

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DO MAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E ECOLOGIA MARINHA E COSTEIRA

**EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE BIOFLOCOS SOBRE A  
DIVERSIDADE MICROBIANA EM SISTEMAS DE CULTIVO INTENSIVO  
DE CAMARÕES**

Fabrini Copetti

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, campus Baixada Santista, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Schweitzer

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo B. Gregoracci

C782e Copetti, Fabrini .  
Efeito de diferentes níveis de bioflocos sobre a diversidade microbiana em sistemas de cultivo intensivo de camarões. / Fabrini Copetti; Orientador Rodrigo Schweitzer; Coorientador Gustavo Bueno Gregoracci. -- Santos, 2020.  
40 p. ; 30cm

Dissertação (Mestrado - Pós Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira) -- Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, 2020.

1. bioflocos. 2. diversidade microbiana. 3. ecologia microbiana. 4. SST. 5. camarão. I. Schweitzer, Rodrigo, Orient. II. Título.

CDD 551.46

**ATA DA REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO / DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Câmara de Pós-Graduação e Pesquisa

**ATA DA REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Câmara de Pós-Graduação e Pesquisa

**ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E ECOLOGIA MARINHA E COSTEIRA**

Ao quarto dia do mês de agosto de 2020, às 09:00 horas, reuniu-se por videoconferência, a Comissão Julgadora para a DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO solicitada por **Fabrini Copetti Temistocles Menezes**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira, que apresentou tese sob o Título: *“Efeito de diferentes níveis de biofloccos sobre a diversidade microbiana em sistemas de cultivo intensivo de camarões”*.

A referida Comissão esteve constituída pelos Professores Doutores:

Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira - Professor - Laboratório de Camarões Marinhos - Universidade Federal de Santa Catarina;

Profa. Dra. Flávia Talarico Saia - Professora Adjunta - Departamento de Ciências do Mar - Universidade Federal de São Paulo;

Prof. Dr. Gustavo Fernandes Camargo Fonseca - Professor Adjunto - Departamento de Ciências do Mar - Universidade Federal de São Paulo;

O Presidente Prof. Dr. Rodrigo Schweitzer, inicia a sessão dando a palavra ao candidato, que dispõe de um período de tempo entre trinta e cinquenta minutos, para expor sua tese. A seguir dá a palavra aos Professores para a arguição. Cada examinador(a) dispõe de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o candidato para as respostas. Tendo o candidato respondido todas as arguições em tempo hábil os membros da Banca Examinadora, emitiram seus Pareceres:

Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira, \_\_\_\_\_ ( x ) aprovado ( ) reprovado

Profa. Dra. Flávia Talarico Saia, \_\_\_\_\_ ( x ) aprovado ( ) reprovado

Prof. Dr. Gustavo Fernandes Camargo Fonseca, \_\_\_\_\_ ( x ) aprovado ( ) reprovado

Em caso de reprovação, é necessária a apresentação de um parecer consubstanciado no espaço designado abaixo:

---

---

---

---

Eu, Rodrigo Schweitzer, orientador e presidente da banca, lavrei a presente Ata que segue por mim assinada e pelos demais membros da Banca Examinadora.

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera **Fabrini Copetti Temistocles Menezes** habilitado a receber o título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E ECOLOGIA MARINHA E COSTEIRA pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO.

E por estarem de acordo, assinam a presente ata.

São Paulo, 04/08/2020.

Sugestões e Observações:

A aprovação está vinculada a entrega da nova versão da dissertação com as correções indicadas pela banca examinadora e revisada pelo orientador.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo do Nascimento Crispim, Administrador**, em 19/08/2020, às 00:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Schweitzer, Docente**, em 19/08/2020, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no



art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Fernandes Camargo Fonseca, Chefe de Departamento**, em 19/08/2020, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia Talarico Saia, Docente**, em 19/08/2020, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe do Nascimento Vieira, Usuário Externo**, em 19/08/2020, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2015/Decreto/D8539.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Decreto/D8539.htm)

A autenticidade deste documento pode ser conferida [através do endereço: https://sei.unifesp.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifesp.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0) informando o código verificador **0404111** e o código CRC **DA550D2D**.

## Resumo

A sociedade poderá sofrer com a falta de alimento se não aprimorarmos os sistemas de cultivo. Por esse motivo, sistemas de produção de alimento, como os sistemas aquícolas, têm avançado na eficiência dos seus processos. Esses avanços abrangem principalmente menor utilização de espaço, menor consumo de água e minimização na geração de efluentes. No sistema de bioflocos, por exemplo, a remoção de compostos nitrogenados tóxicos não é realizada através da troca de água, sendo mediada por bactérias. Contudo, o acúmulo dessas bactérias, que crescem formando flocos microbianos, prejudica os animais cultivados e é necessária a remoção parcial dos bioflocos por decantação. Por remover biomassa de microrganismos e alterar a disponibilidade de nutrientes por célula bacteriana, a decantação pode modificar a estrutura da comunidade microbiana e afetar o desempenho dos animais cultivados. Esse trabalho teve como objetivo avaliar se a manutenção de diferentes níveis de bioflocos nos tanques de cultivo modifica a estrutura da comunidade microbiana e afeta o desempenho dos camarões cultivados. Foram testados dois níveis de sólidos suspensos totais (SST), variável usada para quantificar os bioflocos: T700 (724 mg L<sup>-1</sup>) e T500 (514 mg L<sup>-1</sup>). Os camarões foram cultivados por 50 dias em densidade de estocagem de 906 camarões m<sup>-3</sup> com sobrevivências próximas de 90%. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o desempenho zootécnico dos animais e para as variáveis de qualidade de água. Maior riqueza de espécies foi observada para o tratamento T700, e a estrutura da comunidade microbiana foi significativamente diferente entre os tratamentos e semanas de cultivo. Maior ocorrência de bactérias oportunistas, e. g. *Vibrios*, foi observada no T500. Os resultados demonstram que a manutenção de diferentes níveis de bioflocos nos tanques de cultivo modifica a estrutura da comunidade microbiana. Sistemas de cultivo com níveis de SST próximos de 700 mg L<sup>-1</sup> podem ser considerados mais seguros do ponto de vista microbiológico, ou seja, são menos susceptíveis a ocorrência de bactérias oportunistas potencialmente patogênicas (e.g. *Vibrios*) do que tanques com sólidos próximos de 500 mg L<sup>-1</sup>.

### Palavras chaves

Bioflocos, diversidade microbiana, ecologia microbiana, SST, camarão.

## **Abstract**

*Society may suffer from a lack of food if we do not improve farming systems. For this reason, food production systems, such as aquaculture systems, have advanced in the efficiency of their processes. These advances mainly include less use of space, less water consumption and minimization in the generation of effluents. In the biofloc system, for example, the removal of toxic nitrogenous compounds is not carried out through the exchange of water, being mediated by bacteria. However, the accumulation of these bacteria, which grow to form microbial flakes, harms cultivated animals and partial removal of bioflocs by settling is necessary. By removing biomass from microorganisms and altering the availability of nutrients per bacterial cell, settling can modify the structure of the microbial community and affect the performance of cultivated animals. This work aimed to evaluate whether the maintenance of different levels of biofloc in the cultivation tanks changes the structure of the microbial community and affects the performance of the cultivated shrimp. Two levels of total suspended solids (TSS) were tested, a variable used to quantify the bioflocs: T700 (724 mg L<sup>-1</sup>) and T500 (514 mg L<sup>-1</sup>). The shrimps were grown for 50 days at a stocking density of 906 shrimps m<sup>-3</sup> with survival close to 90%. There were no significant differences between treatments for the animals' zootechnical performance and for water quality variables. Greater species richness was observed for the T700 treatment, and the structure of the microbial community was significantly different between treatments and cultivation weeks. Greater occurrence of opportunistic bacteria, e. g. *Vibrios*, was observed in the T500. These results demonstrate that the maintenance of different levels of bioflocs in the culture tanks modifies the structure of the microbial community. Culture systems with TSS levels close to 700 mg L<sup>-1</sup> can be considered safer from a microbiological point of view, that is, they are less susceptible to the occurrence of potentially pathogenic opportunistic bacteria (e.g. *Vibrios*) than tanks with solids close to 500 mg L<sup>-1</sup>.*

## **Keywords**

*Bioflocs, microbial diversity, microbial ecology, TSS, shrimp,*

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Sólidos suspensos totais (SST) e somatório de decantações realizadas por semana em tanques de *L. vannamei* cultivados sob duas concentrações de SST durante 50 dias em densidade de estocagem de 906 camarões m<sup>-3</sup>. Valores de SST são média ± desvio padrão, T700 (□) e T500 (○). Somatório de decantações por semana, T700 (▼); T500 (▲).

**Figura 2.** Escalonamento Multidimensional Não Métrico (nMDS) baseado na similaridade de Bray-Curtis das abundâncias de amostras com diferentes concentrações de sólidos suspensos totais: T700 (▲) e T500 (▼); números acima dos símbolos indicam a data de coleta por amostra.

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Variáveis de qualidade de água nos tanques de cultivo de *L. vannamei* cultivados por 50 dias em densidade de 906 camarões m<sup>-3</sup> sob duas concentrações de sólidos suspensos totais.

**Tabela 2.** Desempenho zootécnico nos tanques de *L. vannamei* cultivados por 50 dias em densidade de 906 camarões m<sup>-3</sup> sob duas concentrações de sólidos suspensos totais.

**Tabela 3.** Abundância relativa (porcentagem) dos gêneros mais abundantes (abundância > 1%) presente nos tratamentos com níveis diferentes de sólidos suspensos totais. Todos os grupos pertencentes ao domínio *Bacteria*.

**Tabela 4.** Resumo dos descritores da comunidade microbiana dos tratamentos com diferentes níveis de sólidos suspensos totais.

## **Siglas**

**CS**, Capacidade de suporte; **BFT**, Sistema de cultivo com bioflocos; **FCR**, Taxa de conversão alimentar; **NAT**, Nitrogênio amoniacal total; **nMDS**, escalonamento multidimensional não métrico; **OTU**, Unidade taxonômica operacional; **PCR**, reação em cadeia por polimerase; **PL**, Pós-larva, **RAS**, Sistema de recirculação de aquicultura; **SST**, Sólidos suspensos totais.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>5</b>
2.1. <i>Material biológico</i> .....	<b>5</b>
2.2. <i>Condições experimentais e amostragem</i> .....	<b>6</b>
2.3. <i>Variáveis de qualidade de água</i> .....	<b>7</b>
2.4. <i>Desempenho dos camarões</i> .....	<b>8</b>
2.5. <i>Análise da comunidade microbiana</i> .....	<b>8</b>
2.6. <i>Análise Estatística</i> .....	<b>9</b>
<b>3. Resultados</b> .....	<b>11</b>
3.1. <i>Variáveis de qualidade de água</i> .....	<b>11</b>
3.2. <i>Desempenho zootécnico</i> .....	<b>12</b>
3.3. <i>Diversidade e estrutura da comunidade microbiana</i> .....	<b>13</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>16</b>
4.1. <i>Desempenho zootécnico</i> .....	<b>16</b>
4.2. <i>Diversidade da comunidade microbiana</i> .....	<b>16</b>
4.3. <i>Composição da comunidade microbiana</i> .....	<b>17</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>21</b>
<b>6. Agradecimentos</b> .....	<b>22</b>
<b>7. Referências</b> .....	<b>23</b>

## 1. Introdução

A criação de estratégias de cultivo ambientalmente sustentáveis é um dos desafios que o setor aquícola vem enfrentando para aumentar a oferta de alimentos (FAO, 2020). Os sistemas utilizados atualmente apresentam problemas como o uso elevado de área e de água, além da alta geração de efluentes (Edwards 2015; FAO, 2020). Por isso, tem-se pesquisado sistemas de cultivo que solucionem esses problemas simultaneamente, como o sistema de recirculação de aquicultura (RAS) e o sistema de cultivo com bioflocos (BFT) (Attramadal *et al.* 2012; Crab *et al.* 2012; Schweitzer *et al.* 2018).

Sistemas como RAS e BFT se assemelham por compartilharem algumas características de produção e vantagens ambientais; e. g.: uso de espaço reduzido, densidades de estocagem elevadas, taxa de aeração elevada, ciclagem das excretas dos organismos cultivados (e.g. amônia) pelos microrganismos (Ebeling *et al.* 2006) e baixa troca de água do sistema (Attramadal *et al.* 2012; Browdy *et al.* 2001). Contudo, enquanto os microrganismos crescem aderidos a mídias dentro de biofiltros no sistema RAS, no sistema BFT a microbiota é mantida em suspensão na água do tanque e cresce formando flocos microbianos (bioflocos), que servem de alimento para os animais cultivados (Avnimelech 2007; Bossier *et al.* 2016; De Schryver *et al.* 2008; Wei *et al.* 2016). Ainda que os microrganismos sejam essenciais para o sistema BFT, o excesso de bioflocos precisa ser removido com frequência já que níveis elevados obstruem as brânquias dos animais cultivados (Schweitzer *et al.* 2013).

Embora apresentem vantagens importantes, tanto no RAS quanto no sistema BFT a ocorrência de bactérias patogênicas provoca mortalidade em espécies de peixes e crustáceos em diferentes estágios de produção (Krummenauer *et al.* 2014; Skjermo e Vadstein, 1999; Toranzo *et al.* 2005; Tran *et al.* 2013). Essas bactérias patogênicas, em

sua maioria, são oportunistas e podem ser caracterizadas a partir do conceito ecológico de seleção *r/k* como tendo biomassa instável próxima da capacidade de suporte microbiana do sistema, crescimento rápido sob condições apropriadas, baixa competitividade sob baixos níveis de nutrientes, mortalidade dependente da densidade microbiana e baixa afinidade por substratos (Vadstein *et al.* 2013). Um exemplo importante desses microrganismos *r*-estrategistas são as bactérias do gênero *Vibrio* (Vadstein *et al.* 2013). Mudanças nas condições de cultivo podem perturbar a comunidade microbiana e favorecer o crescimento desses oportunistas, o que pode causar altas taxas de mortalidade no cultivo (Johnson *et al.*, 2008; Tran *et al.* 2013), principalmente quando os animais cultivados são submetidos a situações de estresse (Vadstein *et al.*, 1993). Devido à ocorrência desses surtos, estratégias de manejo para controlar a presença ou a atividade desses microrganismos patogênicos oportunistas vêm sendo desenvolvidas (Bentzon-Tilia, 2016; Bossier *et al.*, 2016; Plante, 2017; De Schryver e Vadstein, 2014).

Uma dessas estratégias de controle, relacionada à ecologia desses sistemas, consiste em estabelecer uma comunidade microbiana estável (madura) através de manejos que favoreçam a seleção de bactérias *K*-estrategistas na comunidade microbiana (Vadstein *et al.*, 2018). Esses microrganismos são caracterizados pela baixa taxa de crescimento, biomassa estável próxima da capacidade de suporte microbiana, crescimento lento, boa habilidade competitiva em baixo suprimento de nutrientes, mortalidade independente da densidade e alta afinidade pelo substrato (Vadstein *et al.* 2018). Nessa estratégia, manipular a estabilidade da comunidade microbiana de forma a aumentar a proporção de bactérias *K*-estrategistas pode reduzir a densidade de bactérias patogênicas oportunistas *r*-estrategistas no sistema (Vadstein *et al.*, 1993).

A principal pressão ecológica que interfere na estabilidade da comunidade microbiana é a flutuação na concentração de matéria orgânica no sistema, que está diretamente associada com o conceito de capacidade de suporte (CS). A capacidade de suporte equivale à biomassa da comunidade suportada pelo conjunto de nichos (nutrientes disponíveis/densidade microbiana) do sistema (Blancheton *et al.* 2013), ou seja, o número máximo de bactérias que pode ser sustentado no sistema ao longo do tempo (Vadstein *et al.* 1993). Esse conceito prevê que sistemas de cultivo com biomassa microbiana próxima de sua CS leva a ausência de novos nichos e privilegia bactérias *K*-estrategistas (Vadstein *et al.* 2018). No sistema RAS essa pressão ecológica pode ser controlada reduzindo-se a quantidade de nutrientes no sistema através da constante remoção de restos de ração e fezes dos tanques de cultivo (Skjermo e Vadstein, 1999). Segundo os mesmos autores, outra estratégia seria manipular a área disponível para a colonização nos biofiltros externos em que se encontram os microrganismos, mantendo a biomassa microbiana sempre próxima da CS. Esse conceito vem sendo testado no sistema RAS com resultados positivos em termos de sobrevivência das larvas e aumento na taxa de crescimento de animais cultivados (Attramadal *et al.*, 2012; Vadstein *et al.*, 1993; Vestrum *et al.* 2018), e pode ser uma alternativa para o manejo microbiano no sistema BFT.

No sistema BFT, a CS poderia ser alcançada mantendo-se a biomassa de microrganismos (bioflocos) próxima da quantidade máxima suportada pelo sistema. Todavia, a remoção de bioflocos é necessária para manter o nível de sólidos suspensos totais (SST) abaixo de  $800 \text{ mg L}^{-1}$ , nível considerado seguro para o cultivo de camarões (Schveitzer *et al.* 2013b). Dessa forma, uma alternativa para estabelecer uma comunidade com predominância de *K*-estrategistas seria manter o sistema de cultivo com

o nível máximo de SST tolerado pelos animais cultivados, evitando ao máximo as decantações e as conseqüentes perturbações geradas por esse processo. Nessa condição, podemos esperar que comunidades microbianas de sistemas com níveis maiores de biofloco, e portanto, mais próximos da capacidade de suporte, apresentariam maior diversidade e menor quantidade de bactérias *r*-estrategistas do que sistemas mantidos com níveis menores de sólidos.

Com isso, a proposta deste estudo foi avaliar se a manutenção de diferentes níveis de bioflocos nos tanques de cultivo modifica a estrutura da comunidade microbiana, o que poderia se refletir no desempenho dos camarões cultivados.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material biológico

Pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* com 10 dias de vida (PL<sub>10</sub>) livre de patógenos (*SpeedLine Pathogen Free*) que requeiram notificação pela Organização Internacional de Saúde Animal, foram adquiridas da Aquatec LTDA, Caguaratema, RN, Brasil. As PLs foram cultivadas em tanques pré-berçários em densidade de estocagem de 18 PLs L<sup>-1</sup> por 16 dias de acordo com os procedimentos estabelecidos por Schweitzer *et al.* (2017). A sobrevivência final nesta fase foi de 98%.

Após a fase de pré-berçário, as PLs foram cultivadas em densidade de estocagem de 940 PLs m<sup>-2</sup> em um tanque cilíndrico de 1 m<sup>2</sup> (tanque matriz) contendo substratos artificiais (Schweitzer *et al.*, 2018). O peso médio final dos camarões na despesca foi de 2,7 gramas e a sobrevivência final de 92%. Água marinha filtrada foi utilizada para abastecer o tanque matriz e durante o cultivo não houve troca de água. Glicerol foi adicionado ao tanque quando a concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) foi superior a 1 mg L<sup>-1</sup>. A dose de glicerol foi calculada baseado em Avnimelech (1999), assumindo que 20 g de carboidratos ou 6 g de carbono orgânico são necessários para converter 1 g de NAT em biomassa bacteriana (Samocho, 2007). A fertilização orgânica ocorreu até que o processo de nitrificação estivesse estabelecido, indicado pela queda de alcalinidade e pH da água e pelos baixos níveis de amônia e nitrito (Ebeling *et al.*, 2006). Nessa fase, adições diárias de hidróxido de cálcio foram necessárias para compensar a acidificação promovida pela nitrificação. Os camarões foram alimentados com ração comercial com teor proteico entre 38% e 40% (Guabi Nutrição e Saúde Animal, Campinas, SP, Brazil) (Guabi Potimar).

A temperatura e o oxigênio dissolvido na água dos tanques matriz foram mantidos em  $\sim 28^{\circ}\text{C}$  e  $\sim 6\text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. A concentração máxima de sólidos suspensos totais foi de  $\sim 700\text{ mg L}^{-1}$ ; salinidade da água em  $\sim 20\text{ g L}^{-1}$ ; pH entre 7,5 e 8,0; alcalinidade entre 100 e 250 ( $\text{mg CaCO L}^{-1}$ ). As concentrações médias de amônia (NAT) e de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ) foram  $0,19\text{ mg L}^{-1}$  e  $0,17\text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

## *2.2. Condições experimentais e amostragem*

Um experimento de 50 dias foi conduzido para estudar a comunidade microbiana em tanques de cultivo de camarões submetidos a diferentes concentrações de bioflocos, expressos como SST na água. Duas diferentes concentrações de SST foram estudadas: tanques com SST médio em torno de  $500\text{ mg L}^{-1}$  (T500) e tanques com SST médio em torno de  $700\text{ mg L}^{-1}$  (T700). Cada tratamento contou com três repetições, que foram povoadas com 29 camarões de 2,7 g oriundos do tanque matriz e estocados em uma densidade de  $906\text{ animais m}^{-3}$ .

A água usada para abastecer as unidades experimentais foi transferida do tanque matriz no mesmo dia do início do experimento. Essa água apresentava concentração de SST próxima de  $700\text{ mg L}^{-1}$ , dessa forma, nesse mesmo dia foi realizada a decantação dos flocos para o tratamento T500, visando ajustar os níveis de sólidos de acordo com os valores estabelecidos no tratamento. Amostras para análise microbiana foram coletadas semanalmente em cada unidade experimental, totalizando 60 amostras.

As unidades experimentais consistiram de tanques de 32 L (0,45 m de comprimento x 0,32 m de largura). A aeração dos tanques foi confeccionada com mangueiras porosas, que mantiveram os sólidos em suspensão e a concentração de oxigênio em níveis apropriados. A temperatura da água foi mantida em  $29^{\circ}\text{C}$  com

aquecedores submersíveis de 50 W controlados por termostatos. Os tanques foram mantidos em uma sala isolada e receberam apenas iluminação artificial com um fotoperíodo de 12h/12h. Tanques de decantação foram usados para reduzir a concentração de bioflocos. No T500, isso ocorreu quando os SST superavam  $450 \text{ mg L}^{-1}$ , e no T700 quando o nível de sólidos foi maior que  $800 \text{ mg L}^{-1}$ . Após a decantação, a água livre de sólidos era devolvida para o respectivo tanque de cultivo.

Uma ração com teor proteico de 35% (Guabi Nutrição e Saúde Animal, Campinas, SP, Brazil) (Guabi Potimar) foi oferecida aos camarões quatro vezes ao dia entre 8h e 18h. Entre 5 e 10% de cada refeição era colocada em bandejas de checagem para avaliar o consumo e ajustar a quantidade. A alcalinidade da água foi ajustada através da adição de cal hidratada. Não houve troca de água durante o cultivo, apenas adição de água doce para compensar a evaporação.

### *2.3. Variáveis de qualidade de água*

O oxigênio e a temperatura da água foram medidos utilizando uma sonda YSI 550A (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA). Um pHmetro (PHB-500, IONLAB, Araucária, PR, Brazil) e um refratômetro (RHS-10, YHequipment, Shenzhen, China) foram usados para medir o pH e a salinidade, respectivamente. Alcalinidade (2320 B) e SST (2540 D) foram analisados de acordo com APHA (2005). SST foram medidos utilizando microfiltros de fibra de vidro de  $0.6\text{-}\mu\text{m}$  (GF-6, Macherey-Nagel, Duren, Germany). As análises de amônia e nitrito foram realizadas utilizando um espectrofotômetro seguindo os métodos descritos por Koroleff (1969) e Bendschneider e Robdon (1952), respectivamente.

#### 2.4. Desempenho dos camarões

Peso médio final (g), ganho de peso semanal ( $\text{g semana}^{-1}$ ), sobrevivência (%), biomassa final ( $\text{kg m}^{-3}$ ) e a taxa de conversão alimentar (FCR) foram usados para avaliar o desempenho dos animais. A biomassa inicial foi subtraída da biomassa final no cálculo da conversão alimentar. Quinzenalmente, sete camarões foram amostrados em cada unidade experimental para determinação do crescimento. Após a pesagem, os camarões foram devolvidos para seus respectivos tanques.

#### 2.5. Análise da comunidade microbiana

As amostras para caracterização da estrutura da comunidade microbiana da água foram determinadas pelo sequenciamento de alta performance e bioinformática, com anotação até o nível de gênero. Aproximadamente 50 ml de água dos tanques foram retirados por seringa para cada amostra, imediatamente antes da primeira alimentação do dia dos camarões, filtrados com filtro *Sterivex* ( $0,22 \mu\text{m}$ ), acondicionados com 1.8 mL de tampão TE (50 mM Tris-50 mM EDTA) e armazenados em freezer a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até a extração.

As amostras foram lisadas dentro do filtro *Sterivex* e transferidas para tubos depois da lise. As células sofreram a lise com a adição de 50  $\mu\text{L}$  SDS a 20% de concentração e 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K (Machery-Nagel™) e incubação a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  por 60 min. O DNA foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com etanol. A concentração de DNA ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) e a pureza ( $A_{260/280}$ ,  $A_{260/230}$ ), almejando a melhor performance para a reação em cadeia por polimerase (PCR) foram medidas pelo NanoDrop 2000 Spectrophotometer® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) após a extração.

As amostras foram amplificadas para o gene de RNA ribossomal 16S (16S rDNA), cuja sequência alvo foram as regiões hipervariáveis V3-V4, utilizando *primers* já contendo adaptadores comerciais para sequenciamento (Klindworth, 2013) utilizando protocolos já estabelecidos comercialmente (Illumina). Os produtos de PCR (~460 bp) com adaptadores foram quantificados e verificados por fluorescência (Qubit), eletroforese capilar (Bioanalyzer) e PCR em tempo real (Kappa/Life), já constituindo as bibliotecas. A amplificação e o sequenciamento foram realizados pela plataforma MiSeq do Illumina, segundo protocolos do fabricante, através de prestação de serviços do Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP Piracicaba.

A distinção entre barcodes foi realizada por software dedicado da Illumina. Sequências curtas (< 75bp) foram removidas, e as sequências brutas foram cortadas dinamicamente usando SolexaQA ++ (Cox *et al.* 2010), usando parâmetros padrão. As extremidades emparelhadas foram reorganizadas com o PAIRFQ (programa de licença aberta) e juntas com o PANDASEQ (Masella *et al.*, 2012). Réplicas de *reads* idênticas foram agrupadas através do comando *grep* no prompt de comando. SWARM foi usado para agrupar os *reads* em OTUs (Mahé, 2014). Finalmente, o Mothur 1.36, uma ferramenta de bioinformática para análise de sequências do gene 16S rRNA, conforme descrito por (Schloss *et al.*, 2009), foi usada para anotação (*classify.seqs*) contra o banco de dados Silva SSU (v1.32) (Quast *et al.*, 2012), corretamente formatado e disponibilizado pelo Mothur.

## 2.6. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram conduzidos com um nível de confiança de 95% ( $p = 0,05$ ). Dados de desempenho zootécnico e variáveis de qualidade de água foram

analisados pela ANOVA unifatorial. Normalidade e homocedasticidade foram avaliadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Dados de sobrevivência sofreram transformação angular antes da análise.

Descritores univariados da comunidade microbiana (riqueza, diversidade e equidade) normalizada pela amostra com menor número de *reads* foram analisados pela ANOVA bifatorial. Análise de variância permutacional (PERMANOVA) (Anderson, 2008) baseada em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis foi aplicada para avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo sobre a composição da comunidade microbiana. A ordenação dos dados multivariados foi realizada utilizando-se o escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) baseado na similaridade de Bray-Curtis.

As análises de dados foram conduzidas usando os programas STATISCA (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), PAST v.4,03 (Hammer et al., 2001), e PRIMER v.6 (Clarke and Gorley, 2006) com o pacote PERMANOVA1 (Anderson et al., 2008).

### 3. Resultados

#### 3.1. Variáveis de qualidade de água

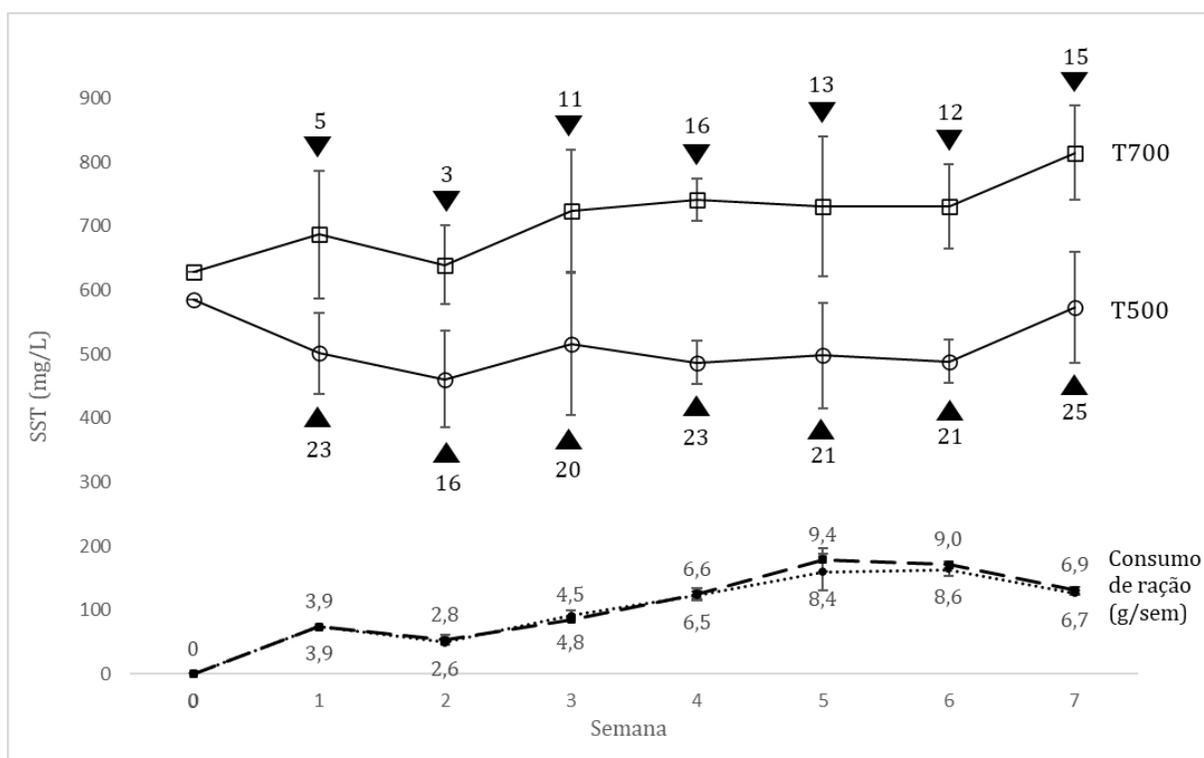
Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis de qualidade de água entre os dois tratamentos (Tabela 1). A exceção ocorreu para os SST, que foram maiores no tratamento T700 (Figura 1).

**Tabela 1.** Variáveis de qualidade de água nos tanques de cultivo de *L. vannamei* cultivados por 50 dias em densidade de 906 camarões m<sup>-3</sup> sob duas concentrações de sólidos suspensos totais.

Parâmetros	T700	T500
Temperatura (°C)	29,5 ± 0,2	29,3 ± 0,3
OD (mg L <sup>-1</sup> )	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1
Salinidade	20 ± 0	20 ± 0
pH	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	140,3 ± 3,6	153,6 ± 1,7
Amônia (mg TAN L <sup>-1</sup> )	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Nitrito (mg NO <sub>2</sub> —N L <sup>-1</sup> )	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	724 ± 43 <sup>a</sup>	514 ± 9 <sup>b</sup>

Valores são por média ± desvio padrão.

Médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, P < 0,05)



**Figura 1.** Sólidos suspensos totais (SST) e somatório de decantações realizadas por semana em tanques de *L. vannamei* cultivados sob duas concentrações de SST durante 50 dias em densidade de estocagem de 906 camarões  $m^{-3}$ . Valores de SST são média  $\pm$  desvio padrão, T700 ( $\square$ ) e T500 ( $\circ$ ). Somatório de decantações por semana, T700 ( $\blacktriangledown$ ); T500 ( $\blacktriangle$ ).

### 3.2. Desempenho zootécnico

Não foram observadas diferenças significativas no desempenho zootécnico dos camarões (Tabela 2).

**Tabela 2.** Desempenho zootécnico nos tanques de *L. vannamei* cultivados por 50 dias em densidade de 906 camarões  $m^{-3}$  sob duas concentrações de sólidos suspensos totais.

Variável/Tratamento	T700	T500
Média do Peso Final (g)	6,7 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,5
Ganho de peso (g semana <sup>-1</sup> )	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1
Sobrevivência (%)	90,8 $\pm$ 2,0	90,8 $\pm$ 10,5
Biomassa final	177,3 $\pm$ 3,9	166,2 $\pm$ 28,7
Conversão alimentar	2,8 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,6

Valores são média  $\pm$  desvio padrão. Peso médio inicial dos camarões: 2,67  $\pm$  0,01 g.

### 3.3. Diversidade e estrutura da comunidade microbiana

O número máximo de OTUs encontradas nas amostras analisadas foi de 1768, e o número de *reads* variou entre 78365 e 135429. As abundâncias médias dos tratamentos, depois de os dados serem normalizados e arredondados, foram de  $78418,3 \pm 28,7$  para T700 e  $78397 \pm 27,2$  para o T500. Apenas dezessete gêneros ocorreram com abundâncias maiores que 1% (Tabela 3).

Dos índices ecológicos analisados, foram observados efeitos significativos do nível de sólidos para riqueza, em que tanques com níveis de SST menores apresentaram menor riqueza (Tabela 4). A riqueza também foi afetada pelo tempo e de maneira geral, houve redução desse índice do início para o fim do cultivo (dados não apresentados).

**Tabela 3.** Abundância relativa (porcentagem) dos gêneros mais abundantes (abundância > 1%) presentes nos tratamentos com níveis diferentes de sólidos suspensos totais. Todos os grupos pertencentes ao domínio *Bacteria*.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	T700	T500
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>uncultured</i>	$10,1 \pm 5,8$	$9,1 \pm 5,4$
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Caldilineales</i>	<i>Caldilineaceae</i>	<i>uncultured</i>	$9,9 \pm 6,0$	$5,5 \pm 3,7$
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	PeM15	PeM15_fa	PeM15_ge	-	$3,0 \pm 4,1$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>	$1,3 \pm 0,6$	$2,1 \pm 1,3$
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Chitinophagales</i>	<i>Saprospiraceae</i>	<i>Phaeodactylibacter</i>	$2,4 \pm 2,6$	$2,1 \pm 2,5$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Psychromonadaceae</i>	<i>Motilimonas</i>	$2,0 \pm 0,82$	$2 \pm 0,7$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Donghicola</i>	$2,0 \pm 3,8$	$1,5 \pm 2,8$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	PB19	PB19_fa	PB19_ge	$1,0 \pm 1,0$	$1,4 \pm 1,4$
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Aurantivirga</i>	-	$1,3 \pm 1,5$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>	-	$1,2 \pm 1,5$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>uncultured</i>	-	$1,2 \pm 0,7$
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Tamlana</i>	-	$1,1 \pm 0,6$
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Cyclobacteriaceae</i>	<i>Cyclobacterium</i>	-	$1,1 \pm 2,7$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Litorisediminivivens</i>	$1,1 \pm 1,2$	$1,1 \pm 1,4$
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	SBR1031	A4b	A4b_ge	$1,2 \pm 0,9$	$1,0 \pm 0,8$
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Maliponia</i>	$1,6 \pm 1,9$	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacteraceae_ge</i>	$1,6 \pm 2,7$	-

**Tabela 4.** Resumo dos descritores da comunidade microbiana dos tratamentos com diferentes níveis de sólidos suspensos totais.

Índices	Tratamento		ANOVA		
	T700	T500	SST	Tempo	SST x T
Riqueza	1033,3 ± 47,9	994 ± 64,8	<b>0,033763</b>	<b>0,000915</b>	0,373215
Equidade	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,02	0,540923	0,914916	0,486783
Diversidade (Chao-1)	1261,7 ± 190,6	1264,2 ± 201,0	0,979682	0,174524	0,494757

Valores são média ± desvio padrão.

Valores em negrito sustentam efeito significativo (ANOVA).

Os resultados da PERMANOVA demonstraram que o nível de sólidos afetou significativamente a estrutura da comunidade microbiana (Tabela 5). Da mesma forma, houve efeito significativo do tempo de cultivo em que a estrutura da comunidade microbiana foi modificada do início para o fim do cultivo, independentemente do nível de sólido testado (Tabela 5).

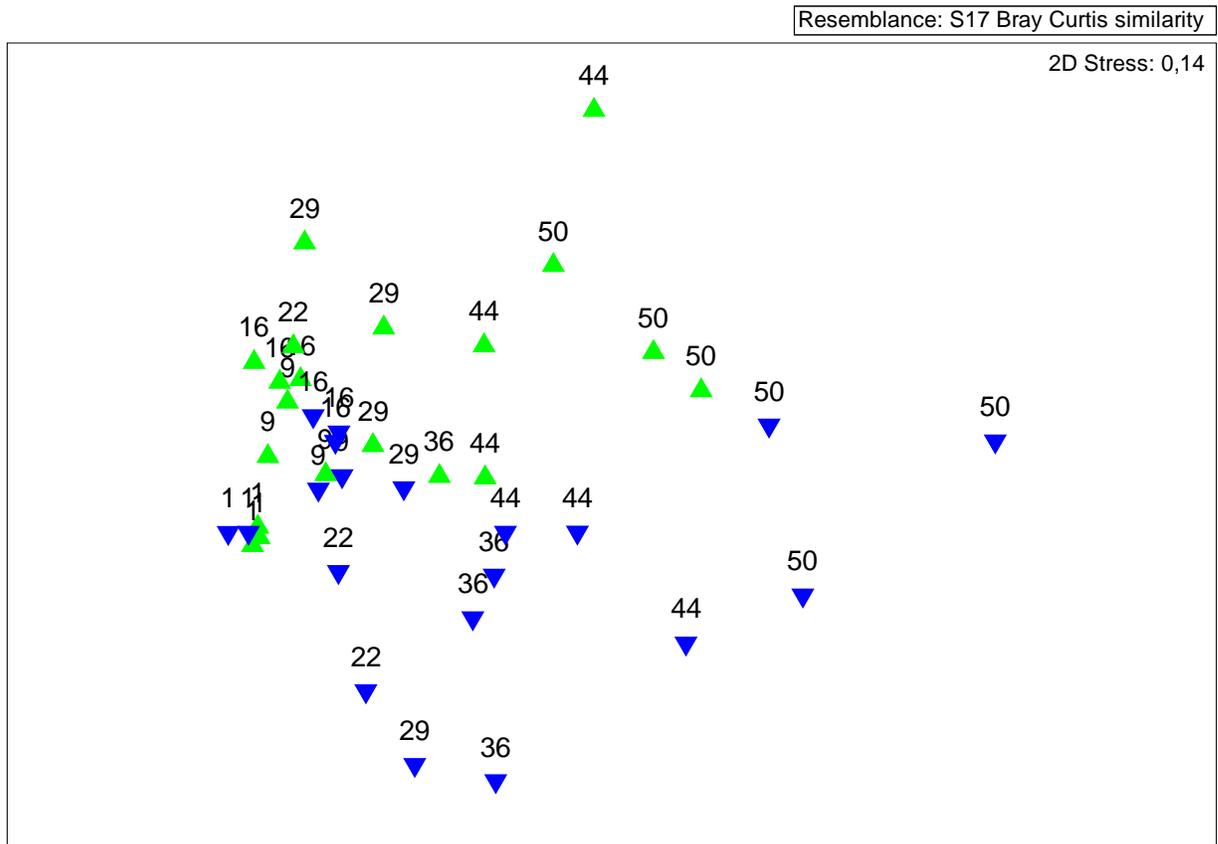
**Tabela 5.** Resultado da análise de variância multivariada da microbiota das amostras com diferentes níveis de sólidos (SST) ao longo de 50 dias de cultivo.

Descritor	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Perm.	Comparação
SST	1	3140	3140	5,0251	<b>0,001</b>	997	<b>T700 ≠ T500</b>
Dias de cultivo	7	23101	3300,1	5,2813	<b>0,001</b>	997	
SST x Dias	7	5710,1	815,72	1,3054	0,067	997	
Res	24	14997	624,86				
Total	39	48433					

Valores em negrito indicam efeito significativo.

O nMDS mostrou uma nítida separação das amostras com diferentes níveis de SST e entre os dias de cultivo (Figura 2). Dos organismos com abundância maior que 1%, nove gêneros (52,9%) estiveram presentes nos dois tratamentos (Tabela 3). Em

termos de abundância de *reads*, esses nove gêneros representaram  $34,5\% \pm 0,1$  de todos os *reads* (considerando todos os dados; Tabela 3). Por outro lado, seis gêneros ocorreram somente no tratamento T500 (35,3%) e dois gêneros somente no tratamento T700 (11,8%) (Tabela 3).



**Figura 2.** Escalonamento Multidimensional Não Métrico (nMDS) baseado na similaridade de Bray-Curtis das abundâncias de amostras com diferentes concentrações de sólidos suspensos totais: T700 (▲) e T500 (▼); números acima dos símbolos indicam a data de coleta por amostra.

## 4. Discussão

### 4.1. Desempenho zootécnico

Os índices zootécnicos dos animais cultivados foram parecidos entre os tratamentos, sugerindo que as alterações na comunidade microbiana não foram suficientes para afetar de forma significativa o desempenho dos organismos. Porém, apesar de a sobrevivência média ter sido alta para os dois tratamentos e não haver diferença significativa entre os tratamentos, o desvio padrão do T500 foi cinco vezes maior do que no T700. Surtos de mortalidade no cultivo de camarões acompanham a desestruturação da microbiota principal (*core microbiota*) presente no intestino dos camarões, tornando-a mais heterogênea devido a processos predominantemente estocásticos (Yao *et al.* 2018). No presente estudo, a maior variabilidade na sobrevivência dos camarões do T500 pode estar associada com as alterações da estrutura da comunidade microbiana, especificamente com a maior presença de bactérias oportunistas no T500 (discutido no tópico 4.3).

### 4.2. Diversidade da comunidade microbiana

Uma das hipóteses do trabalho era de que o aumento na quantidade de bioflocos se refletiria em maior diversidade e equidade de espécies. A riqueza de espécies foi maior no tratamento T700 e isso pode estar associado com a maior presença de espécies raras nesse tratamento (espécies com número baixo de *reads*, dados não apresentados). Frequências maiores de decantação diminuíram o tempo de residência das células bacterianas nos tanques, assim o tratamento T500, que realizou mais decantações apresentou menos espécies raras e conseqüentemente menos abundância total de espécies. Porém, não foram observadas diferenças significativas na diversidade (Chao-

<sup>1)</sup> e na equidade entre os tratamentos. Ainda assim, os dados mostraram diferença para os tratamentos na estrutura da comunidade microbiana entre os tratamentos.

#### 4.3. *Composição da comunidade microbiana*

Nossos dados mostram que a estrutura da comunidade microbiana foi diferente entre tanques submetidos a diferentes intensidades de sedimentação. Em parte, essa diferença pode estar associada à própria decantação (sedimentação), que é um processo seletivo de remoção de bioflocos (Schveitzer *et al.* 2020). Esses autores concluíram que a sedimentação modifica a estrutura da comunidade microbiana já que remove partículas densas de floco, que tem composição diferente daquela encontrada em flocos de menor densidade. Como os tanques do T500 sofreram maior número de decantações e, portanto, maior taxa de remoção de flocos densos, seria esperado uma diferença na composição de espécies em relação aos tanques do T700.

Além disso, a perturbação promovida por frequentes decantações aumenta a diferença entre a biomassa microbiana do sistema e sua capacidade de suporte, podendo desestabilizar a comunidade microbiana ao longo do tempo (Vadstein *et al.* 1993). A decantação reduz a densidade de bactérias e conseqüentemente, aumenta a disponibilidade de nutrientes por célula bacteriana (relação alimento/microrganismo). Esse ambiente enriquecido, com espaço para colonização, favorece espécies oportunistas *r*-estrategistas de rápido crescimento (e.g. *Vibrios*), que são eficientes em colonizar novos nichos criados tanto pelo aumento do suprimento de nutrientes quanto pela redução do número de competidores. Nos tanques do T500, com menos bioflocos e, portanto, mais distantes da capacidade de suporte microbiana do sistema, o ambiente ecológico criado favoreceu a proliferação de organismos oportunistas *r*-estrategistas

(discutido abaixo). Por outro lado, no tanques com maior quantidade de bioflocos (T700), em que a população está mais próxima da capacidade de suporte do sistema, a ocorrência de bactérias *K*-estrategistas foi favorecida já que competem melhor em ambientes mais estáveis (menos perturbados) e limitados em nutrientes (Vadstein *et al.* 1993).

O ambiente de cultivo resultante do manejo nos tanques do T700 parece ter sido mais favorável a bactérias *K*-estrategistas. Por exemplo, observamos maior ocorrência de bactérias da família *Rhodobactereaceae*, que são colonizadores de biofilme e predominantemente *K*-estrategistas (Bruhn *et al.* 2007; Cardona *et al.* 2016; Xiong *et al.* 2018). Organismos dessa família também têm sido sugeridos como espécies probióticas em função da relação antagônica de crescimento com a família *Vibrionaceae* (Fjellheim *et al.* 2010; Pro-Garcia *et al.* 2014). Adicionalmente, são considerados organismos importantes no tratamento de água (Zheng *et al.* 2017), na promoção da saúde dos camarões cultivados (Cardona *et al.* 2016; Wang *et al.* 2014; Yao *et al.* 2018) e encontrados em maior abundância em intestino de camarões saudáveis do que em camarões doentes (Chen *et al.* 2017; Yao *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2016).

Nos tanques do T500, por outro lado, bactérias potencialmente patogênicas para o sistema ocorreram em maior proporção, e.g. as do gênero *Vibrio*. Víbrios são oportunistas *r*-estrategistas compostos por espécies comuns entre as bactérias patogênicas causadoras de doenças em peixes e camarões (Fjellheim *et al.* 2010; Sudheesh *et al.* 2012). Outros gêneros menos recorrentes no cultivo de camarões, mas problemáticos para outros organismos aquáticos cultivados ocorreram também no T500. Os gêneros *Tamlana* e *Aurantivirga*, por exemplo, da família *Flavobacteriaceae*, é um grupo representado por bactérias patogênicas para a aquicultura (Farkas 1985;

Nematollahi *et al.* 2003; Starliper 2011; Wakabayashi *et al.* 1989). A espécie *Flavobacterium psychrophilum* é responsável pela CWD (*coldwater disease*), doença que causa a necrose de tecidos de trutas e salmonídeos (Starliper 2011), bem como o agente causador da RTSF (*rainbow trout fry syndrome*) (Vatsos *et al.* 2001). O gênero *Cyclobacterium* e a família *Pseudoalteromonadaceae* (gênero *Pseudoalteromonas* e uncultured), também mais abundantes no T500, pertencem ao um grupo de bactérias que geralmente são patogênicas (Huang *et al.* 2020; Xiong *et al.* 2018).

Durante o cultivo houve aumento na oferta de ração, elevando também a capacidade de suporte dos tanques já que parte dos nutrientes presentes na ração ficam disponíveis para os microrganismos. Como o nível de sólidos permaneceu constante nos tanques de cultivo, a diferença entre a biomassa de bactérias e a capacidade de suporte do sistema foi aumentando no tempo. Essa alteração, que modifica a disponibilidade de nutrientes por célula bacteriana e afeta a competição entre os microrganismos, pode ter sido o fator responsável pela mudança temporal na estrutura da comunidade. Apesar da mudança na composição de espécies entre as semanas de cultivo, no tratamento T700 não foi observada predominância de espécies patogênicas oportunistas, sugerindo que a perturbação gerada no sistema ao longo do tempo não foi suficiente para modificar o estado ecológico da comunidade.

Os resultados do presente estudo têm implicações práticas para o manejo de sistemas de cultivo com bioflocos. Tanques manejados com maiores níveis de bioflocos podem ser considerados mais seguros do ponto de vista microbiológico, ou seja, menos susceptíveis a ocorrência de bactérias oportunistas potencialmente patogênicas. Dessa forma, uma vez que o nível de sólidos seja adequado para o organismo alvo cultivado,

os sólidos devem ser mantidos em níveis elevados, evitando assim as frequentes decantações que perturbam o sistema.

## 5. Conclusão

Os resultados demonstram que a manutenção de diferentes níveis de bioflocos nos tanques de cultivo modifica a estrutura da comunidade microbiana. Sistemas de cultivo com níveis de sólidos suspensos totais próximos de 700 mg L<sup>-1</sup> possuem maior riqueza de espécies e são menos susceptíveis a ocorrência de bactérias oportunistas potencialmente patogênicas (e.g. *Vibrios*) do que tanques com sólidos próximos de 500 mg L<sup>-1</sup>.

## **6. Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa (CNPq, processo 447160/2014-1, Rodrigo Schweitzer). Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado no país (processo nº 2017/24583-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP) para Fabrini C. T. Menezes; e à FAPESP pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE) (processo nº 2019/17521-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP) para Fabrini C. T. Menezes. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES. Por fim, agradecemos ao Prof. Olav Vadstein da Norwegian University of Science and Technology/NTNU, em Trondheim/Noruega, pela oportunidade de estágio concedida para Fabrini C. T. Menezes.

## 7. Referências

- Anderson M J, Gorley R N, Clarke K R. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. Plymouth; 2008. 218 p.
- APHA (American Public Health Association). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st ed, Byrd Prepress, Washington 2005.
- Attramadal KJK, Salvesen I, Xue R, Øie G, Størseth TR, Vadstein O, et al. Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae. *Aquacultural Engineering*. janeiro de 2012;46:27–39.
- Avnimelech Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. junho de 1999;176(3–4):227–35.
- Avnimelech Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*. abril de 2007;264(1–4):140–7.
- Bendschneider K, e Robinson RJ. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*. 1952;11: 87-96.
- Bentzon-Tilia M, Sonnenschein EC, Gram L. Monitoring and managing microbes in aquaculture - Towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnology*. setembro de 2016;9(5):576–84.
- Blancheton JP, Attramadal KJK, Michaud L, d'Orbcastel ER, Vadstein O. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering*. março de 2013;53:30–9.
- Bossier P, De Schrijver P, Defoirdt T, Ruwandeepika HAD, Natrah F, Ekasari J, et al. Microbial Community Management in Aquaculture. *Procedia Food Science*. 2016;6:37–9.
- Browdy CL, Jory DE, World Aquaculture Society, organizadores. The new wave: proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. Baton Rouge, La: World Aquaculture Society; 2001. 375 p.

Bruhn JB, Gram L, Belas R. Production of Antibacterial Compounds and Biofilm Formation by Roseobacter Species Are Influenced by Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 de janeiro de 2007;73(2):442–50.

Cardona E, Gueguen Y, Magré K, Lorgeoux B, Piquemal D, Pierrat F, et al. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiology*. dezembro de 2016;16(1):157.

Chen W-Y, Ng TH, Wu J-H, Chen J-W, Wang H-C. Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Report*. dezembro de 2017;7(1):9395.

Clarke K, Gorley R N. *PRIMER v6: user manual/tutorial*. Plymouth; 2006. 192 p. (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research).

Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*. dezembro de 2010;11(1):485.

Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*. agosto de 2012;356–357:351–6.

Dahle SW, Bakke I, Birkeland M, Nordøy K, Dalum AS, Attramadal KJK. Production of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) in RAS with distinct water treatments: Effects on fish survival, growth, gill health and microbial communities in rearing water and biofilm. *Aquaculture*. maio de 2020;522:735097.

Defoirdt T. Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Rev Aquacult*. junho de 2014;6(2):100–14.

De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N, Verstraete W. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*. junho de 2008;277(3–4):125–37.

De Schryver P, Vadstein O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME Journal*. dezembro de 2014;8(12):2360–8.

Ebeling JM, Timmons MB, Bisogni JJ. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. junho de 2006;257(1–4):346–58.

Edwards P. Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*. outubro de 2015;447:2–14.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 [Internet]. FAO; 2020 [citado 20 de julho de 2020]. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>.

Farkas J. Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from fish with gill diseases in cold water. *Aquaculture*. janeiro de 1985;44(1):1–10.

Fjellheim AJ, Klinkenberg G, Skjermo J, Aasen IM, Vadstein O. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology*. julho de 2010;144(1–2):153–9.

Hammer Ø, Harper, DAT, Paul DR. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1).

Huang L, Guo H, Chen C, Huang X, Chen W, Bao F, et al. The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system. *Aquaculture*. junho de 2020;523:735159.

Johnson CN, Barnes S, Ogle J, Grimes DJ, Chang Y-J, Peacock AD, et al. Microbial Community Analysis of Water, Foregut, and Hindgut during Growth of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Closed-System Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*. abril de 2008;39(2):251–8.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 1º de janeiro de 2013;41(1):e1–e1.

Koroleff F. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Information on techniques and methods for seawater analysis*. 1970: 19-22.

Krummenauer D, Poersch L, Romano LA, Lara GR, Encarnação P, Wasielesky W. The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc Culture System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Aquaculture*. 2 de outubro de 2014;26(4):370–9.

Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F. Flavobacterium psychrophilum infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. outubro de 2003;26(10):563–74.

Plante CJ. Defining Disturbance for Microbial Ecology. *Microbial Ecology*. agosto de 2017;74(2):259–63.

Pinoargote G, Flores G, Cooper K, Ravishankar S. Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease: XXXX. *Aquac Res*. outubro de 2018;49(10):3270–88.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 27 de novembro de 2012;41(D1):D590–6.

Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Ali A-M, Burger JM, Almeida RV, et al. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*. março de 2007;36(2):184–91.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 1º de dezembro de 2009;75(23):7537–41.

Schweitzer R, Arantes R, Costódio PFS, do Espírito Santo CM, Arana LV, Seiffert WQ, et al. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*. setembro de 2013;56:59–70.

Schveitzer R, de Lorenzo MA, do Nascimento Vieira F, Pereira SA, Mouriño JLP, Seiffert WQ, et al. Nursery of young *Litopenaeus vannamei* post-larvae reared in biofloc- and microalgae-based systems. *Aquacultural Engineering*. agosto de 2017;78:140–5.

Schveitzer R, Fonseca G, Orteney N, Menezes FCT, Thompson FL, Thompson CC, et al. The role of sedimentation in the structuring of microbial communities in biofloc-dominated aquaculture tanks. *Aquaculture*. janeiro de 2020;514:734493.

Schveitzer R, Sabino Zanetti Leite T, Estér Orteney N, Copetti Temistocles Menezes F, Dias Medeiros I. Format and mode of artificial substrate fixation affect the performance of *Litopenaeus vannamei* in high-density rearing systems. *Aquaculture Research*. março de 2018;49(3):1357–62.

Skjermo J, Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*. julho de 1999;177(1–4):333–43.

Starliper CE. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research*. abril de 2011;2(2):97–108.

Sudheesh PS, Al-Ghabshi A, Al-Mazrooei N, Al-Habsi S. Comparative Pathogenomics of Bacteria Causing Infectious Diseases in Fish. *International Journal of Evolutionary Biology*. 2012;2012:1–16.

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. maio de 2005;246(1–4):37–61.

Tran L, Nunan L, Redman R, Mohny L, Pantoja C, Fitzsimmons K, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 9 de julho de 2013;105(1):45–55.

Vadstein O, Øie G, Olsen I, Salvesen I, Skjermo J, Reinertsen H. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. *International Conference of Fish Farming Technology*, organizadores. *Fish farming technology: proceedings of the*

First International Conference on Fish Farming Technology, Trondheim, Norway, 9 - 12 August 1993. Rotterdam: Balkema; 1993. 482 p.

Vadstein O, Bergh Ø, Gatesoupe F-J, Galindo-Villegas J, Mulero V, Picchiatti S, et al. Microbiology and immunology of fish larvae: Microbiology and immunology of fish larvae. *Rev Aquacult.* maio de 2013;5:S1–25.

Vadstein O, Attramadal KJK, Bakke I, Olsen Y. K-Selection as Microbial Community Management Strategy: A Method for Improved Viability of Larvae in Aquaculture. *Frontiers in Microbiology.* 14 de novembro de 2018;9:2730.

Vatsos IN, Thompson KD, Adams A. Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Lett Appl Microbiol.* 16 de setembro de 2001;33(3):178–82.

Vestrum RI, Attramadal KJK, Winge P, Li K, Olsen Y, Bones AM, et al. Rearing Water Treatment Induces Microbial Selection Influencing the Microbiota and Pathogen Associated Transcripts of Cod (*Gadus morhua*) Larvae. *Frontiers in Microbiology.* 1º de maio de 2018;9:851.

Wakabayashi H, Huh GJ, Kimura N. *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a Causative Agent of Bacterial Gill Disease of Freshwater Fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1º de julho de 1989;39(3):213–6.

Wang C, Lin G, Yan T, Zheng Z, Chen B, Sun F. The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fisheries Science.* setembro de 2014;80(5):1001–7.

Wei Y, Liao S-A, Wang A. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture.* dezembro de 2016;465:88–93.

Xiong J, Dai W, Qiu Q, Zhu J, Yang W, Li C. Response of host-bacterial colonization in shrimp to developmental stage, environment and disease. *Molecular Ecology.* setembro de 2018;27(18):3686–99.

Yao Z, Yang K, Huang L, Huang X, Qiuqian L, Wang K, et al. Disease outbreak accompanies the dispersive structure of shrimp gut bacterial community with a simple core microbiota. *AMB Express*. dezembro de 2018;8(1):120.

Zhu J, Dai W, Qiu Q, Dong C, Zhang J, Xiong J. Contrasting Ecological Processes and Functional Compositions Between Intestinal Bacterial Community in Healthy and Diseased Shrimp. *Microbial Ecology*. novembro de 2016;72(4):975–85.