efeito biorremediador já comprovado dos bioflocos tem se buscado determinar melhoria do desempenho desses bioagregados através da adição externa de probióticos resultando em maior estabilidade nos parâmetros da água e melhoria dos processos de biorremediação e ou biocontrole (Maia *et al.* 2013, Ferreira *et al.* 2017; Arias-Moscoso *et al.* 2018) em cultivos de camarão em águas oligohalinas.

A bioaugmentação é uma técnica de biorremediação que consiste na introdução de microrganismos ou metabólitos em ambientes contaminados de forma a acelerar os bioprocessos de degradação (Salência *et al.* 2016). Uma estratégia para otimizar o processo é o isolamento e seleção de bactérias candidatas a probiótico a partir do próprio ambiente (ou seja microrganismos autóctones) a ser tratado garantindo o bom desempenho e adaptação às condições onde devem atuar (Franco 2009).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos bioflocos formados com bactérias autóctones nitrificantes e probióticos comerciais na qualidade da água e no crescimento do camarão marinho *P. vannamei* em sistema de baixa salinidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas: formação de bioflocos em condições laboratoriais e posterior aplicação dos bioflocos no cultivo de camarão marinho em condições de baixa salinidade.

Para a formação dos bioflocos em laboratório foi feita a seleção de bactérias autóctones com potencial nitrificante originalmente isoladas de um biofilme perifítico desenvolvido no cultivo de de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Silva 2018), pertencentes a coleção microbiológica Prof^a Regine Vieira, do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), no Instituto de Ciências do Mar (Labomar), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Descrição das bactérias nitrificantes autóctones

Para o isolamento das bactérias nitrificantes foi seguida a metodologia de Marín *et al.* (2012), fazendo o uso de meio de cultura seletivo composto por: 0,5g de (NH₄)₂SO₄; 1g de KH₂PO₄; 0,03g de FeSO₄.7H₂O; 0,3g de MgSO₄.7H₂O; 7,5g de CaCO₃ adicionado de 1mL de solução de elementos traços e pH final igual a 7,8, para cada 1L de meio de cultura.

A composição da solução de elementos traços utilizados na preparação do meio para cada 1 L: 0,1 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,02 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Identificação molecular das bactérias nitrificantes autóctones

Para a identificação molecular foi realizada a extração do DNA genômico das estirpes bacterianas, previamente crescidas em caldo Luria Bertani (LB), utilizando-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Posteriormente, a região hipervariada do gene *DNAr 16S* (V6-V8) das amostras foi amplificada por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 968U (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') e 1401L (5'-CGG TGGT GTA CAA GGC CC-3') (Pereira *et al.* 2011; Zhang e Fang, 2001). Para a amplificação foi preparado um mix para cada amostra (1× tampão, 1,5mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTP, 0,2 μM de Primer L1401, 0,2 μM de Primer U968, 2,5U de Taq DNA polimerase e 100 ng de DNA), e seguido as condições de termocilagem: desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, extensão final a 72°C por 8 minutos. O produto da amplificação foi confirmado em eletroforese com gel de agarose 1% (p/v) submetido a corrida eletroforética a 120 V por 45 minutos. O gel foi fotodocumentado no sistema EDAS 120 (Kodak). Foi realizado o sequenciamento do fragmento, a partir do produto de PCR purificado, utilizando-se sequenciador automático capilar ABI PRISM® 3500 (Applied Biosystems), conforme metodologia descrita por Sanger *et al.* (1977). As sequências obtidas foram alinhadas com sequências previamente publicadas no banco de dados *GenBank* do National Center for Biotechnology Information utilizando o algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997).

Caracterização fenotípica das bactérias nitrificantes autóctones

Feita a identificação molecular, dez estirpes nitrificantes autóctones foram caracterizadas em relação a produção das enzimas exógenas (caseinase, lipase, fosfolipase, gelatinase e celulase) (Teather e Wood 1982, Rodrigues *et al.* 1993, Liu *et al.* 1996), capacidade de agregação (Christensen *et al.* 1985) e formação de substâncias exopoliméricas (EPS) (Freeman *et al.* 1989).

Além disso, foi empregado o teste de antagonismo através da metodologia de estrias cruzadas (Yoshida *et al.* 2009) entre as dez estirpes, a fim de detectar as relações harmônicas. Para isso, as cepas foram renovadas em ágar TSA (incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por um período de 24h). Uma estria central, contendo o inóculo da cepa testada, foi feita em placas de ágar TSA. Posteriormente, as demais bactérias em teste foram inoculadas perpendiculares a primeira estria, mantendo uma distância de 0,5 cm. Foram feitas no máximo 5 estrias perpendiculares por placa. Após 24h do período de incubação a 35°C, foi observado o resultado. A atividade antagonista entre as bactérias foi verificada através da inibição ou não do crescimento da estria central em relação aos demais inóculos. Foi considerada uma atividade antagonista negativa quando não havia restrição do crescimento entre as bactérias testadas.

Construção do consórcio de bactérias nitrificantes autóctones

Para a construção do consórcio de bactérias nitrificantes autóctones foram adotados alguns critérios de seleção das estirpes. O primeiro critério é que as bactérias apresentassem antagonismo negativo, seguido da expressão de duas ou mais atividades enzimáticas e/ou que produzissem exopolissacarídeos ou que fossem capazes de se agregarem.

Formação dos flocos em laboratório

A formação dos bioflocos *in vitro* foi realizada de acordo com Silva *et al.* (2020) com ajustes. Para isso, alíquotas de 1 mL de cada estirpe bacteriana, selecionada anteriormente para compor o consórcio, foi ajustada na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e adicionadas em 400 mL de caldo triptona de soja (TSB), sendo incubado em estufa bacteriológica por 72h. Passado esse período, os caldos foram centrifugados em tubos tipo *Falcon* de modo a concentrar as células em *pellets*, descartando o sobrenadante. As condições de centrifugação foram -

5.000 x g por 10 minutos a 25°C. Ao término do processo, os *pellets* de cada consórcio foram ressuspensos em 10mL de solução salina 0,85% NaCl.

Foi montado um microsistema em um recipiente com volume de 3,5L com água de cultivo esterilizada (em autoclave a 121°C por 15 minutos) mantido sob aeração constante com pedra porosa. O inóculo bacteriano de 10mL foi adicionado a esse sistema, a fim de favorecer a formação dos flocos *in vitro*. Diariamente, por 10 dias, foi feita a adição de melão de cana de açúcar e ração para camarão com teor de proteína bruta de 35%, a fim de fornecer uma fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, mantendo uma relação de Carbono: Nitrogênio (C:N) de 20:1, de acordo com a metodologia sugerida por Avnimelech (1999). Foi assumido que o teor de carbono do melão líquido era de 30% (Lima *et al.* 2018).

Após a formação prévia dos flocos em condições laboratoriais, realizou-se a transferência por meio de garrafas de vidro de 5L para tanques de maturação na fazenda de cultivo comercial de camarão marinho para produção do biofoco em maior escala.

Maturação dos biofocos na fazenda de cultivo

Na fazenda foi dado início a maturação do biofoco seguindo recomendações de Silva *et al.* (2020), onde os 3,5L dos flocos pré-formados com consórcio bacteriano foram adicionados a uma caixa circular com capacidade de 1000 L equipada com aeração constante, contendo água de poço, a qual também abasteceu os tanques experimentais. Nesse sistema de maturação, foram adicionados 50 camarões com peso médio de 0,6 g (biomassa total igual a 30 g). Foi mantida a mesma relação de C:N para o controle de compostos nitrogenados, seguindo de acordo com Avnimelech (1999).

Durante a etapa de maturação dos biofocos foi acompanhado, diariamente, a formação dos sólidos sedimentáveis utilizando o cone de *Imhoff* (Avnimelech 2009) e, a cada 2 dias, eram realizadas análises de amônia, nitrito e nitrato (Clesceri, Greenberg e Eaton 1998; Sá 2012). Ao ser detectada a estabilização dos parâmetros de amônia e nitrito (após 15 dias), foi obtida a concentração de 100mL/L de sólidos sedimentáveis, concentração essa considerada suficiente para a retirada dos biofocos e posterior adição ao sistema de cultivo de camarão.

Semanalmente, 20L desse foco maduro era adicionado ao sistema de cultivo correspondendo ao tratamento BF-PA.

Experimento *in vivo*

O experimento foi realizado em uma área comercial de cultivo de camarão marinho *Penaeus vannamei*.

Foram utilizadas pós-larvas (PLs) de camarão marinho, em salinidade 3 ppt, adquiridas no laboratório de produção de pós-larvas de camarão marinho Aquatec Ltda (Rio Grande do Norte). As PLs foram mantidas em tanques-berçário durante 20 dias antes do povoamento para início dos tratamentos.

Na fase de engorda, foram utilizadas duas unidades experimentais, compostas por tanques circulares de geomembrana com capacidade volumétrica individual de 1000 m³ equipados com sistema de aeração individual com *mangueira porosa microperfuradas e aeradores de pás*. Foram utilizados camarões com peso médio inicial de aproximadamente 0,3 g, sendo empregada uma densidade de estocagem de 140 camarões/m³.

Foram testados dois tratamentos com diferença nos consórcios bacterianos utilizados na indução da formação de biofocos: o BF-PC (*biofoco adicionado com probióticos comercial*) utilizando um probiótico comercial com os elementos ativos *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*; e o BF-PA (*biofoco adicionado com bactérias autóctones*) utilizando consórcio bacteriano composto por bactérias nitrificantes nativas como iniciadoras na formação de biofocos. Semanalmente 100g do probiótico comercial era aplicado ao tanque do tratamento BF-PC. Os experimentos tiveram duração de 60 dias.

A preparação dos tanques consistiu da lavagem com água doce corrente e desinfecção com ácido clorídrico. Posteriormente, os tanques foram abastecidos com água de poço com salinidade 4 mg.L⁻¹. Após o abastecimento os dois tanques experimentais receberam fertilização para estimular o desenvolvimento inicial das microalgas. Utilizando uma mistura fermentada de farelo de arroz, melaço de cana e silicato de magnésio. Foi realizada também a correção iônica da água para manter a relação Ca:Mg:K próxima da proporção da água do mar 1:3:1. Aplicando cloreto de potássio e nitrato de magnésio.

O arraçoamento para ambos os tratamentos consistiu na oferta de ração específica para sistemas intensivos (Api camarão intensiva – Total Alimentos) através do método de voleio com bandejas de amostragem, *onde foram utilizados* três tipos de ração comercial com diferentes composições (Tabela 1). A quantidade de ração foi ajustada pela alimentação diária nas bandejas baseado na estimativa da biomassa semanal.

Durante o experimento, os camarões nos dois tratamentos foram alimentados oito vezes ao dia, sendo ofertado a 10% da biomassa até o peso médio dos indivíduos atingir cerca de 1g e, a partir desse momento a taxa de alimentação foi gradativamente reduzida de acordo com a biomassa no final do experimento.

Tabela 1. Caracterização das rações comerciais utilizadas na alimentação dos animais nas fases ao longo dos tratamentos.

Table 1. Characterization of commercial feed used to feed animals in the phases throughout the treatments.

Fases	PB (%)	P (%)	E.E.(%)	Granulometria (mm)
Fase 2	40	1,3	0,9	0,8 a 1,3
Fase J	40	1,3	0,9	1,3 a 2,0
Fase 3	38	1,2	0,85	2,5

Legenda: % PB: Porcentagem de proteína bruta na ração; % P: Porcentagem de fósforo na ração, % E.E: Porcentagem de extrato etéreo;
Fase 2: usada logo após a fase de berçário; Fase J: usada entre 1,8 e 3 g; e a Fase 3 (ração de engorda): utilizada a partir de 3 g até a despesca.

Análise dos parâmetros de qualidade de água

Foram determinados diariamente, três vezes ao dia, durante o período experimental (60 dias) nos períodos da manhã (8:00hrs), tarde (16:00hrs) e da noite (00:00hrs), os valores de pH, oxigênio dissolvido (OD mg. L⁻¹) e temperatura (°C) (Horiba U-50, Kyoto, Japan). Semanalmente foram determinadas as concentrações de alcalinidade total (AT em mg CaCO₃ L⁻¹), dureza total (DT em mg CaCO₃ L⁻¹), dureza cálcica (DC em mg CaCO₃ L⁻¹) e magnésiana (DM em mg CaCO₃ L⁻¹), cálcio, magnésio e potássio semanalmente utilizando uma sonda multiparamétrica (Fotômetro Multiparâmetro YSI- 9500). As concentrações de nitrogênio amoniacal total (NAT mg. L⁻¹), nitrito e nitrato foram verificados fazendo uso de um fotômetro ((Fotocolorímetro AT 100P II Multiparâmetro da Alfakit). A quantidade de sólidos sedimentáveis foi verificada com o uso do Cone *Imhoff* seguindo recomendações de Gaona *et al.* (2017).

Análise do desempenho zootécnico

O desempenho produtivo dos camarões foi avaliado através de biometrias semanais. As variáveis de desempenho zootécnico analisadas foram: Peso médio final, sobrevivência, ganho de peso diário, taxa de crescimento específico, produtividade, seguindo as seguintes equações:
*Sobrevivência: [(número final de animais/número inicial de animais) x 100] (%);
*Ganho em peso diário (GPD): (peso final – peso inicial) dias de cultivo) (g);
*Taxa de crescimento específico (TCE): [(lnpeso final (g) – ln peso inicial (g)/período experimental) x 100] (%);
*Produtividade: [ganho de biomassa (g)/ volume do tanque (m³)/período experimental] (g m⁻³dia⁻¹).

Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística descritiva e aplicado teste não paramétrico de Mann-Whitney para verificar se as médias são ou não estatisticamente diferentes (Fávero *et al.* 2009). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Identificação molecular das bactérias nitrificantes autóctones

Dez estirpes bacterianas autóctones com potencial nitrificante foram isoladas e identificadas por meio do sequenciamento da região hipervariada do gene DNAr 16S (V6-V8): *Rhizobium rosettiformans* (N02-100% de similaridade), *Brevibacterium* sp. (N03-98% de similaridade), *Hydrogenophaga* sp. (N04-99% de similaridade), *Pseudomonas* sp. (N07-100% de similaridade), *Thauera phenylacetica* (N14-100% de similaridade), *Thauera phenylacetica* (N21-100% de similaridade), *Buttiauxella agrestis* (N25-94% de similaridade), *Enterobacter* sp. (N28-100% de similaridade), *Brevundimonas* sp. (N36-99% de similaridade) e *Burkholderia* sp. (N40-100% de similaridade).

Caracterização fenotípica das bactérias nitrificantes autóctones

Na tabela 2 tem-se a caracterização das bactérias autóctones nitrificantes. Com exceção da estirpe N2, as bactérias foram capazes de produzir, pelo menos, três enzimas exógenas das cinco testadas. Também apresentaram características de agregação e formação de substâncias exopoliméricas (EPS), fatores esses essenciais para a produção de agregados microbianos que constituem os flocos (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização enzimática, agregação e produção de exopolissacarídeos das cepas bacterianas autóctones.
Table 2. Enzymatic characterization, aggregation and exopolysaccharide production of autochthonous bacterial strains.

Código	Estirpe	Expressão enzimática	Agregação	EPS
N02	<i>Rhizobium rosettiformans</i>	-	+	-
N03	<i>Brevibacterium</i> sp.	L-F-G-C	+	+
N04	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	-	-	-
N7	<i>Pseudomonas</i> sp.	P-F-L	+	+
N14	<i>Thauera phenylacetica</i>	-	-	-
N21	<i>Thauera phenylacetica</i>	A-L-F-C	+	+
N25	<i>Buttiauxella agrestis</i>	P-A-F	+	+
N28	<i>Enterobacter</i> sp.	P-F-A-L-G	+	+
N36	<i>Brevundimonas</i> sp.	L-F	+	+
N40	<i>Burkholderia</i> sp.	P-F-L-G	+	+

P – Protease; F – Fosfolipase; G – Gelatinase; L – Lipase; A-amilase; C-Celulase. EPS – Capacidade de produzir exopolissacarídeos.

Construção do consórcio de bactérias nitrificantes autóctones

Na tabela 3 tem-se o resultado individual do antagonismo das bactérias nitrificantes autóctones testadas para a seleção do consórcio. A atividade antagônica foi positiva (+) quando se detectou a inibição de crescimento entre as estirpes, e negativa (-) quando não havia restrição do crescimento entre as bactérias testadas. No total foram utilizadas dez estirpes autóctones nitrificantes para esse teste.

Tabela 3. Resultado do teste de antagonismo entre as estirpes bacterianas nitrificantes autóctones.
Table 3. Results of the antagonism test among autochthonous nitrifying bacterial strains.

Estirpes bacterianas	N02	N03	N04	N07	N14	N21	N25	N28	N36	N40
N02	*	-	+	-	-	-	-	-	-	-
N03		*	-	+	-	-	-	-	-	-
N04			*	-	+	+	-	-	-	+
N07				*	-	+	-	-	-	-
N14					*	+	-	+	+	-
N21						*	-	-	-	-
N25							*	-	-	+
N28								*	-	-
N36									*	+
N40										*

Fonte: elaborada pela autora.
(-): Antagonismo negativo; (+): Antagonismo positivo.

Após a análise dos resultados da atividade antagônica foi possível a construção de alguns consórcios. No entanto, quatro bactérias atenderam os critérios exigidos (como resultado negativo de antagonismo e positividade em pelo menos dois testes enzimáticos), sendo assim utilizadas para compor o consórcio empregado no tratamento BF-PA: *Rhizobium rosettiformans* (N2), *Pseudomonas* sp. (N7), *Enterobacter* sp. (N28) e *Burkholderia* sp. (N40).

Experimento in vivo

Parâmetros de qualidade de água

Os valores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura apresentaram estabilidade entre os tratamentos empregados ao longo do dia e ficaram dentro da faixa ótima de crescimento do camarão *L. vannamei*, como pode ser visto na tabela 4.

Tabela 4. Média de registros dos parâmetros de qualidade de água do cultivo do camarão *L. vannamei* em sistema heterotrófico com adição de probióticos comerciais (BF-PC) e autóctones (BF-PA) nos diferentes turnos ao longo do dia, durante as 9 semanas.

Table 4. Average records of water quality interruptions from *L. vannamei* shrimp cultivation in a heterotrophic system with the addition of commercial (BF-PC) and autochthonous (BF-PA) probiotics in different shifts throughout the day, during the 9 weeks.

Tratamentos	Variáveis	Período		
		8:00h	16:00h	00:00h
BF-PC	pH	7,7±0,3	7,6±0,4	7,7±0,2
	OD	6,7±0,4	6,3±0,4	5,6 ±0,4
	Temp	31,9±0,3	32,0±0,5	31,4±0,4
BF-PA	pH	7,7±0,2	7,7±0,2	7,7±0,2
	OD	7,4±0,2	6,9±0,4	6,1±0,8
	Temp	32,2±0,2	31,4±0,7	31,2±0,4

OD: oxigênio dissolvido (mg L⁻¹); Temp: temperatura (°C).

O nitrogênio amoniaco total (NAT) apresentou um pico na sexta semana de cultivo com valores de 11,54 e 10,48 mg L⁻¹ nos respectivos tratamentos, BF-PC e BF-PA. Ao final do cultivo, em ambos os tratamentos, houve diminuição dos valores de NAT ficando na faixa de 0,09 e 0,10 mg L⁻¹ (Fig. 1 e 2). As concentrações de amônia, nitrito e nitrato não apresentaram diferenças significativas nos tratamentos (valor-p>0,05).

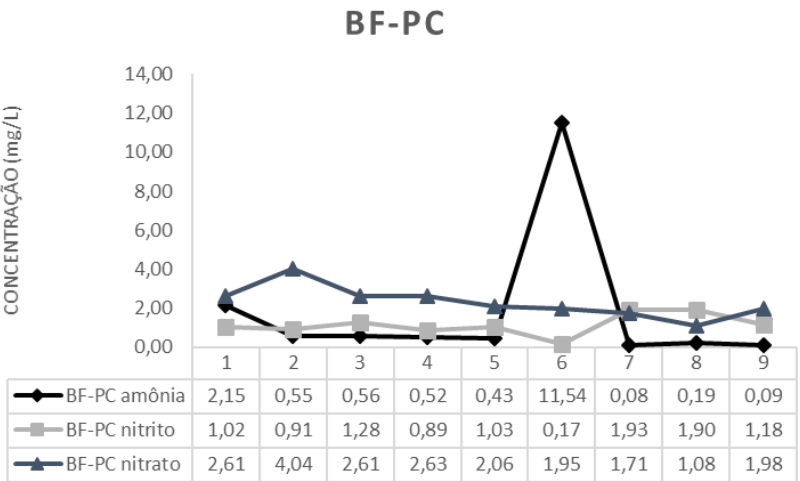


Figura 1. Concentração de nitrogênio amoniaco total (NAT) (amônia), nitrito e nitrato na água de cultivo do camarão *Penaeus vannamei* em sistema heterotrófico com adição de probióticos comerciais (BF-PC).

Figure 1. Concentration of total ammoniacal nitrogen (NAT) (ammonia), nitrite and nitrate in *Penaeus vannamei* shrimp culture water in a heterotrophic system with addition of commercial probiotics (BF-PC).

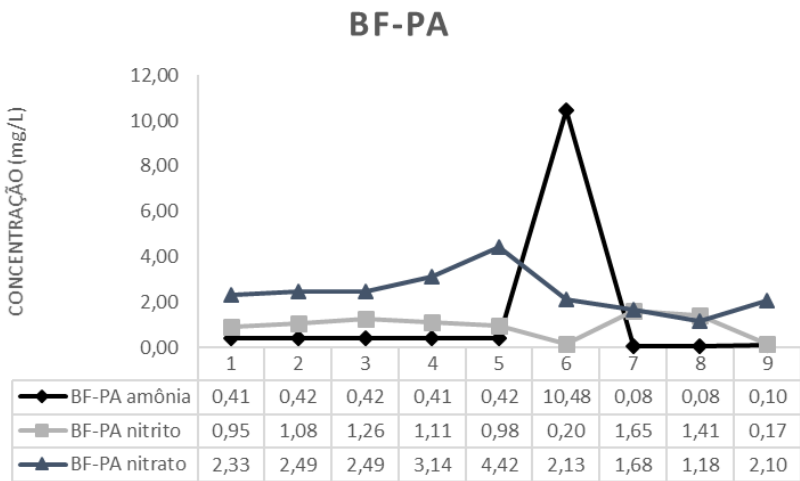


Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniaco total (NAT) (amônia), nitrito e nitrato na água de cultivo do camarão *Penaeus vannamei* em sistema heterotrófico com adição de probióticos autóctones (BF-PA).

Figure 2. Concentration of total ammoniacal nitrogen (NAT) (ammonia), nitrite and nitrate in the water used to grow shrimp *Penaeus vannamei* in a heterotrophic system with the addition of autochthonous probiotics (BF-PA).

A concentração de nitrito apresentou maior estabilidade no tanque do tratamento BF-PA e ao fim do cultivo pode-se observar valor de 0,17 mg L⁻¹ (Fig. 2), enquanto o tratamento BF-PC foi igual a 1,18 mg L⁻¹ (Fig. 1). Aquele valor correspondeu a uma concentração 7x maior de nitrito nos tanques do tratamento BF-PC quando comparado ao tratamento BF-PA. Em relação a concentração de nitrato, pode-se verificar o acúmulo no sistema em ambos os tratamentos, sendo resultado da atividade de nitrificação.

Volume dos flocos

O volume dos sólidos sedimentáveis apresentou uma queda na quarta semana de cultivo, e a partir daí se elevou até a última semana, em ambos os tratamentos (Fig. 3). O maior volume de sólidos foi observado no tratamento BF-PA, sendo igual a 65 mL/L, enquanto o tratamento BF-PC apresentou volume de 45 mL/L, ao fim do período de cultivo. Com base no teste estatístico, o volume de sólidos é semelhante entre os tratamentos ($p>0,05$).

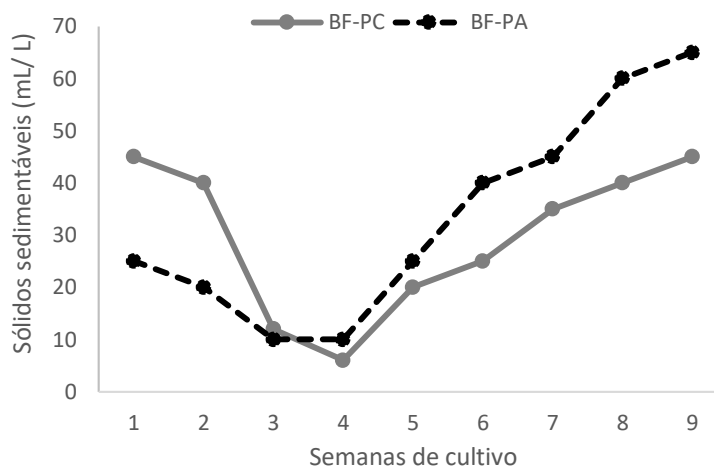


Figura 3. Volume dos sólidos sedimentáveis calculados durante o cultivo do camarão *Penaeus vannamei* em sistema heterotrófico com adição de probióticos comerciais (BF-PC) e autóctones (BF-PA).

Figure 3. Volume of settleable solids calculated during the cultivation of *Penaeus vannamei* shrimp in a heterotrophic system with the addition of commercial (BF-PC) and autochthonous (BF-PA) probiotics.

Na Figura 4 tem-se a variação temporal dos valores de alcalinidade total, dureza total, dureza cálcica, magnesiana e concentração de cálcio e potássio da água de cultivo do camarão *L. vannamei* em sistema de bioflocos desenvolvido com bactérias probióticas comerciais (BF-PC) e bactérias autóctones (BF-PA). Em análise entre BF-PA e BF-PC, não existem diferenças significativas (valor- $p>0,05$).

A concentração da alcalinidade nos tratamentos BF-PC e BF-PA reduziu na quinta semana, para valores iguais a 65 e 80 mg L⁻¹ de CaCO₃, respectivamente. Isso pode ser resultado do efeito dos processos de nitrificação que consomem as reservas alcalinas da água. Os valores de dureza total, cálcica e magnesiana também apresentaram queda ao longo do cultivo em ambos os tratamentos (Fig. 4 ii, iii e iv).

Os teores de íons (cálcio, magnésio e potássio) apresentaram oscilações ao longo do cultivo, demonstrando diminuição até a quinta semana, voltando a aumentar a partir da sexta e sétima semana, em ambos os tratamentos. E posteriormente, apresentou novamente diminuição. Isso aconteceu devido ao consumo desses íons pelos camarões e pelos bioflocos.

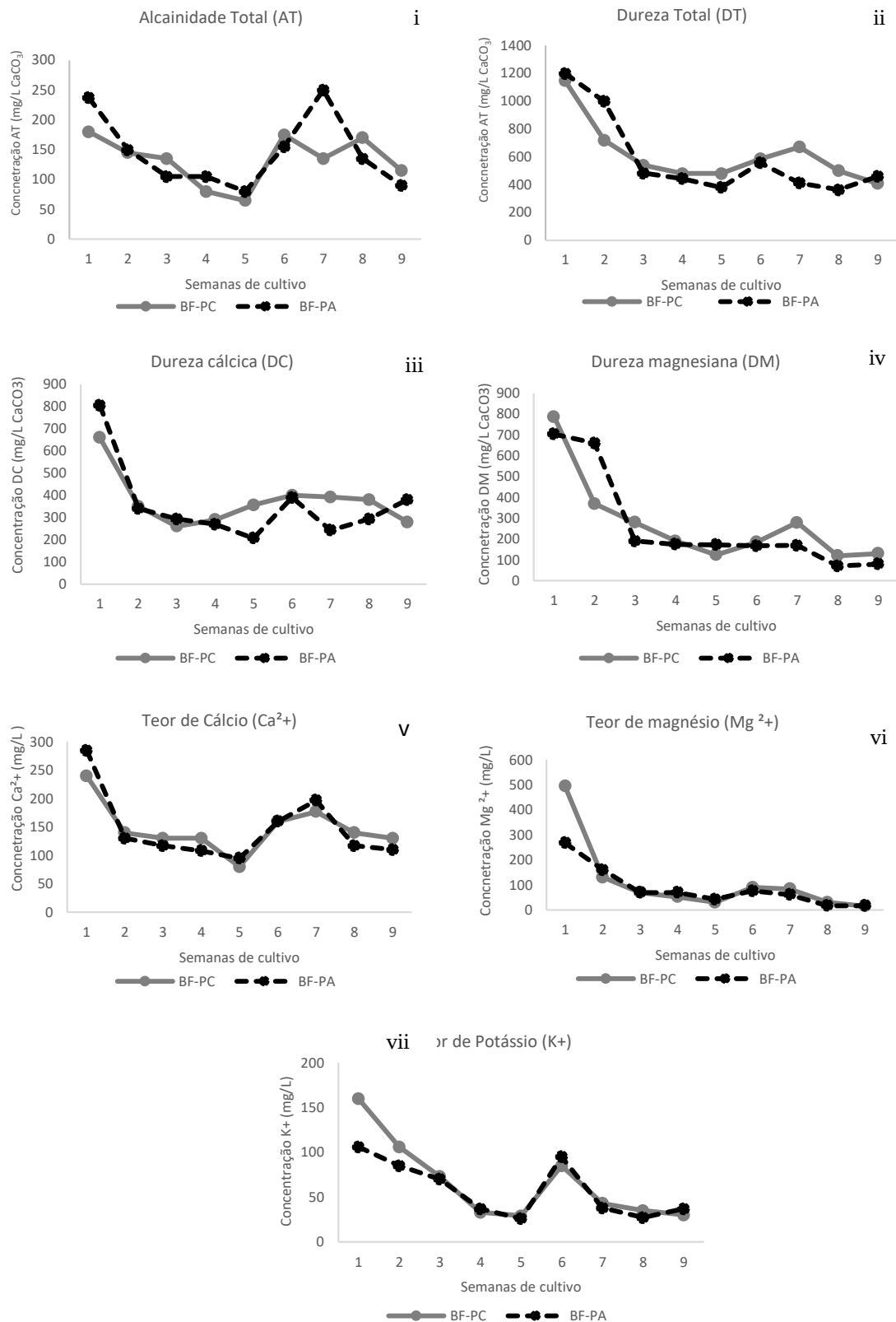


Figura 4. Variação temporal da concentração de Alcalinidade total (AT) (i), dureza total (DT) (ii), dureza cálcica (DC) (iii), dureza magnesiana (DM) (iv), teores de cálcio (v), magnésio (vi) e potássio (K) (vii) na água de cultivo do camarão *Penaeus vannamei* em sistema de bioflocos com adição de bactérias comerciais (BF-PC) e bactérias autóctones (BF-PA).

Figure 4. Temporal variation in concentration of total alkalinity (AT) (i), total hardness (DT) (ii), calcium hardness (DC) (iii), magnesium hardness (DM) (iv), calcium theories (v), magnesium (vi), potassium (K), vii) in the culture water of shrimp *Penaeus vannamei* in a biofloc system with the addition of commercial bacteria (BF-PC) and autochthonous bacteria (BF-PA).

Desempenho zootécnico

A sobrevivência dos camarões foi maior que 80% no tanque tratado com bioflocos suplementados com bactérias probióticas autóctones (BF-PA) e 65% no tanque dos bioflocos com probióticos comerciais (BF-PC), como pode ser visto na figura 5.

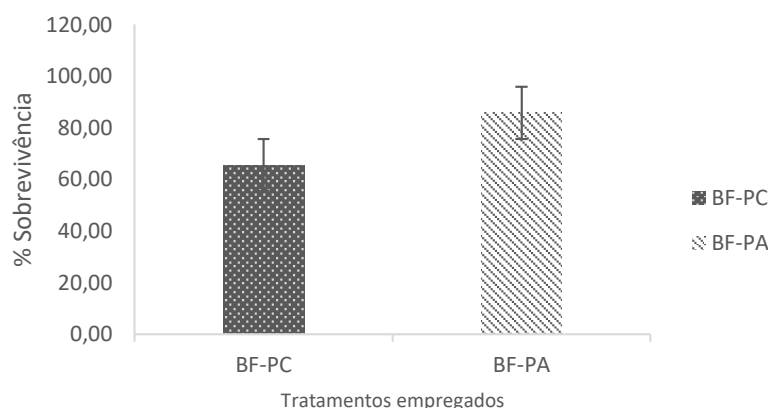


Figura 5. Porcentagem de sobrevivência do camarão *Penaeus vannamei* durante o cultivo em sistema heterotrófico com adição de probióticos comerciais (BF-PC) e probióticos autóctones (BF-PA).

Figure 5. Survival percentage of *Penaeus vannamei* shrimp during cultivation in a heterotrophic system with the addition of commercial probiotics (BF-PC) and autochthonous probiotics (BF-PA)

Os camarões cultivados com bioflocos suplementados de bactérias autóctones (BF-PA) apresentaram maior crescimento em peso médio ao longo do período de experimentação, atingindo valor final de 8,2g. Enquanto, os animais do sistema BF-PC apresentaram uma diminuição de 5% no peso (7,8g) ao fim do cultivo (Fig. 6).

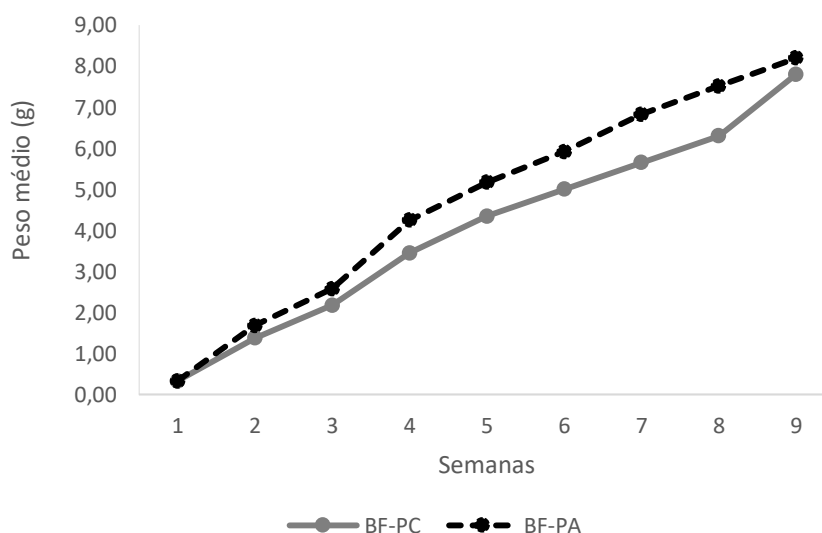


Figura 6. Peso médio do camarão *P. vannamei* durante o período de cultivo em sistema heterotrófico empregando tratamento com probióticos comerciais (BF-PC) e consórcio de bactérias autóctones (BF-PA).

Figure 6. Average weight of *P. vannamei* shrimp during the cultivation period in a heterotrophic system employing treatment with commercial probiotics (BF-PC) and a consortium of autochthonous bacteria (BF-PA).

A biomassa final e produtividade dos tanques do tratamento BF-PA ($984,0 \pm 2,4$ Kg e $0,984 \pm 0,99$ Kg.m⁻³, respectivamente) foram numericamente maiores que os valores do BF-PC ($716,0 \pm 2,0$ Kg e $0,716 \pm 0,83$ Kg.m⁻³, respectivamente) (Tabela 5). O fator de conversão alimentar foi menor que 1,0 em ambos os tratamentos.

Tabela 5. Desempenho zootécnico do *Penaeus. vanamei* cultivados na presença do probiótico comercial (BF-PC) e consórcio de bactérias autóctones (BF-PA) (média ± desvio padrão).

Table 5. Zootechnical performance *Penaeus vannamei* cultivated in the presence of commercial probiotic (BF-PC) and consortium of autochthonous bacteria (BF-PA) (mean ± standard deviation).

Variables	Tratamentos	
	BF-PC	BF-PA
Sobrevivência (%)	65,57 ± 7,47	85,71 ± 7,47
Peso médio inicial (g)	0,33 ± 0,10	0,33 ± 0,10
Peso médio final (g)	7,8 ± 2,09	8,2 ± 2,4
Biomassa final (Kg)	716,0 ± 2,0	984,0 ± 2,4
Ganho em peso diário	0,144 ± 1,09	0,152 ± 1,4
TCE (% day ⁻¹) ⁽¹⁾	5,86 ± 0,36	5,95 ± 0,35
Produtividade (Kg m ⁻³ day ⁻¹)	0,716 ± 0,83	0,984 ± 0,99
FCA ⁽²⁾	0,74 ± 0,16	0,80 ± 0,05

⁽¹⁾TCE (Taxa de crescimento específico) = [(Ln peso final - Ln peso inicial) /dias de cultivo] × 100;

⁽²⁾ FCA (Fator de conversão alimentar = ração ofertada(g)/ganho em peso médio (g).

DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foi verificado o potencial de bioaugmentação de dois grupos distintos de bactérias: o primeiro grupo (BF-PC) foi formado por um probiótico comercial constituído por *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*; e o segundo (BF-PA) foi formado por um consórcio de bactérias autóctones nitrificantes (*Rhizobium rosettiformans*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Burkholderia* sp.). Os consórcios microbianos foram testados em sistemas de cultivo empregando a tecnologia dos bioflocos e foi observado o efeito na qualidade de água e no crescimento dos camarões marinhos *L. vannamei*, bem como a sobrevivência e a produtividade, em condições comerciais de cultivo. Em contraste, Arias-Mocoso *et al.* (2018) ao empregar probióticos comerciais em um cultivo de camarão marinho na presença de bioflocos não obteve melhorias na qualidade da água nem na resposta produtiva de *P. vannamei*.

Foi observado que houve redução de NAT e nitrito nos tanques em ambos os tratamentos, no entanto, foi possível visualizar maior estabilidade e menores concentrações ao longo da variação temporal desses compostos quando houve suplementação do consórcio de bactérias autóctones (BF-PA). O que indica a eficiência do processo de remediação de amônia e nitrito na água de cultivo por meio do processo da bioaugmentação.

As concentrações ideais dos compostos iônicos de cálcio, magnésio e potássio para cultivo de camarão marinho ficaram no intervalo de: 11 – 296, 3- 64 e 4-12,4 mg/L, respectivamente (Boyd *et al.* 2002). Os valores encontrados na presente pesquisa, apesar da variação temporal, estiveram dentro das recomendações estipuladas, e isso foi possível devido a correção desses íons na água ao longo do cultivo, pois esses íons são essenciais no processo de osmorregulação do camarão (Roy *et al.* 2010), sobretudo em águas de baixa salinidade como no presente estudo.

O volume dos sólidos sedimentáveis apresentou valores superiores ao recomendado para cultivo de camarão *P. vannamei*, que compreende o intervalo entre 10-15 mL/L (Samocha *et al.* 2007). No entanto, não houve prejuízo zootécnico e nem de qualidade de água no presente estudo em ambos os tratamentos. O maior valor foi encontrado na água de cultivo do tratamento BF-PA (65 mL/L). Esse fato pode ser explicado pela introdução das bactérias autóctones no sistema, as quais possuíam a capacidade de produção de substâncias exopolissacarídicas (EPS) permitindo uma maior formação de agregados microbianos (Silva *et al.* 2020).

Os valores de alcalinidade total, dureza total, dureza cálcica e magnesiana estiveram dentro dos limites determinados ideais para o cultivo do camarão *P. vannamei* em condições de baixa salinidade (Cavalheiro *et al.* 2016).

Os resultados sugerem que a suplementação de bactérias autóctones (BF-PA) no sistema biofoco influenciou a sobrevivência de *P. vannamei*, a qual foi 30% maior quando comparado com a sobrevivência dos animais no tratamento do probiótico comercial (BF-PC), constituídos por duas espécies do gênero *Bacillus*. O mesmo foi observado em relação ao peso final e ganho em peso, os quais foram 1,05 maior nos camarões do tratamento BF-PA. Panigrahi *et al.* (2020) ao cultivar *P. indicus* com biofocos suplementados com bactérias probióticas observaram maior incremento no crescimento e na sobrevivência. Os autores atribuíram esses ganhos as nove espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus* que constituíam o consórcio empregado no tratamento utilizado. Enquanto, Arias-Mosoco *et al.* (2018) ao utilizar um produto comercial constituído por *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Saccharomyces* spp. no cultivo de *P. vannamei* em sistema BFT não obteve resultado no desempenho zootécnico dos animais.

O uso de estirpes autóctones no tratamento BF-PA, o qual foi constituído pelas espécies *Rhizobium rosettiformans*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Burkholderia* sp., incrementaram mais o crescimento e a sobrevivência dos camarões cultivados em águas de baixa salinidade em sistemas BFT quando comparado com o probiótico comercial formado por *Bacillus* (BF-PC). As bactérias autóctones utilizadas na presente pesquisa apresentaram uma ampla produção enzimática e metabólica, a qual teve um efeito sinérgico com a microbiota dos flocos, gerando uma proteína microbiana extra enriquecida. Esses flocos ao serem consumidos disponibilizaram proteína extra, além de enzimas e metabólitos que auxiliaram no melhor aproveitamento do alimento artificial, levando a uma melhora no desempenho zootécnico dos camarões (Avnimelech 2009; Ferreira *et al.* 2017).

O uso de estirpes autóctones com potencial probiótico, empregado no tratamento BF-PA, promoveu a formação e o desenvolvimento mais estável da comunidade microbiana nos sistemas de biofocos, tendo efeito bioaumentador, contribuindo para uma maior estabilidade das variáveis de qualidade de água dos sistemas de cultivo e melhor desempenho dos animais.

CONCLUSÃO

Comparado ao sistema de biofocos adicionados de probiótico comercial, o emprego de consórcio de bactérias autóctones nitrificantes ao sistema de biofocos resultou na promoção de um ambiente mais estável de cultivo, o que refletiu na maior sobrevivência, incremento do crescimento e maior produtividade de camarões marinhos *P. vannamei* aclimatados a baixa salinidade.

Declaração de conflito de interesse dos autores

Os autores não tem conflito de interesse.

Declaração de boas práticas no uso de animais

Os autores declaram que seguiram toda as diretrizes para o uso dos animais no experiment realizado.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão de bolsas de Inovação Tecnológica para o desenvolvimento do presente trabalho e em especial ao Prof. Dr. Raúl Cruz Izquierdo, Cientista Chefe do Programa de Políticas Públicas em Pesca e Aquicultura-FUNCAP. Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

REFERÊNCIAS

Altschul S F., Madden T L., Schaffer A A., Zhang J., Miller W., Lipman D J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:17:3389-3402.

- Arias-Moscoso J L., Espinoza-Barrónb, L. G., Miranda-Baezab, A., Rivas-Vegab M E., Nieves-Sotod M. (2018). Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water Exchange. *Aquaculture Reports* 11:47–52.
- Avnimelech Y. (1999). Carbon:nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176:227–235.
- Avnimelech Y. Biofloc technology: a practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 182 pp., 2009.
- Boyd C E (2002). Dissolved Salts in Water for Inland, Low-salinity Shrimp Culture. Special Research Article 40-45.
- Cavalheiro T. B., Conceição M M., Ribeiro T. T B. C. (2016). Crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei* em viveiros e tanques utilizando efluente do processo de dessalinização. *Gaia Scientia* 10:4:319-337.
- Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt, T., Bossier P., Verstraete W. (2007). Nitrogen removal in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270:1-14.
- Christensen G D., Simpson, W A., Younger, J J., Baddour, L M., Barrett, F F., Melton, D M. (1985). Adherence of coagulase- negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22:996-1006.
- Clesceri L. S., Greenberg A E., Eaton A D. (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater (20thed.). Washington, DC: American Public Health Association,
- Davis D. A., Boyd C. E., Rouse D. B. (2005). Effects of potassium, magnesium and age on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* post-larvae reared in inland low salinity well waters in West Alabama. *Journal of World Aquaculture Society* 36:3:416-419.
- FAO 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Fávero L P., Belfiore, P., Silva, F L., Chan, B L. (2009). Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Franco I. (2009) Isolamento, identificação e caracterização molecular de bactérias candidatas a probióticos em organismos aquáticos. Dissertação (Mestrado em Ciências animais). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia.
- Ferreira, M G P., Melo, F P., Lima, J P V., Andrade, H A., Severi, W., Correia, E S. (2017). Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine shrimp culture with biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45:1:167-176.
- Freeman D. J., Falkiner F. R., Keane C T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 42:872-874.
- Gaona C A P., Viau V., Poersch L H., Wasielesky Jr. W. (2017). Effect of different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) BFT culture system during biofloc formation. *Aquaculture Research* 48:1070–1079.

- González-Félix M., Gómez-Jiménez S., Perez-Velazquez M., Davis D A., Velazco-Rameños J. G. (2007). Nitrogen budget for a low salinity, zero-water Exchange culture system: I. Effect of dietary protein level on the performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 38:798-808.
- Jaime-Ceballos B., Cabrera-Machado J. E., Vega-Villasante F. (2012). Cultivo tierra adentro de camarón marino *Litopenaeus vannamei*: evaluación del agua de dos granjas acuícolas en Cuba REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*,13:6:1-17.
- Li E., Wang X., Chen K., Xu C., Qin J G., Chen L. (2017). Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Review Aquaculture* 7: 1–19.
- Liu, P C., Lee, K K., Chen, S N. (1996). Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letter in Applied Microbiology* 22:413-416.
- Maia, E P., Alves-Modesto, G., Brito, L O., Oliveira, A., Gesteira, T C V. (2013). Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41:126-137.
- Marín J. C., Castro E., Behling E., Colina G., Díaz L., Rincón N. (2012). Nitrobacterias em reatores biológicos rotativos de controle (CBC) de três câmaras bajo diferentes cargas orgânicas. *Revista Tecnocientífica URU* 2:71-82.
- Martínez-Cordova L. R., Martínez-Porchas M., Emerenciano M. M. G. C., Miranda-Baeza A., Gollas-Galvan T. (2017). From microbes to fish the next revolution in food production. *Critical Reviews in Biotechnology* 37:287–295.
- Moura P S., Wasielesky Jr. W., Serra F P., Bragab A., Poersch L. (2021). Partial seawater inclusion to improve *Litopenaeus vannamei* performance in low salinity biofloc systems. *Aquaculture* 531:3:1-8.
- Neto I A., Brandão H., Furtado P S., Wasielesky Junior W. (2019). Acute toxicity of nitrate in *Litopenaeus vannamei* juveniles at low salinity levels. *Ciência Rural* 49:01:1-9.
- Panigrahi A., Saranyaa C., Sundarama M., Kannana S. R .V., Dasa R. R., Kumarb R S., Rajesha P., Otta S K. (2018). Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. *Fish and Shellfish Immunology* 81:329–337.
- Panigrahi A., Das R. R., Sivakumar M. R., Saravanan A., Saranya C., Sudheer, N S., Vasagam K. P. L. K., Mahalakshmi P., Kannappan S., Gopikrishna G. (2020). Bio-augmentation of heterotrophic bacteria in biofloc system improves growth, survival, and immunity of Indian white shrimp *Penaeus indicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 98:477–487.
- Pereira C., Silva Y. J., Santos A. L., Cunha A., Gomes N. C. M., Almeida A. (2011). Bacteriophages with Potential for Inactivation of Fish Pathogenic Bacteria: Survival, Host Specificity and Effect on Bacterial Community Structure. *Marine Drugs* 9:2236-2255.
- Pinto P. H. O., Rocha J. L., Figueiredo J. P. V., Carneiro R. F. S., Damian C., Oliveira L., Seiffert W. Q. (2020). Culture of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc technology system using artificially salinized freshwater: Zootechnical performance, economics and nutritional quality. *Aquaculture* 520:1-6.
- Rodrigues D. P., Ribeiro R .V., Alves R. M., Hofer E. (1993). Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88:4:589-592.

- Roy L. A., Davis D. A., Saoud I. P., Boyd C. A., Pine H. J., Boyd C. E. (2010). Shrimp culture in inland low salinity Waters: Reviews in Aquaculture 2:191–208.
- Sá M. V. C. (2012) Limnocultura: limnologia para aquicultura. Fortaleza: Edições UFC, 218 p.
- Salência H. R., Mouriño J. L. P., Ferreira G. S., Arantes R. F., Ubert M., Lapa K. R., Seiffert, W. Q. (2016). A bioaugmentation agent in super intensive marine shrimp farming system with zero water exchange, Journal of Aquaculture Research & Development 7:2:1-7.
- Samocha T. M., Patnaik S., Speed M., Ali A. M., Burger J. M., Almeida R. V., Ayub Z., Harisanto M., Horowitz, A., Brock, D. L. (2007). Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and growout systems for *Litopenaeus vannamei*. Aquacultural Engineering 36: 184-191.
- Santos N. B. V., Furtado P. S., César D. E., Wasielesky Jr. W. (2019). Assessment of the nitrification process in a culture of pacific white shrimp, using artificial substrate and bacterial inoculum in a biofloc technology system (BFT). Animal Production. Ciência Rural 49:6:1-10.
- Silva J. L. S. (2018). Domesticação do perifíton no cultivo de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2018. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Silva J. L. S., Cavalcante D. H., Carvalho F. C. T., Vieira R. H. S. F., Sá M. V. C., Sousa O. V. (2016). Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. Acta Scientiarum Animal Sciences, 38:3:233-241.
- Silva J. L. S., Rodríguez M. T. T., Sousa O. V. (2020). Efecto de la adición de bacterias nitrificantes autóctonas en la formación de bioflocos para la mejora de la calidad del agua de cultivo de organismos acuáticos. Brazilian Journal of Development 6:6:33870-33891.
- Soares D. C. E., Silva J. L. S., Abreu J. O., Sousa O. V. (2021). Preliminary evaluation of the use of bacteria isolated from the digestive tract of shrimp *Litopenaeus vannamei* as a source to accelerate the process of formation and development of bioflocs. Acta Scientiarum. Animal Sciences 43:1:1-7.
- Teather R.M., Wood P. J. (1982). Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. Applied and Environmental Microbiology 43:40:777-780.
- Zhang T., Fang H. H. P. (2001). Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. Applied Microbiology and Biotechnology 57:437-440.
- Yoshida K., Nasu Y., Shitami N., Toyoda H., Takemura H., Oomori K. (2009). A novel convenient method for high bacteriophage titer assay. Nucleic Acids Symposium Series 53:315-6.

