

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

VINÍCIUS ALCOFORADO VIEIRA FEITOSA

Utilização de Probiótico Biorremediador na Água do Cultivo de Tilápia do Nilo

Toledo

2018

VINÍCIUS ALCOFORADO VIEIRA FEITOSA

Utilização de Probiótico Biorremediador na Água do Cultivo de Tilápia do Nilo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. *PhD.* Nilton Garcia Marengoni
Coorientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien

Toledo

2018

**FICHA CATALOGRÁFICA – Ficha de identificação da obra elaborada através do
Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.**

Feitosa, Vinícius Alcoforado Vieira

Utilização de Probiótico Biorremediador na Água do Cultivo de Tilápia do Nilo / Vinícius Alcoforado Vieira Feitosa; orientador Nilton Garcia Marengoni; coorientador Nyamien Yahaut Sebastien. -- Toledo, 2018. 40 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2018.

1. Biotecnologia. 2. Piscicultura. 3. Metabolismo. 4. Bactérias Não-patogênicas. I. Marengoni, Nilton Garcia, orient. II. Sebastien, Nyamien Yahaut, coorient. III. Título.

ATA DE APROVAÇÃO DA DEFESA



Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VINÍCIUS ALCOFORADO VIEIRA FEITOSA, ALUNO(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E ENGENHARIA DE PESCA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE, E DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO DO PROGRAMA E O REGIMENTO GERAL DA UNIOESTE.

Ao(s) 4 dia(s) do mês de setembro de 2018 às 9h, no(a) Sala 15, realizou-se a sessão pública da Defesa de Dissertação do(a) candidato(a) Vinicius Alcoforado Vieira Feitosa, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca - nível de Mestrado, na área de concentração em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. A comissão examinadora da Defesa Pública foi aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. Integraram a referida Comissão os(as) Professores(as) Doutores(as): Nilton Garcia Marengoni, Éder André Gubiani, Lilian Dena dos Santos. Os trabalhos foram presididos pelo(a) Nilton Garcia Marengoni, orientador(a) do(a) candidato(a). Tendo satisfeito todos os requisitos exigidos pela legislação em vigor, o(a) candidato(a) foi admitido(a) à Defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, intitulada: "Utilização de probiótico biorremediador na criação de peixe em sistema estático". O(a) Senhor(a) Presidente declarou abertos os trabalhos, e em seguida, convidou o(a) candidato(a) a discorrer, em linhas gerais, sobre o conteúdo da Dissertação. Feita a explanação, o(a) candidato(a) foi arguido(a) sucessivamente, pelos(as) professores(as) doutores(as): Éder André Gubiani, Lilian Dena dos Santos. Findas as arguições, o(a) Senhor(a) Presidente suspendeu os trabalhos da sessão pública, a fim de que, em sessão secreta, a Comissão expressasse o seu julgamento sobre a Dissertação. Efetuado o julgamento, o(a) candidato(a) foi APROVADO. A seguir, o(a) Senhor(a) Presidente reabriu os trabalhos da sessão pública e deu conhecimento do resultado. E, para constar, o(a) Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Campus de Toledo, lavra a presente ata, e assina juntamente com os membros da Comissão Examinadora e o(a) candidato(a). Em tempo UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO BIORREMIADOR NA CULTIVO ^{AVANÇO DO} de Tilápia do NIO - novo título.

Orientador(a) - Nilton Garcia Marengoni
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)

Éder André Gubiani
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Toledo (UNIOESTE)

Lilian Dena dos Santos
Universidade Federal do Paraná, Campus de Palotina (UFPR)

Vinicius Alcoforado Vieira Feitosa
Candidato(a)

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca
Altevir Signor

Homologação do Colegiado do PREP:

Parecer do Colegiado do PREP favorável Ata 007 de 06/11/2018.

Coord. do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Eng. de Pesca - PREP
Portaria nº 1958/2018 - GRE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, William Feitosa in memoriam, Carmen Verônica e padrasto Edmilson Miranda pelo imensurável apoio, força e amor ao longo dessa importante etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meu eterno agradecimento à minha família, em especial à minha mainha Carmen Verônica e meu padrasto Edmilson Miranda, aos meus irmãos Danilo Feitosa e Murilo Feitosa por todo apoio e companheirismo dado ao longo da vida.

Aos ensinamentos, experiências e discussões construtivas proporcionadas na Pós-Graduação pelos professores orientador Nilton Garcia Marengoni e coorientador Nymaien Yahaut Sebastien.

Às amigadas acadêmicas que fiz, meu muito obrigado pelo conhecimento trocado, caronas, hospedagens, ajudas, conversas descontraídas, aulas assistidas, desabafos, etc.

Agradeço ao técnico Fernando Dressler pelo grande apoio na realização da pesquisa no laboratório de Aquicultura do curso de Engenharia de Pesca - UNIOESTE.

Meu grande agradecimento à empresa BIOTECNAL pela confiança e disponibilidade.

Ao GERPEL, em especial a Adriana Tronco e Jean Colombari, que não se limitaram a empreender esforços para me ajudar nas análises de água.

À Engenheira Mariana Lins pela grande ajuda na análise do material histológico. Aos integrantes do Grupo de Estudos em Tilapicultura (GET) pelos suportes.

Ao Engenheiro de Pesca Ricardo Andrei Krause pela amizade, estrutura fornecida e pela enorme disposição na ajuda e incentivo para finalizar a Pós-Graduação.

Agradeço à instituição Unioeste pelo espaço disponibilizado para realização da pesquisa. Agradeço a bolsa da CAPES, porém, deixo meu repúdio sobre o valor da bolsa não ter sofrido reajuste há anos e pela obrigação de retirar do pequeno valor para financiar a pesquisa.

À minha amiga Debora Borato que me acompanhou nesta fase tão importante da minha vida, obrigado pelo apoio, carinho, aventuras, companheirismo, cultura e compreensão!

Meu agradecimento a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a conclusão dessa etapa da minha vida, meu muito obrigado!

Utilização de Probiótico Biorremediador na Água do Cultivo de Tilápia do Nilo

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos sobre a qualidade da água, desempenho produtivo e histologia de tecidos hepáticos e intestinais de tilápia do Nilo submetidas à aplicação semanal de biorremediação composta por uma mistura de *Bacillus* spp. e *Lactococcus lactis* ssp. Foram utilizados 90 alevinos de *Oreochromis niloticus*, com peso médio inicial de $3,67 \pm 0,56$ g, distribuídos em sistema estático e cultivados durante 75 dias. O biorremediador foi aplicado semanalmente nas doses crescentes (0,00; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 g) diretamente na água das unidades experimentais de 60 L. Os dados de qualidade de água e histomorfométricos do intestino foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e posteriormente às análises de medidas repetidas ANOVA MR e ANOVA *One-way*, respectivamente. As variáveis de desempenho e histológicas do fígado dos peixes foram submetidas à ANOVA *One-way*, em seguida ao teste de Tukey a 5% de significância. As concentrações de nitrato, nitrito, nitrogênio total, demanda bioquímica de oxigênio e demanda química de oxigênio aumentaram ao longo do tempo devido o sistema de cultivo. Considerando a avaliação por PCA verificou-se que as variáveis de qualidade de água não apresentaram diferenças estatísticas, bem como, não houve efeito de interação tempo x dose aplicada ($p > 0,05$). As diferentes doses do biorremediador não influenciaram no desempenho produtivo dos peixes. O número de hepatócitos nos peixes submetidos à aplicação de 0,08 g de bioremediador foi menor em relação ao controle ($p < 0,05$). A altura, comprimento, espessura e largura dos vilos e a espessura da túnica intestinal nos peixes submetidos a 0,06 g de biorremediação foram maiores ($p < 0,05$) em relação às demais doses avaliadas. Portanto, a aplicação de diferentes doses do biorremediador na água não interfere eficientemente em sistema com déficit contínuo na qualidade de água, embora influencie o desenvolvimento dos peixes.

Palavras-chave: Biotecnologia. Piscicultura. Metabolismo. Bactérias Não-patogênicas.

Use of Probiotic Bioremediator in Cultivation Water of Nile Tilapia

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effects on water quality, productive performance and histology hepatic and gut tissues of Nile tilapia submitted to weekly application of bioremediation composed of a mix of *Bacillus* spp. and *Lactococcus lactis* ssp. Ninety fingerlings of *Oreochromis niloticus* were used, with a mean initial weight of 3.67 ± 0.56 g, distributed in a static system and cultivated for 75 days. The bioremediator was applied weekly at increasing doses (0.00, 0.02, 0.04, 0.06 and 0.08 g) directly in the water of experimental units of 60 L. The data of water quality and gut histomorphometry were submitted to principal component analysis (PCA) and analyzes of repeated measures ANOVA MR and unidirectional ANOVA, respectively. The performance and histological variables of fish liver were submitted to One-way ANOVA, following test of Tukey at 5% significance level. Concentrations of nitrate, nitrite, total nitrogen, biochemical oxygen demand and chemical oxygen demand increased over time due to the culture system. Considering the PCA evaluation, it was verified that the water quality variables did not present statistical differences, as well as, there was no effect of interaction time x dose applied ($p > 0.05$). The different doses of the bioremediator did not influence the productive performance of the fish. The number of hepatocytes in the fish submitted to the application of 0.08 g of bioremediator was lower in relation to the control ($p < 0.05$). The height, length, thickness and width of villi and the thickness of intestinal tunica in the fish submitted to 0.06 g of bioremediator were higher ($p < 0.05$) in relation to the other doses evaluated. Therefore, the application of different bioremediator doses does not interfere efficiently in the system with continuous deficit in water quality, although it influences the development of fish.

Keywords: Biotechnology. Fish farming. Metabolism. Non-pathogenic Bacteria.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Revista Ciência Agronômica*. Disponível em: http://www.ccarevista.ufc.br/seer/Instrucoes_aos_autores_RCA_Portugues_abr_2018.pdf.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografia da mucosa do intestino medial da tilápia do Nilo com as indicações das medidas realizadas (10x) em escala de 20 μm 18
- Figura 2. Fotomicrografia representativa do fígado da tilápia do Nilo com círculo indicando o hepatócito em escala de 20 μm (10x). 18
- Figura 3. Autovalores seguidos das percentagens no eixo. projeção da distribuição da plotagem dos fatores no plano (A). Relação entre PC1, PC2 e as variáveis de qualidade de água (B). Setas indicam a direção da associação com as variáveis...22
- Figura 4. Médias e desvio padrão ao longo do tempo para cada dose com os dados gerados a partir da PCA. Autovalores seguidos das percentagens nos eixos para dados PC1 (A) e PC2 (B). Letras distintas acusam diferenças entre os tempos através do teste Tukey a 5% de probabilidade..... 23
- Figura 5. Médias e intervalos de confiança a 95% para o segundo componente (PC2) relativo à diferença dos tratamentos (doses) para a alcalinidade total e pH. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5%. 23
- Figura 6. Autovalores seguidos das percentagens no eixo. Projeção da distribuição da plotagem dos fatores no plano. Relação entre PC1, PC2 e as variáveis histológicas do intestino dos peixes. N^o = número de vilos; AV = Altura do vilos; AT = Altura total do vilos; CV = Comprimento do vilos; LV = Largura do vilos; EV = Espessura do vilos; ET = Espessura da túnica..... 26
- Figura 7. Médias e intervalos de confiança a 95% para o primeiro componente (PC1) relativo à diferença dos tratamentos (doses) para os valores histológicos. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade..... 27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VARIÁVEIS DE QUALIDADE DE ÁGUA E OS RESPECTIVOS MÉTODOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	16
TABELA 2. MATRIZ DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE QUALIDADE DE ÁGUA E OS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC) GERADOS A PARTIR DA PCA.....	21
TABELA 3. TESTE ESTATÍSTICO (F E E) E PROBABILIDADES ASSOCIADAS (P) OBTIDAS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIAS DE MEDIDAS REPETIDAS APLICADO A PARTIR DOS DADOS GERADOS DA ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	22
TABELA 4. MÉDIAS, DESVIO PADRÃO, TESTE ESTATÍSTICO (F) E PROBABILIDADE ASSOCIADA (P) ÀS VARIÁVEIS DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DO BIORREMEIADOR BAC TRAT® P APLICADAS NA ÁGUA.....	24
TABELA 5. VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DO ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS), NÚMERO DE HEPATÓCITOS (NHE) NO TECIDO HEPÁTICO E PESO RELATIVO DO INTESTINO (PRI) DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO CRIADAS EM ÁGUA ADICIONADA DE DIFERENTES DOSES DO BIORREMEIADOR BAC TRAT® P.....	24
TABELA 6. MATRIZ DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE HISTOMORFOMETRIA DO INTESTINO DOS PEIXES E OS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC) GERADOS A PARTIR DA PCA.	25
TABELA 7. TESTE ESTATÍSTICO (F) E PROBABILIDADES ASSOCIADAS (P) OBTIDAS ATRAVÉS DA ANÁLISE ANOVA APLICADO A PARTIR DOS DADOS GERADOS DA ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	26

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	3
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 MATERIAL e MÉTODOS	14
2.1 Local e animais	14
2.2 Delineamento experimental	14
2.3 Condições experimentais.....	14
2.4 Análise das variáveis de qualidade de água.....	15
2.5 Alimentação e desempenho zootécnico.....	16
2.6 Procedimentos histológicos	17
2.7 Análises estatísticas	19
2.8 Comitê de Ética Animal	19
3 RESULTADOS	20
3.1 Qualidade de água	20
3.2 Desempenho zootécnico	24
3.3 Histologia de intestino e fígado dos peixes	24
4 DISCUSSÃO	28
4.1 Qualidade de água	28
4.2 Desempenho zootécnico	31
4.3 Histologia de intestino e fígado dos peixes	32
5 CONCLUSÃO.....	34
6 REFERÊNCIAS	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40

1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção aquícola requer maior atenção à qualidade da água, sobretudo, nas condições ideais necessárias para produzir animais aquáticos, devendo seguir procedimentos de manejo que sejam legais, rentáveis e sustentáveis. As estratégias de manejo aplicadas na água servem para garantir maior equilíbrio das substâncias, compostos e resíduos presentes na coluna da água de cultivos aquícolas (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2008).

Na aquicultura os fatores abióticos e bióticos da qualidade de água representam um conjunto de características ótimas que devem ser mantidas, com procedimentos, para garantir o sucesso da criação de peixes. Tal conjunto refere-se ao equilíbrio dinâmico de todas as variáveis físicas, químicas, biológicas e tecnológicas da qualidade de água que conferem maior produção de organismos aquáticos sob uma forma sustentável e que atendam aos objetivos sociais, ambientais e econômicos da realidade em que o empreendimento se encontra inserido (ARANA, 2004).

No entanto, o Brasil vem intensificando os cultivos aquícolas com o objetivo de aumentar a produtividade e as consequências para tal prática podem ser benéficas para a economia, por outro lado, serem prejudiciais ao meio ambiente. Nesse contexto, o meio ambiente pode sofrer danos ambientais devido ao resultado das intensificações na aquicultura como a descarga de alta carga de resíduos orgânicos concentrados que influenciam na depleção de oxigênio dissolvido e a geração de metabólitos tóxicos como amônia e nitrito (CRUZ et al., 2012).

Para a criação de organismos aquáticos, os probióticos têm em sua composição microrganismos que desempenham funções importantes para a qualidade de água no meio de cultivo. Existem diversos conceitos gerais e aplicações referentes aos probióticos, dentre os quais podem afirmar que são um ou mais microrganismos com efeitos benéficos para o hospedeiro no sistema gastrointestinal, crescimento, desenvolvimento celular e comportamento das funções fisiológicas. Pode ser utilizada a técnica de adição de bactérias vivas ao ambiente onde os animais são cultivados ou diretamente como aditivos à ração (MORIARTY, 1998; GATESOUBE, 1999; VERSCHUERE et al., 2000; MAILLARD et al., 2005; RAIFEE; SAAD, 2005; BALCÁZAR et al., 2006; TAOKA et al., 2006; DAWOOD et al., 2018).

Pesquisas relacionadas às áreas de probióticos e biorremediadores, com foco na busca de novas práticas aquícolas ambientalmente corretas para promover a qualidade de água vêm sendo executadas para a carcinicultura (LAKSHMANAN; SOUNDARAPANDIAN, 2008; GUO et al., 2009), em reatores para tratamento de efluentes (SREEDEVIEMAIL;

RAMASUBRAMANIAN, 2010), na manipulação de microrganismos para saúde dos peixes (DIMITROGLOU et al., 2011), nas reduções dos impactos na aquicultura nas questões econômicas e vantagens operacionais (IRIBARREN et al., 2012), modo de ação dos probióticos no que se refere a aplicações na ração e/ou na água de cultivo (DE et al., 2014; HAI, 2015; DAWOOD; KOSHIO, 2016; DAS; MONDAL; HAQUE, 2017; LOH, 2017).

Nesse sentido, a biorremediação é definida como um ramo da biotecnologia que apresenta diversas técnicas, com a ajuda de microrganismos, para tratamento de água contaminada, bem como, dos resíduos orgânicos, transformando a um estado inócuo ou a níveis abaixo dos limites de concentração estabelecidos (MUELLER; CERNIGLIA; PRITCHARD, 1996; STRONG; BURGESS, 2008). Além disso, a ferramenta biorremediadora pode ser utilizada em cultivos aquícolas para a modulação de comunidade de microrganismos benéficos na água (VENKATESWARA, 2007).

A aplicação dos probióticos e biorremediadores diretamente na água na aquicultura está relacionada aos benefícios na saúde dos peixes através da melhoria das variáveis abióticas e bióticas da água, solo e na inibição de patógenos (VENKATESWARA, 2007). Por outro lado, determinadas bactérias são capazes de melhorar a qualidade da água decompondo a matéria orgânica em dióxido de carbono em produções intensivas (LOH, 2017), bem como, redução de bactérias patogênicas e fitoplâncton prejudicial (ZORRIEHZAHRA et al., 2016). Além disso, podem trazer benefícios nas alterações histológicas no fígado e intestino proporcionando melhor crescimento ao peixe (ZHOU et al., 2010).

As bactérias do gênero *Bacillus* spp. são classificadas como biorremediadoras para o uso na aquicultura (DEVARAJA et al., 2013). As cepas bacterianas mais utilizadas são *Bacillus acidophilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Nitrobacter* spp., *Aerobacter* e *Saccharomyces* (KOLNDADACHA et al., 2011). Os microrganismos do gênero *Bacillus* possuem a particularidade de formar simples esporos, o que lhe configuram uma potencialidade positiva para as formulações dos produtos comerciais, dentro das espécies. Além das bactérias citadas são destaque também o *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. clausii* e *B. megaterium* (OGGIONI et al., 2003).

Atualmente, no Brasil existem diversas indústrias que disponibilizam probióticos e biorremediadores específicos para aquicultura. Porém, há uma carência em comprovações científicas que tais produtos disponibilizados conferem os benefícios para o meio de cultivo pertinente à qualidade de água.

Desse modo, pretende-se avaliar se há uma relação positiva entre o aumento das dosagens do biorremediador na diminuição dos compostos nitrogenados tóxicos e da matéria orgânica. Além disso, verificar se o aumento das doses do produto irá proporcionar uma relação benéfica com os índices produtivos e a histologia do fígado e intestino dos peixes.

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a qualidade de água, desempenho e histomorfometria do tecido hepático e intestinal dos peixes submetidos à aplicação semanal de doses crescentes do biorremediador comercial (BacTrat® P) composto por um mix de *Bacillus* spp. e *Lactococcus lactis* ssp. na água de criação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques de polietileno em sistema estático.

2 MATERIAL e MÉTODOS

2.1 Local e animais

O estudo foi realizado em laboratório no período de 75 dias. Para tanto, foram utilizados 90 peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) da linhagem GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*) com peso inicial médio de $3,67 \pm 0,56$ g e comprimento padrão de $5,15 \pm 0,31$ cm.

Os peixes foram adquiridos em piscicultura comercial, localizada no município de Toledo, Paraná, e alojados durante dois dias em tanque circular de 500 L com temperatura controlada e água sob constante renovação, bem como, aeração.

2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três réplicas com a aplicação do produto biorremediador comercial (Bac Trat[®] P) em diferentes concentrações crescentes para cada 60 L: Dose controle 0,00 g (DC), Dose 1 = 0,02 g (D1), Dose 2 = 0,04 g (D2), Dose 3 = 0,06 g (D3) e Dose 4 = 0,08 g (D4), totalizando 15 unidades experimentais.

O produto utilizado apresentava-se na forma de pó liofilizado e sua composição inclui um mix de microrganismos em meio a 10% de bicarbonato de sódio, 5% de cloreto de sódio e 77,5% de farelo de trigo. Os microrganismos presentes são *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* e *Lactococcus lactis* ssp. nas concentrações $4,1 \times 10^7$ UFC g⁻¹, $4,1 \times 10^7$ UFC g⁻¹, $1,6 \times 10^7$ UFC g⁻¹, $0,8 \times 10^7$ UFC g⁻¹ e $1,6 \times 10^7$ UFC g⁻¹, respectivamente (Biotecnal Soluções Ambientais Ltda.).

O biorremediador comercial Bac Trat[®] P foi incorporado semanalmente na água com doses divididas em duas aplicações, sendo estas realizadas nas terças e quintas-feiras no período matutino, totalizando 20 aplicações por unidade experimental. O produto foi aplicado diretamente na água das unidades experimentais.

2.3 Condições experimentais

As unidades experimentais foram compostas por 15 tanques de polipropileno com capacidade de 70 L e abastecidos com volume útil de 60 L de água oriunda de poço artesiano

livre de contaminação. As unidades experimentais possuíam aeração individual através do soprador de ar central e cada saída de ar foram compostas por pedras porosas. A temperatura da água foi mantida por termostatos regulados a um espaço de temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. O fotoperíodo foi mantido em 12 horas luz e 12 horas de escuro através de iluminação artificial.

O sistema adotado para o estudo foi com troca zero de água (estático). Praticou-se a reposição de água em cada tanque, para manter o nível das unidades experimentais, devido às perdas por evaporação, bem como, pelas coletas de amostras para análise. Para tanto, os peixes foram individualizados em tanques-rede com dimensões de 32 cm x 15 cm x 15 cm (altura x comprimento x largura) dentro de cada unidade experimental totalizando seis tanques-rede por unidade experimental com o intuito de evitar interferências de hierarquias e alcançar sobrevivência de 100%. A densidade utilizada foi de 0,09 peixes L^{-1} equivalente a 90 peixes m^{-3} .

No fundo dos tanques-rede foram inseridas aproximadamente 155 g de rochas denominadas “pedra lavada” para servir de substrato para os peixes e reproduzir um ambiente mais próximo do natural, pois, não havia sedimento no fundo das unidades experimentais. As rochas e equipamentos foram devidamente higienizadas com soluções de hipoclorito de sódio (NaClO) e permanganato de potássio (KMnO_4) antes de serem utilizadas. Durante o período experimental não houve a renovação da água, bem como, as sobras de ração e fezes dos peixes permaneceram propositalmente dentro do sistema.

Adotou-se um período de adaptação de duas semanas, para os peixes, antes do início do experimento. Durante o período de aclimatação (antes do início do experimento) foi adicionada à água, carbonato de cálcio, cloreto de sódio e bicarbonato de sódio para a manutenção da alcalinidade, pH, bem como, aliviar e prevenir o estresse e possíveis agentes patogênicos aos peixes.

No último dia do período de adaptação optou-se em renovar aproximadamente 94% da água das unidades experimentais para reduzir parcialmente as quantidades de carbonato, cloreto e bicarbonato de sódio que foram inseridas na adaptação dos peixes.

2.4 Análise das variáveis de qualidade de água

Quinzenalmente, durante o período matutino, foram coletadas amostras de água em frascos de polietileno devidamente esterilizados e etiquetados para cada unidade experimental.

Os frascos, com as amostras, foram encaminhados para refrigeradores e mantidos à temperatura de 5°C para posteriores análises em laboratório.

As análises das variáveis de qualidade de água (Tabela 1) foram realizadas conforme o método proposto por Carmouze (1994), manual *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005; APHA, 2012), manual de análises de água HACH® *company* (HACH 2000) e o aparelho YSI® *Professional Plus Multiparamater Water Quality Meter* (YSI, Pro Plus, Yellow Springs-Ohio, USA).

Tabela 1. Variáveis de qualidade de água e os respectivos métodos utilizados no estudo.

Variável Analisada	Unidade	Método	Referência
Alcalinidade	mg L ⁻¹	Titulação potenciométrica	Carmouze (1994)
Amônia não-ionizada	mg L ⁻¹	4500-NH ₃ F	APHA (2012)
Condutividade Elétrica	µS cm ⁻¹	<i>Aparelho Digital</i>	<i>YSI Professional Plus</i>
Demanda Bioquímica de Oxigênio	mgO ₂ L ⁻¹	5210-B	APHA (2012)
Demanda Química de Oxigênio	mgO ₂ L ⁻¹	5220-D	APHA (2005)
Nitrato	mg L ⁻¹	NitraVer 8083	HACH (2000)
Nitrito	mg L ⁻¹	4500 -NO ⁻²	APHA (2012)
Nitrogênio Kjeldahl (Orgânico)	mg L ⁻¹	4500-Norg B	APHA (2012)
Oxigênio Dissolvido	mg L ⁻¹	<i>Aparelho Digital</i>	<i>YSI Professional Plus</i>
pH	-	4500 H ⁺	APHA (2012)
Temperatura	°C	<i>Aparelho Digital</i>	<i>YSI Professional Plus</i>

2.5 Alimentação e desempenho zootécnico

A dieta utilizada para a alimentação dos alevinos foi a ração comercial Nutriquality-Ind® (Nutriquality Indústria de Alimentos para Animais Ltda. ME), micro extrusada de 1,0 mm com umidade (máx.) 120 g kg⁻¹, proteína bruta (mín.) 400 g kg⁻¹, extrato etéreo (mín.) 50 g kg⁻¹, matéria fibrosa (máx.) 50 g kg⁻¹, matéria mineral (máx.) 75 g kg⁻¹, cálcio (mín.) 10 g kg⁻¹, fósforo (mín.) 0,8 g kg⁻¹. A taxa de arraçoamento adotada foi de 3% da biomassa total dos peixes devido às condições experimentais praticadas em sistema estático, isento de troca de água. Os alevinos receberam a ração ofertada duas vezes ao dia, sendo uma no período matutino às 08h00 e a segunda no vespertino às 16h00.

Após o período de 75 dias de ensaio experimental os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato gastrointestinal e, posteriormente foram insensibilizados e eutanasiados por aprofundamento anestésico na solução de eugenol à concentração de 250,0 mg L⁻¹ (SIMÕES et al., 2012).

O peso e comprimento total das tilápias foram determinados no primeiro e no setuagésimo quinto dia de experimento. As variáveis de desempenho zootécnico avaliadas no término do experimento foram: ganho de biomassa (GB g) = biomassa final (BF g) - biomassa inicial (g); consumo ração (CR g); conversão alimentar aparente (CA) = consumo ração (g)/ganho em peso (g); taxa de crescimento específico (CE %/dia) = $(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / (\text{dias de experimento}) * 100$; sobrevivência (SO %) = $(\text{número de peixes final} / \text{número de peixes inicial}) * 100$; peso relativo do intestino (PRI %) = $(\text{peso do intestino} / \text{peso do peixe}) * 100$ e o índice hepatossomático (IHS %) = $[\text{peso do tecido (g)} / \text{peso corporal (g)}] * 100$.

2.6 Procedimentos histológicos

Nas análises histológicas utilizaram-se três peixes por unidade experimental e as amostras foram coletadas a partir de incisão na cavidade celomática de cada animal para retirada dos tecidos. Para avaliação histomorfométrica das vilosidades intestinais foram coletadas amostras do segmento transversal do intestino medial dos peixes e para avaliação de alterações celulares dos hepatócitos foram coletadas porções do fígado. Os fígados e os intestinos foram pesados em balança de precisão e todo o procedimento foi realizado em laboratório.

Foram coletadas porções de aproximadamente quatro centímetros de comprimento para a determinação histomorfométrica do intestino médio. Posteriormente, as porções intestinais foram lavadas em solução tampão fosfato (0,1M, pH 7,4), e fixadas em solução de Alfac (álcool 90%, formol puro e ácido acético glacial) por 24 horas. Na sequência foram lavadas em álcool 70% para retirada do fixador, posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

As lâminas foram confeccionadas contendo quatro cortes histológicos multisseriados, de 5µm de espessura em micrótomo (MICROM, *Internacional* GMBH 69190, Walldorf, Alemanha), corados com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico (P1 Olympus BX 50-Manila, Filipinas) acoplado a câmera (Olympus PMC 35B-Berlim, Alemanha). As imagens foram capturadas e mensuradas por meio de Software (CellSens Standard 1.15[®]).

Foram avaliadas as medições histológicas do intestino médio incluindo a altura dos vilos, altura total dos vilos, comprimento dos vilos, largura e espessura dos vilos, espessura da túnica muscular e o número total de vilos, em objetiva de 10x (Figura 1).

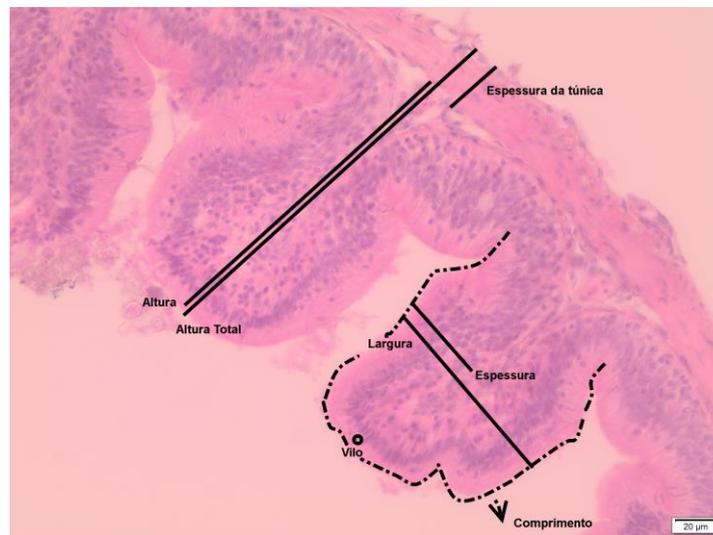


Figura 1. Fotomicrografia da mucosa do intestino medial da tilápia do Nilo com as indicações das medidas realizadas (10x) em escala de 20 µm (Fonte: arquivo pessoal).

Para a determinação das modificações estruturais do fígado foi seguido o protocolo de processamento histológico anteriormente utilizado. As lâminas foram analisadas em objetiva de 40x, determinando-se o número de hepatócitos por área (área útil de contagem aproximadamente: 22000,00 µm²), e a área dos hepatócitos medida de 100 células por corte (Figura 2).

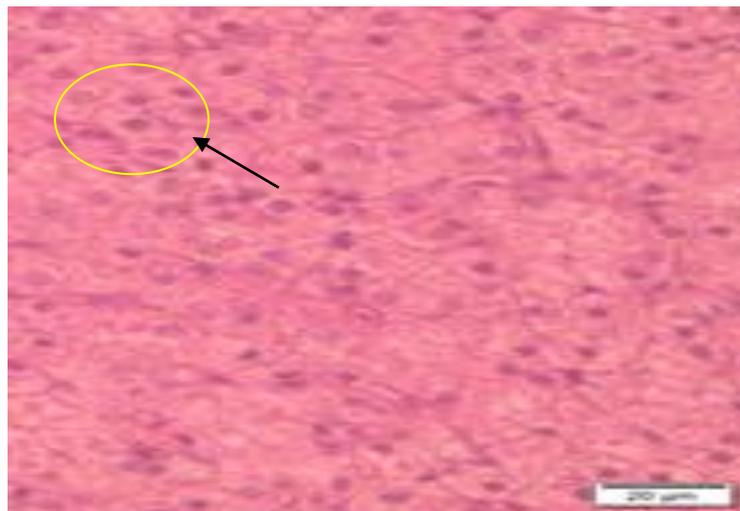


Figura 2. Fotomicrografia representativa do fígado da tilápia do Nilo com círculo indicando o hepatócito em escala de 20 µm (Fonte: arquivo pessoal).

2.7 Análises estatísticas

Os dados das variáveis de qualidade de água e histomorfométricos do intestino e fígado dos peixes foram observados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e correlações (Correlação de Pearson). Nesse sentido, a observação dos dados foi realizada de forma integrada através da técnica de extração de componentes de maior variabilidade conhecida como Análise dos Componentes Principais (PCA).

A escolha dessa técnica foi com o objetivo de reduzir a dimensão das informações, com perda mínima de informações, para avaliar o comportamento e as relações existentes da variação de forma conjunta das variáveis de qualidade de água e histomorfométricas do intestino, em sistema estático, submetidas a diferentes doses do produto biorremediador ao longo do tempo.

Os componentes gerados foram avaliados entre Doses e Doses *versus* Coletas (ao longo do tempo), realizadas através da análise de variância para medidas repetidas (ANOVA-MR). Enquanto para os dados da histomorfometria foi utilizada a análise de variância *one-way* (ANOVA).

Quando observadas diferenças significativas ($\alpha=0,05$), aplicou-se o teste de Tukey à 5% de probabilidade, a fim de determinar qual contraste entre as médias apresentou diferença significativa para cada variável estudada.

Os dados de desempenho zootécnicos e histologia de fígado dos peixes foram submetidos à análise de normalidade e homocedasticidade e posteriormente ao atender os pressupostos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao observar alguma diferença houve a aplicação do teste Tukey a 5% probabilidade.

2.8 Comitê de Ética Animal

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/Unioeste). Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram de acordo com os princípios propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

3 RESULTADOS

3.1 Qualidade de água

As variáveis de qualidade de água apresentaram alterações ao longo do tempo durante a criação de tilápia do Nilo em sistema estático submetidas a diferentes doses do produto comercial Bac Trat® P.

A amônia não-ionizada (NH_3) apresentou teores decrescentes ao longo do tempo para todos os tratamentos. Já o nitrato (NO_3) expressou um aumento nos teores a partir do início do estudo até 30° dia, seguido de um decréscimo nos teores no 45° dia, porém, com um aumento crescente do 60° ao 75° dia de ensaio experimental.

Os níveis de nitrito (NO_2) indicaram um constante aumento ao longo dos dias, mas com uma breve estabilização a partir do 45° dia. Por outro lado, o nitrogênio total (NT), que consiste na soma do nitrogênio Kjeldahl (nitrogênio amoniacal + nitrogênio orgânico), nitrato e nitrito, evidenciaram um acúmulo nas quantidades ao decorrer do tempo.

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) retratou um aumento nos níveis a partir do início ao 60° dia, seguido de uma estabilização nos teores até o final do ensaio experimental. Enquanto que os valores da demanda química de oxigênio (DQO) apresentaram teores crescente até o 45° dia e um decréscimo nos teores seguido de uma estabilização até o final do estudo.

As quantidades de alcalinidade total (CaCO_3) apontaram constante decréscimo ao longo do experimento para todos os tratamentos. Já, o pH mostrou um leve decréscimo ao decorrer dos dias de estudo. A condutividade elétrica (CE) expressou níveis baixos no início, entretanto, ao longo do tempo os valores permaneceram constantes. Enquanto que a temperatura da água demonstrou um decréscimo do início ao 30° dia, seguidos de um aumento e estabilização até o final do experimento. Por outro lado, o oxigênio dissolvido (OD) foi constante durante todo o experimento apresentando média de $6,93 \pm 0,22 \text{ mg L}^{-1}$.

As avaliações dos dados das variáveis de qualidade de água permitiram a identificação das alterações ao longo do tempo no decorrer do experimento de forma qualitativa. Embora, não sendo possível avaliá-las apenas por meio de uma análise univariada, pois, as mesmas apresentaram correlações (Correlação de Pearson) entre si.

Nesse sentido, as análises de correlação e a de componentes principais possibilitaram identificar e correlacionar as variáveis de qualidade de água significativas para avaliar as

possíveis influências da inserção das diferentes doses do produto Bac Trat® P aplicadas durante a criação de tilápia do Nilo em sistema estático (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz de correlação entre as variáveis de qualidade de água e os componentes principais (PC) gerados a partir da PCA.

	PC1	PC2	NT	NH ₃	NO ₃ ⁻	CE	DQO	DBO	NO ₂ ⁻	T	CaCO ₃
Autovalores	5,28	1,94									
Variância Total (%)	53	19									
NT (mg L ⁻¹)	0,91	0,14									
NH ₃ (mg L ⁻¹)	-0,90	0,08	-0,79								
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,86	0,08	0,94	-0,73							
CE (μS cm ⁻¹)	0,81	0,35	0,73	-0,71	0,68						
DQO (mgO ₂ L ⁻¹)	0,82	0,10	0,59	-0,66	0,51	0,72					
DBO (mgO ₂ L ⁻¹)	0,71	-0,12	0,48	-0,79	0,39	0,59	0,73				
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,74	0,01	0,69	-0,55	0,63	0,52	0,55	0,33			
T (°C)	-0,63	-0,12	-0,58	0,42	-0,56	-0,35	-0,60	-0,19	-0,49		
CaCO ₃ (mg L ⁻¹)	-0,29	0,92	-0,17	0,28	-0,23	0,08	-0,14	-0,21	-0,24	0,11	
pH	-0,23	0,95	-0,07	0,27	-0,11	0,11	-0,10	-0,27	-0,14	0,04	0,90

A Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando 10 variáveis de qualidade de água explicaram 72,2% da variabilidade dos dados nos primeiros dois eixos (Eixo 1 = 52,8%; Eixo 2 = 19,4%). Por outro lado, os outros componentes principais (PC) gerados a partir da PCA apresentaram uma baixa explicação na variabilidade (<11%) dos dados, sem fortes associações e correlações com as variáveis de qualidade da água ao longo do tempo. Em vista desses altos valores (52,8% e 19,4%), apenas os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) foram apresentados e discutidos nesse trabalho (Tabela 2).

A PCA identificou que o gradiente de variação, contendo os dados do primeiro componente (PC1), foi responsável por aproximadamente 53% da variabilidade total e apresentaram positivamente associado ao nitrato (NO₃), nitrogênio total (NT), condutividade elétrica (CE), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), nitrito (NO₂), e negativamente a amônia não-ionizada (NH₃) e temperatura (T) da água de cultivo dos peixes. O segundo componente (PC2) foi responsável por 19,4% da variabilidade dos dados e positivamente associados à alcalinidade total (CaCO₃) e pH (Tabela 2 e Figuras 3A e 3B).

O plano definido pelos dois primeiros componentes principais descreve o comportamento das variáveis de qualidade de água ao longo do tempo submetidas às diferentes doses do biorremediador inserido na água em sistema estático. Além disso, a PCA revelou um comportamento homogêneo e crescente entre as variáveis aferidas para um sistema sem troca de água (Figuras 3A e 3B).

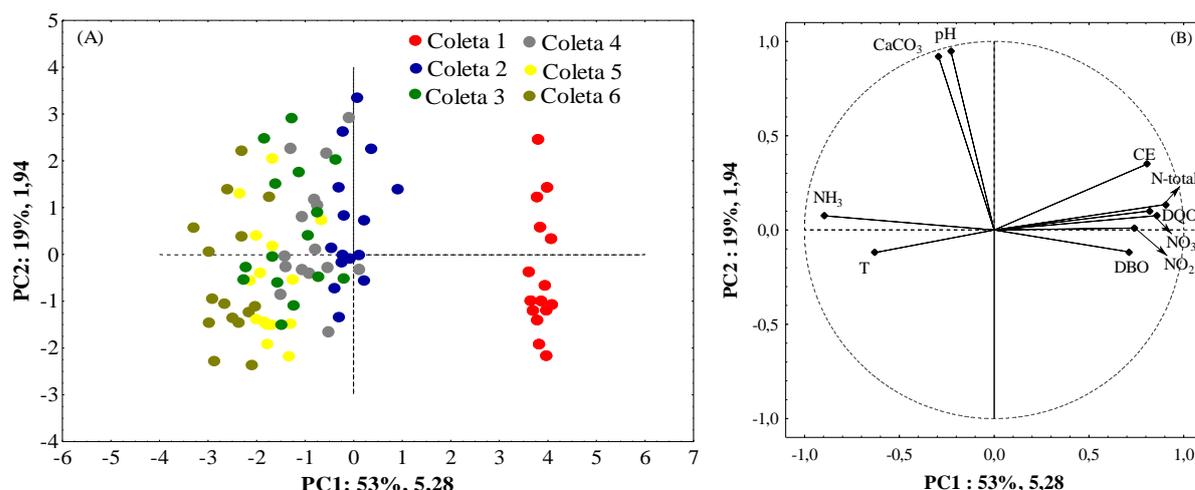


Figura 3. Autovalores seguidos das percentagens no eixo. Projeção da distribuição da plotagem dos fatores no plano (A). Relação entre PC1, PC2 e as variáveis de qualidade de água (B). Setas indicam a direção da associação com as variáveis.

Na avaliação das fontes de variação dos dados gerados do PC1 através da ANOVA-MR para os valores de DBO, DQO, NO₂, NO₃, NT, CE, NH₃ e T, evidenciou que não houve diferença nas variáveis de qualidade de água ($p=0,111$) que foram submetidas a diferentes doses aplicadas do biorremediador, bem como, não houve ($p=0,182$) influência da interação Tempo *versus* Dose (Tabela 3).

Tabela 3. Teste estatístico (F e ϵ) e probabilidades associadas (p) obtidas através da análise de variâncias de medidas repetidas aplicado a partir dos dados gerados da Análise dos Componentes Principais (PCA).

Fonte de Variação	PC1*		PC2**					
	F	p	F	p	G-G (ϵ)	p	H-F(ϵ)	p
Dose	2,48	0,111	12,18	0,001	-	-	-	-
Tempo	580,93	<0,001	102,92	<0,001	0,42	<0,001	0,75	<0,001
Tempo vs. Dose	1,37	0,182	1,37	0,181	0,42	0,263	0,75	0,211

Para o caso de não-esfericidade as correções Greenhouse-Geisser (G-G) e Huynh-Feldt (H-F) foram apresentadas. Teste de esfericidade Mauchly's: *W = 0,22 e $p = 0,577$; **W = 0,02 e $p = 0,007$.

Por outro lado, o PC1 apresentou diferença ($p<0,001$) nos tempos relacionados às variáveis de qualidade de água (Tabela 4). Nesse sentido, o teste de Tukey foi aplicado para a observação das diferenças entre os tempos dos dados gerados a partir da análise de PC1, sendo que todos os valores nos tempos avaliados (0°, 15°, 30°, 45°, 60° e 75° dia) diferem entre si (Figura 4A). O PC2 indica também diferença ($p<0,001$) nos tempos na seguinte relação: tempos 15°=30°, 30°=45° e 0°=60°=75° dia (Figura 4B).

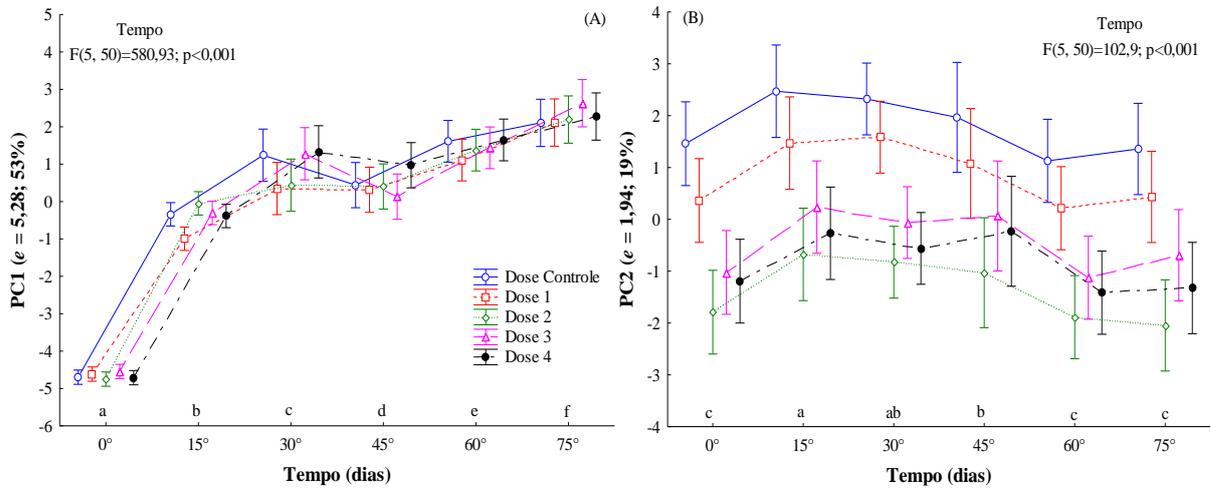


Figura 4. Médias e desvio padrão ao longo do tempo para cada dose com os dados gerados a partir da PCA. Autovalores seguidos das porcentagens nos eixos para dados PC1 (A) e PC2 (B). Letras distintas acusam diferenças entre os tempos através do teste Tukey a 5% de probabilidade.

O teste ANOVA-MR para os dados gerados em PC2 indicaram diferença ($p=0,001$) da alcalinidade total e pH entre os tratamentos onde, foi realizado o teste de comparação de médias, através do teste Tukey, e apresentaram a seguinte relação: DC=D1, D1=D3=D4 e D3=D4=D2 (Figura 5).

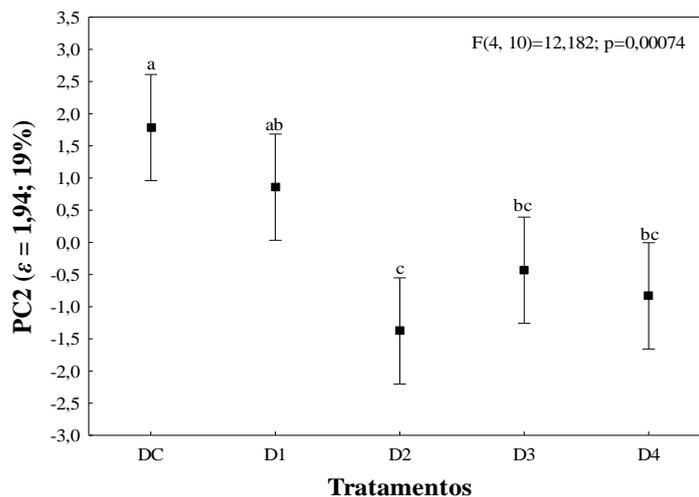


Figura 5. Médias e intervalos de confiança a 95% para o segundo componente (PC2) relativo à diferença dos tratamentos (doses) para a alcalinidade total e pH. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Desempenho zootécnico

O ganho em biomassa, biomassa final, ganho em peso diário, crescimento específico, consumo de ração, conversão alimentar e sobrevivência de tilápia do Nilo não sofreram influência ($p>0,05$) das doses crescentes do produto Bac Trat P[®] aplicadas semanalmente na água em sistema estático (Tabela 4).

Tabela 4. Médias, desvio padrão, teste estatístico (F) e probabilidade associada (p) às variáveis do desempenho zootécnico de alevinos de tilápia do Nilo submetidas a diferentes doses do biorremediador Bac Trat[®] P aplicadas na água.

Variável	Dose Bac Trat [®] P					F	p
	DC	D1	D2	D3	D4		
GB ¹ (g)	35,88±2,10	35,34±1,59	37,51±2,04	35,44±0,52	39,12±1,04	3,19	0,06
BF ² (g)	60,14±1,99	59,72±0,84	61,68±1,54	59,27±0,33	62,85±1,49	3,57	0,05
GPD ³ (g/dia)	0,08±0,005	0,08±0,004	0,08±0,005	0,08±0,001	0,09±0,002	3,19	0,06
CE ⁴ (%/dia)	1,29±0,06	1,27±0,05	1,33±0,07	1,30±0,04	1,38±0,02	2,22	0,14
CR ⁵ (g)	50,04 ± 3,47	46,46 ± 1,04	48,12 ± 1,05	49,42 ± 2,66	51,36 ± 1,24	2,29	0,13
CA ⁶	1,40±0,17	1,32±0,07	1,28±0,04	1,40±0,10	1,31±0,06	0,81	0,54
SO ⁷ (%)	100,0±0,00	100,0±0,00	100,0±0,00	100,0±0,00	100,0±0,00	NS*	NS*

¹Ganho em biomassa; ²Biomassa final; ³Ganho em peso diário; ⁴Crescimento específico; ⁵Consumo de ração; ⁶Conversão alimentar; ⁷Sobrevivência, *Não significativo.

3.3 Histologia de intestino e fígado dos peixes

O índice hepatossomático e peso relativo do intestino em tilápia do Nilo criadas em água submetidas a diferentes concentrações do produto biorremediador em sistema estático não apresentaram diferenças significativas (Tabelas 5).

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão do índice hepatossomático (IHS), número de hepatócitos (NHE) no tecido hepático e peso relativo do intestino (PRI) de alevinos de tilápia do Nilo criadas em água adicionada de diferentes doses do biorremediador Bac Trat[®] P.

Variável	Dose Bac Trat [®] P					F	p
	DC	D1	D2	D3	D4		
IHS (%)	1,11±0,32	1,18±0,14	1,11±0,09	1,18±0,18	0,96±0,24	0,54	0,71
NHE*	124,66±9,10 ^a	112,45±1,93 ^{ab}	114,15±5,82 ^{ab}	117,52±12,14 ^{ab}	110,32±3,04 ^b	2,83	0,05
PRI (%)	6,05±0,84	5,27±0,51	5,06±0,13	5,65±1,13	4,81±0,22	1,57	0,25

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre os diferentes tratamentos pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade. *Área útil de contagem: 22489,98 μm^2 .

As diferentes doses do biorremediador Bac Trat[®] P aplicadas na água de criação dos alevinos de tilápia do Nilo influenciaram no número de hepatócitos. Os peixes submetidos à aplicação da dose de 0,08 g do produto apresentaram menor número de hepatócitos em

relação ao controle ($p < 0,05$). Através do resultado para o número de hepatócitos os tratamentos apresentaram a seguinte relação: DC=D1=D2=D3 e D1=D2=D3=D4 (Tabela 5).

Para os valores da histomorfometria do intestino dos peixes através da correlação de Pearson foi verificada correlação nas variáveis: altura do vilão (AV), comprimento do vilão (CV), largura do vilão (LV), espessura do vilão (EV) e espessura da túnica (ET) (Tabela 6). Nesse sentido, as análises de correlação e componentes principais possibilitaram identificar e correlacionar as variáveis de histomorfometria significativas para avaliar as possíveis influências da inserção das diferentes doses do produto Bac Trat[®] P aplicadas durante a criação de tilápia do Nilo em sistema estático.

Tabela 6. Matriz de correlação entre as variáveis de histomorfometria do intestino dos peixes e os componentes principais (PC) gerados a partir da PCA.

	PC1	PC2	NV	AV	ATV	CV	LV	EV
Autovalores	5,0	1,0						
Variância Total (%)	71	14						
NV	-0,30	0,93						
AV (μm)	-0,88	0,16	0,33					
ATV (μm)	-0,88	0,11	0,29	0,85				
CV (μm)	-0,96	-0,10	0,19	0,83	0,83			
LV (μm)	-0,90	-0,23	0,11	0,67	0,69	0,91		
EV (μm)	-0,93	-0,11	0,23	0,71	0,68	0,87	0,90	
ET (μm)	-0,88	-0,12	0,17	0,69	0,72	0,77	0,75	0,87

NV = número de vilos; AV = Altura do vilão; ATV = Altura total do vilão; CV = Comprimento do vilão; LV = Largura do vilão; EV = Espessura do vilão; ET = Espessura da túnica.

A Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando sete variáveis de histomorfometria explicaram 85% da variabilidade dos dados nos primeiros dois eixos (Eixo 1 = 71%; Eixo 2 = 14%). Optou-se na escolha para explicação dos resultados apenas os dois componentes principais (PC1 e PC2) para ser apresentado e discutido nesse trabalho (Tabela 6).

A PCA identificou que o gradiente de variação contendo os dados do primeiro componente (PC1) foi responsável por aproximadamente 71% da variabilidade total e apresentaram negativamente associado ao AV, ATV, CV, LV, EV da histomorfometria do intestino dos peixes. O segundo componente (PC2) foi responsável por 14% da variabilidade dos dados e positivamente associados ao número de vilos do intestino das tilápias (Tabela 6 e Figuras 6A e 6B).

O plano definido pelos dois primeiros componentes descreve o comportamento das variáveis da histomorfometria do intestino dos peixes que foram criados em água adicionadas com diferentes doses do biorremediador.

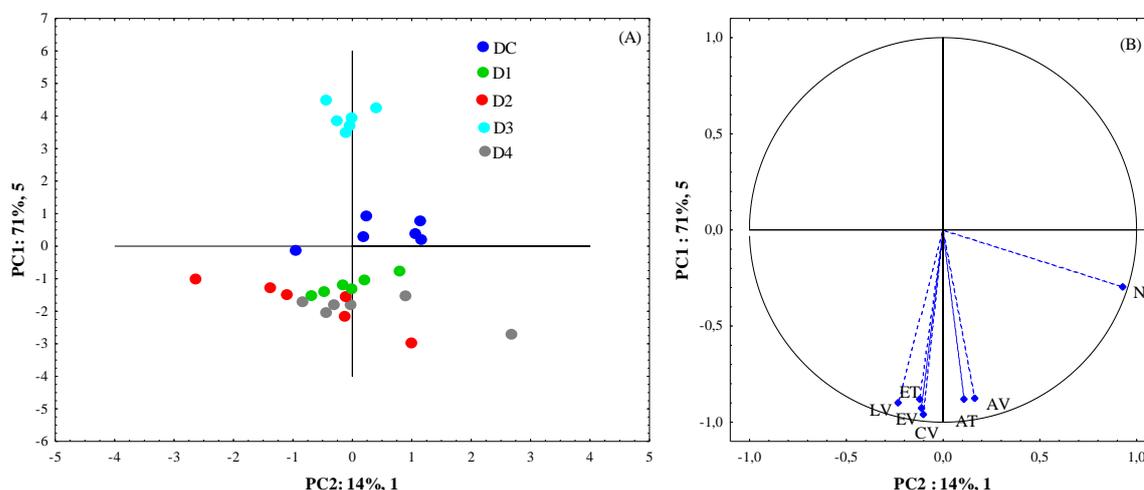


Figura 6. Autovalores seguidos das percentagens no eixo. Projeção da distribuição da plotagem dos fatores no plano. Relação entre PC1, PC2 e as variáveis histológicas do intestino dos peixes. Nº = número de vilos; AV = Altura do vilos; AT = Altura total do vilos; CV = Comprimento do vilos; LV = Largura do vilos; EV = Espessura do vilos; ET = Espessura da túnica.

Na verificação dos dados, a partir da análise de variância *One-way* ANOVA, com os dados gerados de PCA, evidenciou que houve diferença significativa entre os tratamentos relacionados à AV, ATV, CV, LV e EV para PC1. Enquanto, a análise ANOVA com os dados de PC2 não acusou diferenças significativas para o número total de vilos dos peixes submetidos a diferentes doses do biorremediador Bac Trat® P na água (Tabela 7).

Tabela 7. Teste estatístico (F) e probabilidades associadas (*p*) obtidas através da análise ANOVA aplicado a partir dos dados gerados da Análise dos Componentes Principais (PCA).

Fonte de Variação	PC1		PC2	
	F	P	F	p
Tratamentos	181,48	<0,05	1,54	0,22

Através da diferença significativa para PC1, foi utilizado o teste Tukey para observação das diferenças entre os tratamentos. Os tratamentos submetidos às doses de 0,02 g, 0,04 g e 0,08 g de biorremediador Bac Trat® P apresentaram valores para os dados

histológicos da AV, ATV, CV, LV e EV inferiores ($p < 0,05$) aos observados nos tratamentos com doses de 0,0 g e 0,06 g (Figura 7).

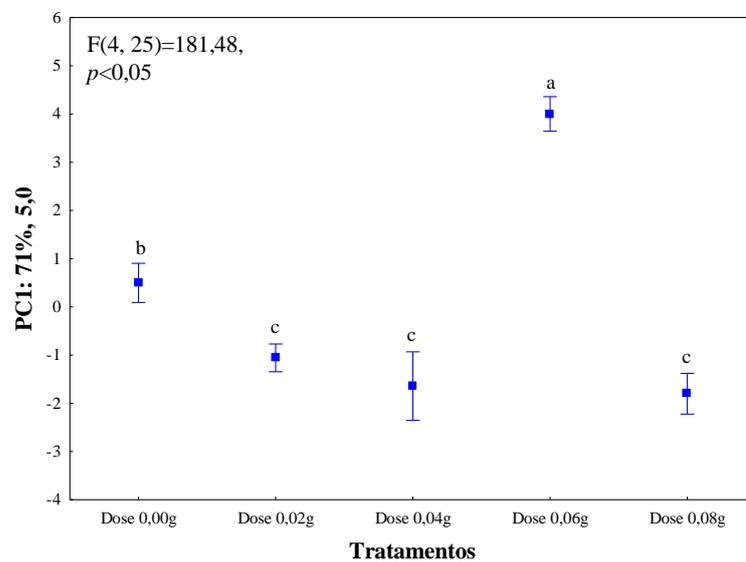


Figura 7. Médias e intervalos de confiança a 95% para o primeiro componente (PC1) relativo à diferença dos tratamentos (doses) para os valores histológicos. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

4.1 Qualidade de água

Os níveis de amônia não-ionizada (NH_3), nitrito (NO_2), nitrato (NO_3), nitrogênio total (NT) e condutividade elétrica (CE) permaneceram acima da faixa recomendada para a espécie de peixe avaliada (BRASIL, 2005; EL-SAYED, 2006; LEIRA et al., 2017). Por outro lado, os níveis de oxigênio, temperatura, pH e alcalinidade permaneceram na faixa recomendada de acordo com El-Sayed (2006) e Rodrigues et al. (2013).

Os teores elevados de NH_3 , NO_2 e NT no tempo zero referem-se aos dias antecedentes ao início do experimento onde as unidades experimentais encontravam-se em condições de adaptação ao sistema, recebendo ração e excretas dos peixes. Embora, a realização da troca de aproximadamente 94% da água, de cada unidade experimental no final do período de adaptação dos peixes, não foi o suficiente para diminuir os níveis de NH_3 , NO_2 e NT.

O incremento nos teores de NO_3 e NO_2 ao longo do tempo está correlacionado com a diminuição dos teores de NH_3 , evidenciando o processo de nitrificação (BOYD; TUCKER, 1998; PEREIRA; MERCANTE, 2005), corroborando os dados de Pereira e Lapolli (2009) que observaram comportamento similar com decréscimo nos níveis de NH_3 seguidos de aumento nos teores de NO_2 e NO_3 . Esperava-se que no presente estudo com as doses inseridas favorecessem maior eficiência na nitrificação, acelerando o processo com efeitos benéficos.

Segundo Das, Lyla e Khan (2006) observaram que as bactérias heterotróficas totais aumentaram à medida que as doses de probiótico e biorremediador aumentavam, e diminuindo no tanque controle à medida que o experimento progredia. Porém, a colonização de microrganismos que auxiliem o processo de nitrificação em sistema de cultivo é algo inevitável, podendo ser benéficos ou prejudiciais (DAS; LYLA; KHAN, 2006).

A faixa ótima de pH para as bactérias nitrificantes *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* fica compreendida em pH 7 a 9 (SURAMPALLI et al., 1997), como também, as bactérias *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* são capazes de se reproduzir e crescer a uma ampla faixa de temperaturas, pH, salinidades e níveis de amônia, bem como ter sua ação efetivada (DEVARAJA et al., 2013; RAHIMAN et al., 2010). Nesse sentido, o experimento permaneceu com o pH adequado e não foi possível observar influências do produto na contribuição do processo de nitrificação.

Os autores Ghosh, Sinha e Sahu (2008), relataram que os gêneros *Bacillus* spp. heterotróficos têm ações químicas, como a nitrificação e mineralização de fosfato, e assim,

quando adicionados a água de criação de peixes podem ter ações na decomposição dos metabólicos dos peixes, das rações e outros componentes orgânicos convertendo-os em nitrato e fosfato.

A adição de cloreto e bicarbonato de sódio na água pode ter sido capaz de favorecer a resistência dos peixes durante o experimento sob a intoxicação dos altos teores de NO_2 . Nesse sentido, o efeito agudo da toxicidade do NO_2 em águas com concentrações de 35-70 mg/L de cloretos é de 28,18 a 44,67 mg/L- NO_2 para *O. niloticus* (YANBO et al., 2006). Contudo, possivelmente os teores observados nesse experimento podem ter causado danos fisiológicos aos peixes.

As principais funções benéficas da adição de produtos microbianos para melhorar a qualidade da água na aquicultura incluem a conversão de nitrogênios inorgânicos tóxicos (NH_3 e NO_2) e a inibição de patógenos e algas nocivas (WANG; XU; XIA, 2005). Entretanto, Lalloo et al. (2007) isolaram espécies de *Bacillus* spp. e observaram que a aplicação das espécies denominadas pelos autores de *Bacillus* B002 e B003 poderiam agir como agentes biológicos, sinergicamente ou isoladas prevenindo a acumulação e diminuição dos níveis de NO_2 no meio.

Há estudos que comprovam a eficácia da inserção de microrganismos na influência no processo de nitrificação (LAKSHMANAN; SOUNDARAPANDIAN, 2008; VERSCHUERE et al., 2000). Contudo, existem pesquisas que evidenciam que microrganismos inseridos na água possuem limitação para a melhora da qualidade da água (DE et al., 2014; TANG et al., 2016; DAS; MONDAL; HAQUE, 2017).

Entretanto, avaliando em uma perspectiva temporal neste estudo, os teores de NO_2 no tratamento controle permaneceram maiores que nos tratamentos que receberam as dosagens do produto biorremediador na água, porém, não diferiram significativamente. Resultados que foram parcialmente similares aos observados por Gupta e Gupta (2016). Por outro lado, Tang et al. (2016) não observaram influências no nitrito, nitrato e nitrogênio total na água de criação de peixes, suplementada pela aplicação de diferentes probióticos e biorremediadores comerciais.

Neste estudo, o modo de aplicação do produto biorremediador apresentou não ser eficaz na diminuição dos compostos nitrogenados na água. É importante salientar que a aplicação de produtos microbianos devem ser bem avaliados quanto aos fatores, que na prática da aquicultura, podem afetar o funcionamento dos produtos, destacando a composição

bacteriana, frequência (dosagem), densidade, métodos de manejo e espécie produzida (TANG et al., 2016).

O aumento do NT, CE, DQO e DBO possivelmente deu-se a partir da redução dos teores de amônia não-ionizada (NH_3), da conversão por oxidação do íon amônio (NH_4^+) a nitrato, fezes, estocagem dos peixes, elevada decomposição da matéria orgânica, inoculação das bactérias, a não renovação de água, bem como, das proteínas contidas na ração ofertada onde parte são assimiladas pelos peixes e o restante eliminado ao sistema. Fatores também observados por Lopes et al. (2011) que já esperavam concentrações máximas de DBO, fazendo com que favorecesse a biossíntese de bactérias heterotróficas adicionadas ao meio.

Segundo Lopes et al. (2011) foram observadas as capacidades e aplicações dos microrganismos *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* combinados com *Nitrosomonas* spp. e *Nitrobacter* spp. na redução da matéria orgânica diminuindo os teores de DBO. Por outro lado, Tang et al. (2016) não observaram influências na DQO na criação de peixes em sistema de policultivo.

A partir dos resultados da PCA, indicaram que PC1 projetou um comportamento de DBO, DQO, NO_2 , NO_3 , NT e CE para o sistema adotado no experimento (sistema estático), ou seja, o conjunto dessas variáveis expressa uma relação direta ao longo do tempo indicando o acúmulo de matéria orgânica e compostos nitrogenados.

A particularidade da não renovação da água neste estudo favoreceu o aumento dos valores das variáveis DBO, DQO, CE, NO_2 , NO_3 e NT. Isso já era esperado, pois, a qualidade da água de criação de organismos aquáticos se deteriora através do acúmulo de resíduos metabólicos, decomposição de alimentos não utilizados e matéria orgânica ao longo do tempo (DAS; LYLA; KHAN, 2006).

A diferença verificada nos tratamentos relacionados aos teores de CaCO_3 e pH foram influenciados pela dosagem do carbonato inserido a água, não tendo influências pelas diferentes dosagens aplicadas do produto biorremediador. A redução do pH e alcalinidade já era esperada, devido as reações de autodepuração no sistema, pois, as reações que envolvem o processo de nitrificação, quando a conversão de NH_4 para NO_2 a NO_3 liberam H^+ , dessa maneira, acidificando o meio (ESTEVES, 2011), bem como, as populações de *Bacillus* spp. gram-positivas consumirem matéria orgânica como única fonte de carbono e converte-las em dióxido de carbono influenciando na acidificação do meio (GHOSH; SINHA; SAHU, 2008; CRUZ et al., 2012;). Além disso, as bactérias utilizadas e inseridas na água podem ter influenciado na redução do pH e alcalinidade devido as espécies *Bacillus subtilis*,

Lactobacillus acidophilus, *Clostridium butyricum* e *Saccharomyces cerevisiae* serem produtoras de ácidos (TAOKA et al., 2006).

Acredita-se que a utilização do produto em condições de criação de peixes que apresente o solo como substrato, possa permitir a ação dos microrganismos na diminuição e mineralização da matéria orgânica devam ser mais evidentes, devido ao fato de haver uma interação solo-substrato-água, bem como, o solo conter substâncias que sejam benéficas para nutrir e aumentar a eficiência das bactérias presentes no produto.

4.2 Desempenho zootécnico

Os valores de conversão alimentar mostraram-se elevadas para a fase da espécie utilizada. Vale ressaltar que foi adotada uma baixa taxa de alimentação/dia para a fase da espécie devido às condições da ausência de troca de água nas unidades experimentais.

As sobrevivências alcançadas neste estudo podem ter sido favorecidas pela individualização dos peixes dentro das unidades experimentais eliminando a territorialidade. Já que, a baixa frequência alimentar poderia ter favorecido a agressividade, aumentando a dominância de uma pequena parte da população (VERA CRUZ; MAIR, 1994).

Os altos teores de NH_3 não causaram interferências nas sobrevivências dos peixes, pois, as concentrações tóxicas (CL_{50}) de NH_3 para alevinos e juvenis de *Oreochromis niloticus* variam de 1,01 e 7,4 mg/L- NH_3 (KARASU-BENLIE; KOKSAL, 2005; EL-SHERIFE; EL-FEKY, 2008).

As sobrevivências máximas (100%) possivelmente estão relacionadas também a adição dos cloretos e carbonatos, pois, a adição de Ca^{2+} na água aumenta a sobrevivência de exemplares submetidos a estresse e diminui a toxicidade de compostos nitrogenados (BALDISSEROTTO, 2002). Zhou et al. (2010) analisaram o conteúdo de lisozima no sangue de tilápia do Nilo e perceberam que a inserção de *Bacillus coagulans* e *Rhodopseudomonas palustris* na água de criação não afetou o conteúdo da lisozima e que isso possivelmente beneficiou o alcance de 100% de sobrevivência.

Diferente dos resultados com a aplicação produto comercial Bac Trat[®] P, Zhou et al. (2010) perceberam que a administração de *Bacillus coagulans* e *Rhodopseudomonas palustris* na água de criação, apresentaram efeitos benéficos no desempenho alcançando um ganho de peso diário de 0,66 e uma taxa de crescimento específico de 3,97% para a tilápia (*O. niloticus*).

Os resultados de desempenho zootécnico são explicados pelo baixo fornecimento de ração, como também, a má qualidade da água, mas esta não influenciada pela inserção dos

microrganismos e sim pelas condições do sistema estático (zero troca de água) adotada no estudo.

4.3 Histologia de intestino e fígado dos peixes

O presente estudo apresentou limitações para responder as diferenças histomorfométricas do intestino médio observadas. São poucos trabalhos disponíveis que apresentam pesquisas relacionadas ao delineamento realizado neste estudo, bem como, uma real comprovação que haja uma influência da complexidade da ação de produtos biorremediadores aplicados à água em sistema estático que venham modificar e causar efeitos na morfologia dos órgãos dos peixes.

O fornecimento de alimento aos peixes foi realizado com ração balanceada, porém, ofertada em quantidades abaixo do que é utilizada comercialmente para a fase de criação. O arraçoamento reduzido propositalmente, possivelmente tenha influenciado nos resultados do fígado e morfologia do intestino que ficaram abaixo dos recomendados. Ainda mais, sugere-se que a qualidade da água pode ter sido crucial para ter influenciado nos valores encontrados nas análises das variáveis do intestino e o fígado. Nesse sentido, ao decorrer do experimento os peixes ficaram expostos a conturbações de agentes externos e não garantido condições sanitárias para o bem-estar dos indivíduos, bem como, não garantido a eficiência dos microrganismos contidos no produto.

As diferenças observadas no intestino dos peixes sugere-se que devido a composição do produto conter ingredientes atrativos do ponto de vista alimentar, podem ter contribuído para que os peixes tenham ingerido quantidade suficiente do produto, influenciando nutricionalmente de forma benéfica na histomorfometria intestinal. Contudo, é sabido que quando o intestino responde aos fatores, como por exemplo, estresses, alimentação, desequilíbrio na renovação de enzimas, agentes externos e crescimento ocorrem transformações na altura e no perímetro das vilosidades que influenciam na diminuição ou aumento na capacidade de digestão e absorção de nutrientes (JONH; DAVID; IAN, 1997; GUPTA; GUPTA, 2016).

Estudos realizados por Gupta e Gupta (2016), sugerem que as bactérias *Paenibacillus polymyxa* inseridas foram capazes de colonizar tanto a água como o trato digestivo dos peixes e assim influenciando na sobrevivência dos peixes. Apesar de que os microrganismos dos autores citado não terem sido os mesmos utilizados neste ensaio experimental, mas sugere-se

que possivelmente os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* e *Lactococcus lactis* ssp. tenham contribuído para manter a sobrevivência e colonizado o intestino dos peixes.

A administração de *Bacillus cereus* via água ou ração apresentou efeitos benéficos sobre o estado imunológico das tilápias fato este observado por Wang et al. (2016). Vale ressaltar que a eficácia da aplicação dos microrganismos na água de criação de peixes difere de acordo com a metodologia e forma de aplicação dos probióticos (WANG et al., 2016).

Ghosh, Sinha e Sahu (2008) observaram menores índices de conversão alimentar para os grupos que receberam a aplicação de *Bacillus subtilis* inseridos na água. Os autores atribuem que podem causar influência, através da sua ingestão, nas enzimas digestivas favorecendo melhor aproveitamento do alimento. Contudo, ainda não há evidências que mostram que os microrganismos adicionados na água colonizam o intestino dos peixes (XU et al., 2015).

Por outro lado, possivelmente os teores de NH_3 comprometeram a saúde e o bem-estar dos peixes, relacionadas a alterações bioquímicas, imunológicas, fisiológicas e comportamentais, como também, o desempenho zootécnicos (HARGREAVES; KUCUK, 2001). Nos sistemas de criações comerciais recomenda que os teores de NH_3 fiquem abaixo de 0,10 mg/L- NH_3 para inibir efeitos deletérios para *O. niloticus* (EL-SHAFAI et al., 2004). Nesse sentido, os números de hepatócios apresentaram baixos em todos os tratamentos para a fase da espécie, sugere-se que elementos tóxicos possam ter influenciados, como por exemplo os níveis tóxicos de amônia não-ionizada, bem como, os de nitrito (FIGUEREDO-FERNANDES et al., 2007).

5 CONCLUSÃO

As diferentes doses do biorremediador comercial Bac Trat[®] P, que contém os microrganismos *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* e *Lactococcus lactis* ssp., inseridas na água de criação de tilápia do Nilo em sistema estático não apresentam aplicabilidade na melhora da qualidade de água, embora influencie o desenvolvimento dos peixes para as condições avaliadas em tanques de polietileno.

6 REFERÊNCIAS

- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21nd ed., Washington, 2005.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed., Washington: American Public Health Association, 2012. 1360p.
- ARANA, L.V. **Fundamentos de aquicultura**. Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. 349p.
- BALCÁZAR, L.D.; BLASS, I.; RUIZ-ZARZUELA, D.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIS, J. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. 212p.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. **Pond aquaculture water quality management**. 1nd ed., New York: copyright, 1998, 700 p. DOI: 10.1007/978-1-4615-5407-3.
- BRASIL, Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução n° 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/>. Acesso em: 1 julho 2018.
- CARMOUZE, J.P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1994. 253p.
- CRUZ, P.M.; IBÁÑEZ, A.; HERMOSILLO, O.; SAAD, H. Use of probiotics in aquaculture. **International Scholarly Research Network Microbiology**, v. 2012, p. 13, 2012. DOI: 10.5402/2012/916845.
- DAS, S.; LYLA, P.S.; KHAN, S.A. Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). **The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**, v.58, n. 3, p. 198-204, 2006.
- DAS, S.; MONDAL, K.; HAQUE, S. A review on application of probiotic, prebiotic and symbiotic for sustainable development of aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 2, p. 422-429, 2017.
- DAWOOD, M.A.O.; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243-251, 2016.
- DAWOOD, M.A.O.; KOSHIO, S.; ABEL-DAIM, M.M.; VAN DOAN, H. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-18, 2018
- DE B.C.; MEENA, D.; BEHERA, B.; DAS, P.; MOHAPATRA, P.D.; SHARMA, A. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 921-971, 2014.

DEVARAJA, T.; BANERJEE, S.; YUSOFF, F.; SHARIFF, M.; KHATOON, H. A holistic approach for selection of *Bacillus* spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, p. 92-100, 2013.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; CARNEVALI, O.; PICCHIETTI, S.; AVELLA, M.; DANIELS, C.; DAVIES, S. J. Microbial manipulations to improve fish health and production—a Mediterranean perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1-16, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.009>.

EL-SAYED, A.F.M. Intensive culture. In: EL-SAYED, A.F.M. (Ed.) **Tilapia culture**. London: CABI, 2006. p. 70-94.

EL-SHAFI, S.A.; EL-GOHARY, F.A.; NASR, F.A.; STEEN, N.P.V.D.; GIJZEN, H.J. Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 117-127, 2004.

EL-SHERIF, M.; EL-FEKY, A. Effect of ammonia on Nile tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures. In: **8^o International Symposium on Tilapia in Aquaculture**. p. 513-529, 2008.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 3nd ed., Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: Interciência, p. 826, 2011.

FIGUEREDO-FERNANDES, J.; FERREIRA-CARDOSO, J.V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 103-109, 2007.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotic in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Dietary probiotic supplementation on growth and health of live-bearing ornamental fishes. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 289-299, 2008.

GUO, J-J.; LIU, K-F.; CHENG, S-H.; CHANG, C-I.; LAY, J-J.; HSU, Y-O.; YANG, J-Y.; CHEN, T-I. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 5, p. 609-618, 2009.

GUPTA, A.; GUPTA, P. *Paenibacillus polymyxa* as a water additive improved immune response of *Cyprinus carpio* and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 86-92, 2016.

HACH. **Manual de análises de água**, Colorado, EE.UU.: HACH company, 2000.

HAI, N.V. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 592-597, 2015.

HARGREAVES, J.; KUCUK, S. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on. **Aquaculture**, v. 195, p. 163-181, 2001.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 163-173, 2008.

IRIBARREN, D.; DAGÁ, P.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G. Potential environmental effects of probiotics used in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 20, n. 4, p. 779-789, 2012.

JONH, R.; DAVID, J.; IAN, H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, n. 1-3, p. 215-236, 1997.

KARASU-BENLI, A.; KOKSAL, G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 29, p. 339-344, 2005.

KOLNDADACHA, O.D.; ADIKWU, I.A.; OKAEME, A.N.; ATIRIBOM, R.Y.; MOHAMMEDM A.; MUSA, Y.M. The role of probiotics in aquaculture in Nigeria - a review. **Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 5, n. 1, p. 8-15, 2011.

LAKSHMANAN, R.; SOUNDARAPANDIAN, P. Effect of commercial probiotics on large scale culture of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Journal of Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 198-203, 2008. Disponível em: <http://www.docsdrive.com/pdfs/academicjournals/jm/2008/198-203.pdf>. Acesso em: 21 março 2018.

LALLOO, R.; RAMCHURAN, S.; RAMDUTH, D.; GÖRGENS, J.; GARDINER, N. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1471-1479, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x>.

LEIRA, M.H; TAVARES DA CUNHA, L; BRAZ, M.S; MELO, C.C.V; BOTELHO, H.A; REGHIM, L.S. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **Pubvet Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2017.

LOH, J. The role of probiotics and their mechanisms of action: an aquaculture perspective. **Word Aquaculture Society**, 2017. Disponível em: www.was.org.

LOPES, R.B.; OLINDA, R.A.; SOUZA, B.A.I.; CYRINO, J.E.P.; DIAS, C.T.S.; QUEIROZ, J.F.; TAVARES, L.H.S. Efficiency of bioaugmentation in the removal of organic matter in aquaculture systems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 2, p. 409-419, 2011.

MAILLARD, V.M.; BOARDMAN, G.D.; NYLAND, J.E.; KUHN, D.D. Water quality and sludge characterization at raceway system trout farms. **Aquacultural Engineering**, v. 33, n. 4, p. 271-284, 2005.

MAUCHLY, J. Significance test for sphericity of a normal n-variate distribution. *Annals of Mathematical Statistics*, **Ann Arbor**, v. 11, n. 2, p. 204-209, 1940. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/i312722>. Acesso em: 18 junho 2018.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in *penaeid* aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 164, n. 1, p. 351-358, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9).

MUELLER, J.G.; CERNIGLIA, C.E.; PRITCHARD, P.H. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: R. CRAWFORD & D. CRAWFORD (Eds.). **Bioremediation: principles and applications**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 125-194, 1996. DOI:10.1017/CBO9780511608414.007.

OGGIONI, M.R.; CIABATTINI, A.; CUPPONE, A.M.; POZZI, G. *Bacillus* spores for vaccine delivery. **Vaccine**, v. 21, n. 2, p. S96-S101, 2003.

PEREIRA, C.; LAPOLLI, F. Criação de tilápias no efluente doméstico tratado em lagoas de estabilização. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 93-102, 2009.

PEREIRA, L.; MERCANTE, C. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, n. 1, p. 81-88, 2005.

RAHIMAN, K.M.M.; JESMI, Y.; THOMAS, A.P.; HATHA, A.A.M. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v. 41, n. 9, p. 120-134, 2010.

RAIFEE, G.; SAAD, C.R. Nutrient cycle and sludge production during different stages of red tilapia (*Oreochromis* sp.) growth in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 244, n. 1-4, p. 109-118, 2005.

RODRIGUES, A.P.O.; LIMA, A.F.; ALVES, A.L.; ROSA, D.K.; TORATI, L.S.; SANTOS, V.R. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília: Embrapa Pesca e Aquicultura. 2013, 440 p.

SIMÕES, L.N.; GOMIDE, M.A.T; ALMEIDA-VAL, F.V.M.; VAL, A.L.; GOMES, C.L. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 2, p. 175-181, 2012.

SREEDEVIEMAIL, P.R.; RAMASUBRAMANIAN, V. Biocontrol of ammonia pollution in the rearing water of fish by inducing a heterotrophic bacterial-based food chain in the medium. **Aquaculture International**, v. 19, n. 4, p. 789-796, 2010.

STRONG, P.J.; BURGESS, J.E. Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. **Bioremediation Journal**, v. 12, n. 2, p. 70-87, 2008.

SURAMPALLI, R.Y.; TYAGI, R.D.; KARL SCHEIBLE, O.; HEIDMAN, J.A. Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 151-157, 1997.

TANG, J.Y.; DAI, Y-X.; LI, Y-M.; QIN, J-G.; WANG, Y. Can application of commercial microbial products improve fish growth and water quality in freshwater polyculture? **North American Journal of Aquaculture**, v. 78, n. 2, p. 154-160, 2016.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J-Y.; JEON, M-J.; BAI, S. C.; LEE, W-J.; YUGE, K.; KOSHIO S. Growth, stress tolerance and nonspecific immune response of japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. **Fisheries Science**, v. 72, n. 2, p. 310-321, 2006.

VENKATESWARA, A. R. Bioremediation to restore the health of aquaculture. In: Advances in aquatic ecology. ed. **Vishwas Balasaheb Sakhare**, v. 1, p. 85-94, 2007.

VERA CRUZ, E.; MAIR, G. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 122, n. 2-3, p. 237-248, 1994.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

WANG, M.; LIU, G.; LU, M.; KE, X.; LIU, Z.; GAO, F.; CAO, J.; ZHU, H.; YI, M.; YU, D. Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v.48, n. 6, p. 3163-3173, 2016.

WANG, Y.; XU, Z.; XIA, M. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fisheries Science**, v. 71, n. 5, p. 1036-1041, 2005.

XU, J.; LI, S.; HE, L.; LV, S.; XU, H.; CHEN, Y. Survival dynamics and colonization of exogenous probiotic bacteria *Bacillus subtilis* in aquaculture water and intestine of zebra fish (*Danio rerio*). **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 68, p. 1232-1340, 2015.

YANBO, W.; WENJU, Z.; WEIFEN, L.; ZIRONG, Z. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 49-54, 2006.

ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y.; LI, W. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 501-509. 2010.

ZORRIEHZAHRA, M.J.; DELSHAD, S.T.; ADEL, M; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K; LAZA, C.C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo buscou uma abordagem de maneira controlada dentro de um laboratório com condições diferentes das criações de peixes comerciais quando se compara a interação solo - água - peixe. Acredita-se que para uma melhor observação das influências benéficas da adição de microrganismos na água poderiam apresentar desafios dentro do sistema de criação composto com diferentes tipos de solos recomendados para a piscicultura e com duração similar ao praticado comercialmente.

Alternativas eficazes como outras dosagens, bem como, frequências de aplicações na água de criações que contenham solo como substrato, na qual o biorremediador é adicionado, poderão contribuir na melhoria da qualidade da água na criação de peixes. Recomenda-se estudos complementares que proporcionem maiores esclarecimentos relacionados à qualidade de água em criações de peixes com a utilização de produtos biorremediadores aplicados na água.

Vale ressaltar que as dimensões de quantidade de água e número de peixes utilizados neste ensaio experimental tenham sido de pequenas proporções para ter sido possível a observação das influências do produto. As análises para compreensão da ação biorremediadora dos produtos inseridos diretamente na água vão muito além de variáveis físicas e químicas da água, e sim em análises de reações bioquímicas e microscópicas dos microrganismos submetidas aos desafios de qualidade de água, bem como, análises referentes à saúde e bem-estar dos peixes.