



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

Investigação molecular de gêneros bacterianos e ação
antimicrobiana de melaço comercial no cultivo de camarão marinho
Litopenaeus vannamei em sistema de bioflocos

Maria Gabriela Padilha Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Eudes de Souza Correia

RECIFE
Abril/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

Investigação molecular de gêneros bacterianos e ação
antimicrobiana de melaço comercial no cultivo de camarão marinho
Litopenaeus vannamei em sistema de bioflocos

Maria Gabriela Padilha Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Eudes de Souza Correia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Doutor.

RECIFE
Abril/2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

F383i Ferreira, Maria Gabriela Padilha
 Investigação molecular de gêneros bacterianos e ação
 antimicrobiana de melão comercial no cultivo de camarão marinho
 Litopenaeus vannamei em sistema de bioflocos / Maria Gabriela
 Padilha Ferreira. – 2017.
 61 f. : il.

 Orientador: Eudes de Souza Correia.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
 Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura,
 Recife, BR-PE, 2017.
 Inclui referências e anexo(s).

 1. PCR 2. BFT 3. Bactéria 4. Melão 5. Atividade antibacteriana
 6. Camarão I. Correia, Eudes de Souza, orient. II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

Investigação molecular de gêneros bacterianos e ação antimicrobiana de
melaço comercial no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em
sistema de bioflocos

Maria Gabriela Padilha Ferreira

Tese julgada adequada para obtenção do título de
doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.
Defendida e aprovada em 23/02/2017 pela seguinte
Banca Examinadora.

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia (Orientador)
Departamento de Pesca e Aquicultura / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Ranilson de Souza Bezerra (Membro titular externo)
Departamento de Bioquímica / Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (Membro titular externo)
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra (Membro titular interno)
Departamento de Pesca e Aquicultura / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva (Membro titular interno)
Departamento de Pesca e Aquicultura / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à Deus e em segundo, à minha família, com especial gratidão aos meus pais Cloves e Maria do Carmo, ao meu esposo Dayan e à minha filha Isabela pelo amor incondicional, sustento, força e inspiração na difícil trajetória do Doutorado.

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela oportunidade do doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Eudes Correia pela orientação, amizade, confiança, por acreditar no meu potencial e aceitar o desafio desta Tese.

À Camanor e à Universidade Federal de Santa Catarina pela permissão da coleta de amostras que contribuíram bastante para o enriquecimento do estudo.

À Prof^a. Dra. Suzianny Cabral pelo acolhimento, confiança, amizade e novas ideias, por toda ajuda no momento em que mais precisei, decisivo à conclusão do doutorado; À Prof^a. Dra. Emiko Mendes e à Prof^a. Dra. Raquel Coimbra, as quais sou muito grata por me permitirem fazer uso de inúmeros equipamentos, materiais e reagentes de seus laboratórios.

A todos os professores do PPG-RPAq da UFRPE, especialmente ao Prof. Dr. William Severi, Prof^a. Dra. Roberta Soares e Prof. Dr. Alfredo Gálvez pelas suas significativas contribuições quanto a uso de equipamentos e reagentes.

Aos amigos do Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAQ) nas pessoas de Fabiana Penalva, Rafael Liano, Eduardo Lima, Ítalo Braga, Marcelo Franklin e Pedro Vinícius cuja ajuda foi essencial para a realização dos cultivos de camarão desde a manutenção dos tanques até as análises laboratoriais. Além de Jaqueline Moura, Marcele Araújo, Suzane Neves, Maria Carolina Cunha e Santiago Cisneros pela amizade, apoio e excelente convivência. Aos amigos Carolina Barros e Arthur Lopes do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ) pela essencial ajuda no experimento e artigo do melaço comercial. Aos amigos Tainan Araújo e Álvaro Cirino do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (LASOA), Leandro Melo do Laboratório de Genética Aplicada (LAGA), Jéssika Abreu do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), e Bruna Ferreira, Roberta Ferreira e Camila Costa do Laboratório de Tecnologia aplicada (LTA) por toda amizade e ajuda na fase final do doutorado.

A todos os funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq) e aos funcionários terceirizados das equipes de limpeza e vigilância pela atenção, cuidados e grande ajuda sempre quando foi preciso.

Muito obrigada!

Resumo

A tecnologia de bioflocos consiste na aglomeração de micro-organismos e compostos orgânicos e inorgânicos que são induzidos a se desenvolver durante o cultivo. Dentre os micro-organismos, as bactérias são importantes no bioflocos devido a estreita relação com a manutenção da qualidade da água e o balanço do sistema. *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. são os gêneros mais frequentemente encontrados em cultivos de camarão e a presença destes pode ser um indicativo de como está a qualidade do cultivo. E como no sistema de bioflocos, bactérias e fatores bióticos e abióticos estão inter-relacionados, o controle dessas variáveis são essenciais para o sucesso do cultivo. A fonte de carbono é um dos fatores mais importantes em cultivos com bioflocos, visto que serve como fonte de energia e permite que bactérias assimilem o nitrogênio em excesso na água. A principal fonte de carbono utilizada em cultivos com bioflocos é o melaço. Contudo, alguns melaços comerciais podem conter compostos inibitórios prejudiciais às bactérias. Desta forma, esta Tese teve por objetivo: (1) investigar a presença de *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. em cultivos com bioflocos através de PCR convencional e (2) avaliar a atividade antibacteriana de um melaço comercial através da concentração inibitória mínima (CIM). Em relação ao primeiro objetivo foi realizado um cultivo intensivo de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) com bioflocos e substratos artificiais (primeiro artigo da Tese). Amostras de água e de substratos artificiais deste cultivo localizado no estado de Pernambuco (PE) foram coletadas e comparadas quanto a presença desses gêneros nesses dois ambientes. Amostras de água de outros cultivos com bioflocos localizados no estado do Rio Grande do Norte (RN) e Santa Catarina (SC) também foram coletadas e comparadas. Das 41 amostras analisadas, nenhum dos três gêneros foi detectado nas amostras de PE. Por outro lado, *Bacillus* sp. e *Vibrio* sp. foram positivos para amostras de RN e de SC. O uso da PCR permitiu a rápida detecção de gêneros bacterianos nas amostras e possui grande potencial para a detecção de grupos bacterianos do bioflocos. Em relação ao segundo objetivo, amostras de água foram coletadas de um cultivo de *L. vannamei* com bioflocos para a investigação da CIM sobre bactérias isoladas das amostras e sobre cepas patogênicas de referência para animais aquáticos (segundo artigo da Tese). A quantidade de bactérias heterotróficas e autotróficas totais (BHT e BAT, respectivamente) também foram investigadas. Verificou-se que *Streptococcus agalactiae* (19.99 µL/mL), *Staphylococcus epidermidis* (29.98 µL/mL) e *Neisseria* sp. (39.97 µL/mL) foram inibidas de acordo com o aumento da concentração do melaço e que BHT (1.2×10^4 a 3.3×10^4 CFU/mL) e BAT ($< 10^3$ CFU/mL) estiveram em baixas concentrações nas amostras de água. Sendo assim, o uso de melaço comercial enriquecido com minerais não é indicado para uso em aquicultura por possuir ação antimicrobiana e dificultar o desenvolvimento das bactérias sob as condições ambientais empregadas neste estudo.

Palavras-chave: PCR, BFT, bactérias, melaço, atividade antibacteriana, camarão

Abstract

Biofloc technology consists in agglomeration of microorganisms and organic and inorganic compounds that are induced to develop during cultivation. Among microorganisms, bacteria are important in the biofloc because the close relationship with water quality maintenance and system balance. *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. are the most often genera found in shrimp cultures and its presence may be indicative of culture quality. And as in biofloc system, bacteria and biotic and abiotic factors are interrelated, control of these variables is essential for culture success. The carbon source is one of the most important factors in cultures with biofloc, since it serves as energy source and allows bacteria to assimilate nitrogen excess in water. The main carbon source used in biofloc cultures is molasses. However, some commercial molasses may contain inhibitory compounds harmful to bacteria. Thus, this thesis aimed to: (1) investigate the presence of *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. in cultures with biofloc through conventional PCR, and (2) evaluate the antibacterial activity of a commercial molasses through the minimum inhibitory concentration (MIC). In relation to the first objective, an intensive culture of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with biofloc and artificial substrates (first Thesis article) was carried out. Samples of water and artificial substrates of this culture located in Pernambuco state (PE) were collected and compared for these genera presence in these two environments. Water samples from other biofloc cultures located in Rio Grande do Norte (RN) and Santa Catarina (SC) states were also collected and compared. Of the 41 samples analyzed, none of the three genera were detected in PE samples. On the other hand, *Bacillus* sp. and *Vibrio* sp. were positive for RN and SC samples. PCR use allowed rapid detection of bacterial genera in samples and has great potential for detection of biofloc bacterial groups. In relation to the second objective, water samples were collected from *L. vannamei* biofloc culture for MIC investigation on bacteria isolated from samples and on pathogenic reference strains for aquatic animals (second Thesis article). The quantity of total heterotrophic and autotrophic bacteria (BHT and BAT, respectively) were also investigated. *Streptococcus agalactiae* (19.99 μL / mL), *Staphylococcus epidermidis* (29.98 μL / mL) and *Neisseria* sp. (39.97 μL / mL) were inhibited according to the increase in molasses concentration, and BHT (1.2×10^4 at 3.3×10^4 CFU / mL) and BAT ($<10^3$ CFU / mL) were at low concentrations in water samples. Therefore, commercial molasses enriched with minerals is not indicated for use in aquaculture because it has antimicrobial action and hinders bacteria development under the environmental conditions employed in this study.

Key words: PCR, BFT, bacteria, molasses, antibacterial activity, shrimp

Lista de figuras

Página

Artigo I

Figura 1- Amplicons para *Pseudomonas* sp. após eletroforese em gel de agarose a 1% e brometo de etídio. M = marcador 100 pb; A = amostras de água; S = amostras de substrato; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. Todas as amostras foram negativas para *Pseudomonas* sp. 27

Figura 2- Amplicons para *Bacillus* sp. após eletroforese em gel de agarose a 1% e brometo de etídio. M = marcador 100 pb; A = amostras de água; S = amostras de substrato; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. AB4, AB5, A4B e A5E foram positivos para *Bacillus* sp. 27

Figura 3- Amplicons para *Vibrio* sp. após eletroforese em gel de agarose a 1% e brometo de etídio. M = marcador 100 pb; A = amostras de água; S = amostras de substrato; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. Apenas A4B foi positiva para *Vibrio* sp. 28

Lista de tabelas

	Página
Artigo I	
Tabela 1- Características dos primers usados no estudo.	24
Tabela 2- Condições de amplificação e ciclo térmico de PCR para detecção de <i>Vibrio</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. em amostras com biofoco.	24
Tabela 3- Variáveis de qualidade de água (média $\pm$ erro padrão) do cultivo berçário de <i>L. vannamei</i> com biofocos e substratos artificiais.	25
Tabela 4- Desempenho zootécnico (média $\pm$ erro padrão) do cultivo berçário de <i>L. vannamei</i> com biofocos e substratos artificiais.	26
Tabela 5- Informações sobre as amostras coletadas para o estudo.	26
Artigo II	
Table 1. Basic composition and use indication of commercial molasses employed in this study.	43
Table 2. Dilution test in Agar for analysis of antimicrobial activity of molasses against reference strains and isolates of <i>L. vannamei</i> culture with biofloc and commercial molasses.	45

Sumário

	Página
Dedicatória	
Agradecimentos	
Resumo	
Abstract	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
1- Introdução	10
1.1- Objetivos	14
1.2- Hipóteses	14
2- Artigo I - Identificação molecular de gêneros bacterianos em biofloco e substratos artificiais no cultivo de camarão marinho	15
3- Artigo II - Antibacterial Activity of Commercial Molasses Commonly Used in Biofloc Technology	40
4- Considerações finais	53
5- Referências	53
ANEXO: Normas de formatação do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura	58

1- Introdução

O camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei* é nativo da costa sul do Oceano Pacífico, encontrado do México até o Peru, mas principalmente na região do Equador. A espécie foi introduzida no Brasil na década de 1970, mas a consolidação do seu cultivo ocorreu em meados dos anos 90, principalmente na região Nordeste. O interesse pelo camarão *L. vannamei* se deve à sua capacidade de adaptação a rações comerciais, a diversas condições climáticas e a amplas variações de temperatura e salinidade (PONCE-PALAFOX *et al.*, 1997; MAICÁ *et al.*, 2011). Tais vantagens encontradas para o cultivo dessa espécie incentivaram a produção em larga escala e, aliadas com a aceitação do mercado, contribuíram para o desenvolvimento da carcinicultura.

Desde a sua implantação até os dias atuais, a aquicultura vem se modernizando para atender aos novos requisitos de biossegurança, sustentabilidade e tecnologia. Evoluindo de sistemas extensivos e semi-intensivos (com baixo nível de tecnologia e investimento), para sistemas intensivos e super-intensivos com grandes investimentos e tecnologia, altas densidades de estocagem, mínima ou nenhuma troca de água, sistemas de aeração 24h altamente sofisticados, oxigenação de emergência, geradores e sistemas de alarme. Além disso, também são empregadas estratégias que impedem o escape dos animais, a ação de predadores e o transporte e inoculação acidentais de micro-organismos indesejáveis e muitas vezes prejudiciais ao cultivo.

O cultivo intensivo com biofloco é uma tecnologia que vem conseguindo, com sucesso, se enquadrar em tais requisitos. A tecnologia do biofloco foi desenvolvida entre os anos de 1980 e 1990 nos Estados Unidos e em Israel, utilizando princípios simples e pioneiros de zero ou mínima troca de água (AVNIMELECH *et al.*, 1992; HOPKINS *et al.*, 1993; SANDIFER e HOPKINS, 1996). Baseado nos fundamentos dos sistemas convencionais de tratamento de águas residuárias (SCHRYVER *et al.*, 2008), a tecnologia foi sendo aperfeiçoada ao longo dos anos. Contudo, apenas 10 anos depois começou a ultrapassar as barreiras da aquicultura convencional e ser aceita por produtores como uma alternativa de biossegurança, no controle contra doenças, e de sustentabilidade, no uso da água e descarte de resíduos (WASIELESKY *et al.*, 2006; AVNIMELECH, 2009).

Conhecida no passado como zero exchange, aerobic, heterotrophic culture systems (ZEAH); active suspension pond (ASP); activated suspension technique (AST); heterotrophic ponds; green soup; entre outros, a tecnologia de biofloco (Biofloc technology) consiste em estimular o desenvolvimento de uma microbiota mixotrófica, aeróbica e a sua aglomeração em biofloco, a fim de melhorar o desempenho do cultivo e a qualidade da água (Mc NEIL, 2000; AVNIMELECH, 2007; AZIM e LITTLE, 2008). O biofloco é, portanto, uma mistura de microrganismos como fitoplâncton, bactérias (livres e coloniais), protozoários (flagelados e ciliados), fungos, rotíferos, oligoquetos e nematóides, juntamente com partículas, polímeros orgânicos, restos de ração, fezes e detritos (AVNIMELECH, 2007; SCHRYVER *et al.*, 2008; AZIM e LITTLE 2008; RAY *et al.*, 2010 a,b; EMERENCIANO *et al.*, 2011).

O biofloco, em especial as bactérias, oferecem numerosas vantagens ecológicas como: 1) Manutenção da qualidade da água ao remover compostos tóxicos, atuando como biorremediadores; 2) Antagonismo contra patógenos na água (biocontroladores) ou no trato gastrointestinal do animal cultivado (probióticos); e 3) Fonte suplementar de nutrientes, principalmente proteínas, possibilitando a redução dos níveis de proteína na ração sem comprometer o desempenho do camarão (GATESOUBE, 1999; MAEDA, 2002; SCHRYVER *et al.*, 2008). Contudo, o aproveitamento dessas vantagens só é possível por meio de um conjunto de fatores que conduzem à formação do biofloco, tais como mínima ou zero troca de água, aeração e mistura constantes, alta densidade de estocagem, adição de carbono orgânico e elevados níveis de nutrientes na água, além do controle do oxigênio, temperatura, pH e alcalinidade.

O aumento da densidade de estocagem em menor área de cultivo, conferido pelo uso da tecnologia de biofloco, permite maior produtividade e consequentes lucros para o produtor. Contudo, elevadas quantidades de excretas dos camarões, ração não consumida e matéria orgânica morta na água estimulam o crescimento e o desenvolvimento de bactérias heterotróficas e quimioautotróficas nitrificantes por serem fontes ricas em nitrogênio na forma de amônia, nitrito e nitrato (AVNIMELECH, 2009). A grande quantidade de compostos nitrogenados é excelente para as bactérias, mas em altas concentrações, são extremamente tóxicas para os camarões (GROSS *et al.*, 2004). Essa toxidez pode ser contornada por meio da manipulação da relação C:N, com a adição de carbono orgânico (Ex.: melaço, dextrose, sucrose, amido, entre outros), que fornece energia para as bactérias heterotróficas removerem

a amônia da água enquanto as bactérias nitrificantes (com crescimento mais lento) ainda não estão completamente estabelecidas. (EBELING, *et al.*, 2006; AVNIMELECH, 1999; NOOTONG *et al.*, 2011).

Dentre as fontes de carbono, o melaço de cana de açúcar é a mais usada pela facilidade de aquisição e preço relativamente mais baixo. O melaço é o principal subproduto da indústria do açúcar e, no Brasil, é utilizado principalmente na fabricação de álcool etílico (NAJAFPOUR & SHAN, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Devido ao elevado teor de açúcares, nitrogênio e vitaminas é também usado em diversas fermentações industriais, na produção de proteína, rações, antibióticos, entre outros (NAJAFPOUR & SHAN, 2003; JIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012). Por ser uma fonte usada para o crescimento heterotrófico e conferir benefícios na remoção de nitrogênio (CAZETTA & CELLIGOI, 2005; QUAN *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2009), o melaço é também uma fonte de carbono muito empregada nos sistemas com bioflocos (SCHNEIDER *et al.*, 2006; SAMOCHA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2014).

Contudo, alguns estudos têm mencionado propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antimutagênicas e anti-inflamatórias que alguns componentes como compostos fenólicos e íons metálicos podem exercer sobre bactérias e que muitos desses componentes também podem estar presentes no melaço (TAKARA *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; GUAN *et al.*, 2014; KURODA *et al.*, 2015). Os efeitos inibitórios vão depender do tipo e quantidade de cada componente e são úteis em múltiplas aplicações na indústria, agricultura e na área da saúde por inibir o crescimento de bactérias patogênicas (GRASS *et al.*, 2011; LEMIRE *et al.*, 2013; SIERRA *et al.*, 2013) mas na aquicultura, além de afetar bactérias patogênicas, também pode exercer efeitos sobre bactérias benéficas e inclusive sobre o animal cultivado (MISRA & NIYOGI, 2009). Sendo assim, nem todo melaço disponível comercialmente proporciona benefícios às bactérias heterotróficas e consequentemente ao cultivo com bioflocos.

Além da adição de fontes de carbono, a indução do crescimento bacteriano também vem sendo feita através do emprego de substratos artificiais na coluna d'água. O uso desses substratos ajuda a promover o desenvolvimento microbiano e maior área de superfície para alimentação e refúgio dos camarões. Os produtos empregados para aumentar a superfície vertical (tais como AquamatsTM, telas de polietileno e polipropileno, bambus, fibra de vidro,

entre outros) tem despertado o interesse dos efeitos desse aumento de superfície sobre o perifíton e o camarão cultivado (BRATVOLD e BROWDY, 2001; AZIM *et al.*, 2002; BALLESTER *et al.*, 2007; RICHARD *et al.*, 2009).

Os substratos verticais ajudam a promover o desenvolvimento microbiano por fornecer local de fixação das colônias, principalmente de grupos específicos como as bactérias nitrificantes (THOMPSON *et al.*, 2002; OTOSHI *et al.*, 2006; KRUMMENAUER *et al.*, 2011). A contribuição dos substratos em aumentar a produtividade do cultivo também tem sido relatada, pois através deles, efeitos negativos das altas densidades podem ser atenuados pelo aumento da área de superfície (MOSS e MOSS, 2004; ARNOLD *et al.*, 2009; SCHVEITZER *et al.*, 2013). Diversos estudos sobre a aplicação dos substratos verticais em sistemas intensivos podem ser encontrados na literatura, contudo, com resultados divergentes sobre sua eficiência (HUCHETTE *et al.*, 2000; BRATVOLD e BROWDY, 2001; MOSS e MOSS, 2004; KHATOON *et al.*, 2007). Outros exemplos podem ser encontrados em Arnold *et al.* (2006), os quais relatam que a adição de substrato artificial melhorou o crescimento e a sobrevivência de *Penaeus monodon*, enquanto que Arnold *et al.* (2009) obtiveram melhores resultados para o crescimento de *P. monodon* e para a qualidade da água. Já para Audelo-Naranjo *et al.* (2011) e Schveitzer *et al.* (2013) os efeitos positivos foram encontrados apenas na produção de *L. vannamei*, mas sem influência na qualidade da água.

A necessidade do controle de doenças e da sustentabilidade do ambiente tem incentivado a aplicação de métodos moleculares de diagnóstico baseados na análise do DNA, como é o caso da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (KIM *et al.*, 2015). Por serem mais sensíveis e rápidos, tais métodos proporcionam maiores vantagens ou complementam métodos baseados em cultivo microbiológico (CAIPANG & AGUANA, 2011; KIM *et al.*, 2015). A PCR é usada para amplificar regiões do DNA determinadas por primers específicos e envolve ciclos de diferentes temperaturas que são repetidos inúmeras vezes. Em cada ciclo, a dupla fita de DNA é desnaturada permitindo o anelamento dos primers e a adição de nucleotídeos pela enzima polimerase, gerando novas cópias da região alvo (CAIPANG & AGUANA, 2011). A PCR tem sido usada principalmente na detecção de patógenos devido aos surtos de doenças que causam perdas econômicas (ROBERT-PILLOT *et al.*, 2010; CAIPANG & AGUANA, 2011; JEYASEKARAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015), mas a técnica permite o uso em qualquer bactéria com o primer específico e otimizando-se a reação.

O conhecimento da comunidade bacteriana é essencial para uma melhor compreensão do funcionamento da tecnologia de bioflocos. Contudo, pouco ainda é conhecido sobre esses micro-organismos devido aos altos custos das análises e ao tempo que algumas técnicas levam para a obtenção de resultados (VAN DER MEEREN *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2014; CARDONA *et al.*, 2016).

1.1- Objetivos

1.1.1- Objetivo geral

Caracterizar a comunidade bacteriana em cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema de biofloco e adição de substratos artificiais.

1.1.2- Objetivos específicos

- Determinar a presença de gêneros bacterianos comumente encontrados em cultivos de *Litopenaeus vannamei* em sistema de biofloco e adição de substratos artificiais através de PCR;
- Analisar a atividade antibacteriana de melaço comercial sobre cepas de referência e bactérias presentes em cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de biofloco;

1.2- Hipóteses

- A determinação de gêneros bacterianos em cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de biofloco e adição de substratos artificiais é possível através de PCR convencional;
- Nem toda fonte de carbono é segura para uso no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos.

2- Artigo Científico 1

Identificação molecular de gêneros bacterianos em biofoco e substratos artificiais no cultivo de camarão marinho

Resumo

A tecnologia de biofoco reúne uma densa comunidade de bactérias heterotróficas e nitrificantes que estão suspensas na coluna d'água. *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Bacillus* são os gêneros mais frequentemente encontrados em cultivos de camarão e podem ser monitorados para o conhecimento da qualidade do cultivo. O objetivo do estudo foi detectar, através de PCR convencional e DNA ambiental (eDNA), a presença de *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. em amostras de água com biofoco e de substratos artificiais em cultivo de *Litopenaeus vannamei* localizado no estado de Pernambuco (PE). Além disso, amostras de água com biofoco foram também coletadas de cultivos de *L. vannamei* localizados em dois outros estados brasileiros, Rio Grande do Norte (RN) e Santa Catarina (SC). *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) foram ativados e usados como controles positivos das reações de PCR. Das 41 amostras de água e substratos analisadas nos três estados brasileiros (PE, RN e SC), nenhuma amplificação para *Pseudomonas* sp. foi detectada. *Bacillus* sp. foi detectado em quatro amostras de água (duas do Rio Grande do Norte e duas de Santa Catarina), representando 9,7% e *Vibrio* sp. foi encontrado em apenas uma amostra de água (Santa Catarina), representando 2,4%. Nenhum dos três gêneros foi detectado nas amostras de água e substratos do cultivo de Pernambuco. O uso da PCR permitiu a detecção de gêneros bacterianos em amostras de biofoco sem isolamento bacteriano prévio.

Palavras-chave: DNA, PCR, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp.

Abstract

Biofloc technology combines a dense heterotrophic and nitrifying bacteria community that are suspended in water column. *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Bacillus* are the most frequently found genera in shrimp farms and can be monitored for knowledge of culture quality. The aim of this study was to detect presence of *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. through conventional PCR and environmental DNA (eDNA) in water with biofloc and artificial substrates samples in *Litopenaeus vannamei* culture located in Pernambuco (PE) state. In addition, water samples with biofloc were also collected from *L. vannamei* cultures located in two other Brazilian states, Rio Grande do Norte (RN) and Santa Catarina (SC). *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) and *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) were activated and used as positive controls of PCR reactions. Of 41 water and substrates samples analyzed in three Brazilian states (PE, RN and SC), no amplification for *Pseudomonas* sp. was detected. *Bacillus* sp. was detected in four water samples (two from RN and two from SC), representing 9.7% and *Vibrio* sp. was found in only one water sample (SC), representing 2.4%. None of the three genera were detected in water and substrate samples from the Pernambuco culture. The use of PCR allowed detection of bacterial genera in biofloc samples without previous bacterial isolation.

Key words: DNA, PCR, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp.

Introdução

A tecnologia de bioflocos consiste na reunião de uma variedade de micro-organismos e compostos orgânicos e inorgânicos que podem ser inseridos ou se desenvolver durante o cultivo, permanecendo suspensos e em constante circulação na coluna d'água (AVNIMELECH, 2009). Alguns parâmetros como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, fonte de carbono e fonte de nitrogênio são importantes para a manutenção da saúde do cultivo, já que são essenciais aos processos vitais de camarões e micro-organismos (LUTTERSCHMIDT & HUTCHINSON, 1997; LIN & CHEN 2001, 2003; VINATEA, 2010; ISNANSETYO et al., 2014). A densa comunidade de bactérias heterotróficas e nitrificantes é induzida a se desenvolver e tem sido relatada como principal agente responsável pela manutenção da qualidade da água (EBELING et al., 2006; SAMOCHA et al., 2007; CRAB et

al., 2012). Além disso, a proteína microbiana pode servir como aditivo alimentar (WASIELESKY et al., 2006; ANAND et al., 2014) e dessa forma, a atuação das bactérias tanto na qualidade da água quanto como fonte de alimento pode melhorar a sobrevivência e o crescimento de *Litopenaeus vannamei* (EMERENCIANO et al., 2013; XU et al., 2013, 2016).

O emprego de substratos artificiais é uma outra estratégia de manejo bastante usada para melhorar a eficiência do cultivo (SCHVEITZER et al., 2013). Os substratos têm sido usados para contribuir tanto na melhoria da qualidade da água, através do biofilme, como também para reduzir os efeitos negativos das altas densidades, ao promover superfície adicional para o camarão (ASADUZZAMAN et al., 2008; AUDELO-NARANJO et al., 2012; ANAND et al., 2013). Contudo, em sistemas com biofloco alguns fatores podem comprometer a atuação dos substratos, como a alta densidade de estocagem, a quantidade de substrato, o sistema de cultivo, bem como a espécie cultivada, sua origem e idade (SCHVEITZER et al., 2013). Além disso, nesse tipo de sistema a contribuição dos substratos para a qualidade da água pode ser mínima, visto que os micro-organismos do próprio biofloco são bastante eficientes para tal função (AUDELO-NARANJO et al., 2011; SCHVEITZER et al., 2013).

Conforme as condições ambientais e de manejo existentes no cultivo, bactérias benéficas ou patogênicas podem surgir e assim disputar o ambiente por local de adesão e nutrientes (CRAB et al., 2010; FERREIRA et al., 2015). Informações sobre a diversidade das espécies que compõem o biofloco, sua abundância relativa e suas funções ecológicas são pouco relatadas. Contudo, sabe-se que Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria são os principais filos encontrados nos sistemas de cultivo intensivo (VAN DER MEEREN et al., 2011; ZHAO et al., 2012; TANG et al., 2014; CARDONA et al., 2016). E que *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. são gêneros comumente encontrados em crustáceos por serem partes constituintes da sua microbiota, possuindo representantes benéficos ou patogênicos a estes animais (BALCÁZAR et al., 2007; HAI & FOTEDAR, 2010; FAR et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Vibrio é o gênero mais dominante, típico de ambientes aquáticos e também com representantes patogênicos causadores de doenças tanto em humanos (CABRAL, 2010; KIM et al., 2015) quanto em animais aquáticos, como o camarão *Litopenaeus vannamei* (VANDENBERGHE et al., 1999; REBOUÇAS et al., 2011; ZHOU et al., 2012). Sendo assim, é o mais estudado e sua diversidade e abundância são alvo de constantes investigações nos cultivos (MORIARTY, 1998; ROBERT-PILLOT et al., 2010; KHAMESIPOUR et al., 2014). *Pseudomonas* sp. são bactérias comuns em ambientes aquáticos e no trato

gastrintestinal de vários animais, incluindo camarões, mas podem ser também encontradas em solos e plantas (CHYTHANYA et al., 2002; RATTANACHUAY et al., 2010; KIM et al., 2013; RUNGRASSAMEE et al., 2013). Apesar de ser considerado um grupo potencialmente patogênico, como é o caso de *P. aeruginosa*, muitas linhagens são usadas como probiótico devido a sua atividade antibacteriana frente a patógenos como *Vibrio* spp., *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* (CHYTHANYA et al., 2002; HAI & FOTEDAR, 2010; LÓPEZ et al., 2012; FAR et al., 2013; RANGEL et al., 2013).

Já *Bacillus* sp. é um gênero com poucos representantes patogênicos, capazes de formar esporos e encontrados em alimentos, ambientes terrestres (como solo e rochas), poeiras, plantas, trato gastrintestinal de animais e ambiente aquático (GATESOUBE, 1999; NICHOLSON, 2002). Diversas espécies de *Bacillus* sp. são empregadas em cultivos de camarão a fim de melhorar a qualidade do ambiente e conseqüentemente, o desempenho do animal (WANG, 2007; ZHOU et al., 2009; ZHAO et al., 2012). Dessa forma, a bactéria tem sido usada para a melhoria da qualidade da água, no antagonismo contra patógenos e na participação de processos digestivos e resposta imune do animal (VERSCHUERE et al., 2000; HAI & FOTEDAR, 2010; ABRIQUEL et al., 2011; ZOKAEIFAR et al., 2012; LIU et al., 2015).

O uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) proporciona um aumento na velocidade e na sensibilidade de detecção de micro-organismos sem a necessidade do emprego de técnicas dependentes de cultivo (CAIPANG & AGUANA, 2011). Na aquicultura, a PCR tem sido usada principalmente na detecção de patógenos (ROBERT-PILLOT et al., 2010; CAIPANG & AGUANA, 2011; JEYASEKARAN et al., 2011; ZHANG et al., 2015), mas a presença de probióticos ou grupos dominantes em um cultivo também deve ser pesquisada. O uso desse tipo de técnica é de grande importância para o sucesso em cultivo de camarão, pois permite rapidamente o manejo necessário para prevenir surtos de doenças e perdas na produção (KHAMESIPOUR et al., 2014). A PCR é uma opção para a detecção de grupos bacterianos presentes no biofoco, o que permite relacionar a influência desses grupos sobre a qualidade da água e sobre o animal cultivado, em especial o camarão *L. vannamei*.

Este estudo teve como objetivo investigar, através de PCR convencional e primers gênero-específicos, a presença de *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. na água e em substratos artificiais de cultivos de *L. vannamei* com biofoco localizados em três estados brasileiros (Pernambuco, Rio Grande do Norte e Santa Catarina). Em adição, informações sobre a qualidade da água e o desempenho zootécnico de *L. vannamei* são fornecidas.

Material e Métodos

Desenho experimental e condições de cultivo

O estudo foi conduzido na Estação de Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil), em área externa recoberta por tela de sombreamento (70% de redução de luz). As pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* (2 mg de peso médio) foram obtidas de uma larvicultura comercial localizada no estado do Rio Grande do Norte (Nordeste, Brasil) e, uma semana antes da estocagem, estas pós-larvas foram aclimatadas em dois tanques circulares com 800 L de volume útil, preenchidos com água salgada a 30‰ de salinidade (pH 8, Oxigênio dissolvido 7,5 mg/L, temperatura 25 °C e sem bioflocos). Nesse período, as pós-larvas foram alimentadas com *Artemia* sp. (INVE Technology) a uma concentração de 40 náuplios/pós-larva/dia e um mix de quatro rações comerciais com tamanhos entre 90-400 µm e percentual de proteína bruta (PB) entre 45-48% (INVE Technology).

As pós-larvas foram estocadas a uma densidade de 2000 animais/m³ e alimentadas inicialmente com uma ração de 45% PB fornecida quatro vezes ao dia (8, 11, 14 e 17 horas). Essa ração foi substituída gradativamente por uma ração de 40% PB até o final do cultivo, a uma taxa de alimentação inicial de 50% do peso médio dos camarões. A estocagem foi realizada em nove tanques circulares de fibra de vidro (3,15 m²), com 700 L de volume útil compostos por 500 L de água salgada (30‰) clorada (20 ppm) e declorada e 200 L de inóculo (água contendo bioflocos), sendo todos cobertos com tampa de tela para evitar o escape dos camarões. O inóculo foi oriundo de três tanques matrizes que possuíam água maturada com bioflocos (pH 8, Oxigênio dissolvido 7,5 mg/L, temperatura 25 °C, relação Carbono:Nitrogênio de 6:1 e sólidos sedimentáveis 3 mL/L – valores médios). A água dos três tanques matrizes foi misturada entre si antes de abastecer as unidades experimentais.

Durante todo o estudo não houve trocas de água, apenas reposição com água doce clorada (20 ppm de cloro ativo) e declorada, para ajustar a salinidade e manter o nível de água devido à perdas por evaporação. Melaço de cana de açúcar (30% de carbono) foi adicionado como fonte de carbono quando os níveis do nitrogênio da amônia total (NAT) ficaram acima de 1 mg/L, com base na relação Carbono:Nitrogênio de 6:1 (EBELING et al., 2006; SAMOCHA et al., 2007).

Os tanques foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado e compunham os seguintes tratamentos com três repetições cada: (1) bioflocos com substrato

artificial de tela de polietileno – Tela; (2) bioflocos com substrato artificial de manta de poliéster – Manta e; (3) bioflocos sem substrato artificial (grupo Controle). Nos tratamentos com substratos foram produzidas manualmente quatro faixas verticais de cada tipo de substrato com área igual a $0,51 \text{ m}^2$ (51 cm altura x 50 cm largura x 2 lados), totalizando um aumento de 65% na área do tanque. Estas faixas foram elaboradas na forma de espinhéis e fixadas ao tanque verticalmente. Vigorosa aeração foi mantida através de quatro pedras de aeração por tanque, supridas por um compressor radial de 2,5 CV a fim de evitar acúmulo de sedimentos no fundo do tanque.

Variáveis físico-químicas da água e de desempenho zootécnico

A temperatura, o oxigênio dissolvido (OD), o pH e a salinidade foram registrados diariamente pela manhã (7 horas) e à tarde (16 horas) antes da alimentação, por meio de um multiparâmetro (556 MPS, YSI). Amostras de água foram coletadas semanalmente de cada tanque para análise de amônia total (NAT), nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$), ortofosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$), alcalinidade (expressa em equivalentes de CaCO_3) e sólidos sedimentáveis (SS). As análises de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) foram realizadas quinzenalmente.

As análises de amônia, nitrito, nitrato e ortofosfato foram realizadas por meio de espectrofotômetro (Hach DR 2800), utilizando os métodos 830 (método salicilato), 8507 (método de Diazotização), 8539 (método de Redução de Cádmio) e 8048 (método PhosVer®3), respectivamente, e com absorbâncias lidas a 655, 507, 500 e 880 nm, respectivamente. A alcalinidade foi mantida acima de 160 mg/L, mensurada utilizando método titulométrico e expressa em equivalentes de CaCO_3 . Os sólidos sedimentáveis foram mensurados através de cones de Imhoff (mL/L) e o volume dos flocos nos cones foram determinados após 20 minutos de sedimentação (CRAB et al., 2009).

O desempenho zootécnico das pós-larvas foi avaliado através do peso final (P_f), taxa de crescimento específico (TCE), sobrevivência (S), produtividade (P) e conversão alimentar (FCA), de acordo com as seguintes fórmulas: P_i = peso médio inicial; P_f = peso médio final; $\text{TCE} = 100 (\ln P_f - \ln P_i) / \text{tempo de cultivo}$; $S = 100 (\text{população final} / \text{população inicial})$; $P = \text{biomassa final} / \text{volume do tanque}$; $\text{FCA} = \text{Quantidade de alimento fornecido} / \text{ganho de biomassa em Kg}$.

Coleta e conservação de amostras

Para as análises, foram coletadas amostras de água (80 mL) e dos substratos (0,015 m², considerando os dois lados), de acordo com cada tanque de origem. Dos tanques matriz foram coletadas amostras de água antes da estocagem e, dos tanques experimentais (tratamentos), foram coletadas amostras de água e substrato, no primeiro mês de experimento e na despesca, visando a determinação da presença ou ausência dos gêneros bacterianos ao longo do tempo e em diferentes locais do tanque. Além disso, amostras de água com bioflocos (80 mL) coletadas em diferentes estados brasileiros (Rio Grande do Norte e Santa Catarina) foram acrescentadas ao presente estudo para fins de comparação. Todas as amostras foram congeladas a -20 °C para posterior extração de DNA.

Controles positivo e negativo

Vibrio parahaemolyticus ATCC (17802), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (10145) e *Bacillus subtilis* ATCC (19659) foram usados como controles positivos, enquanto que água ultrapura (Promega™, EUA) foi usada como controle negativo para as análises de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A recuperação da cepa de referência de *V. parahaemolyticus* foi feita através da incubação de 1 mL de suspensão bacteriana criopreservada (50% de glicerol) em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) a 35 °C por 24 horas. Em seguida, este material foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos e o precipitado ressuspensionado em etanol a 95% na proporção de 1:5 (v:v) para posterior extração de DNA.

A ativação das cepas de referência de *P. aeruginosa* e *B. subtilis* foi feita nos caldos BHI e Triptona de Soja (TSB), respectivamente, seguidas de incubação a 35 °C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 100 µL dos caldos destas culturas foi semeada em placas contendo Ágar Cetrimida e Ágar Leite, respectivamente, utilizando a técnica de plaqueamento de superfície. Após 24 horas, as colônias de ambas as culturas foram inoculadas utilizando a técnica da semeadura por estrias, em meio inclinado Ágar Triptona de Soja (TSA) a 35 °C por 24 horas para coloração de Gram e confirmação da morfologia celular. O conteúdo turvado de todos os caldos foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em etanol a 95% e estocado a 4 °C para posterior extração de DNA.

Extração do DNA genômico

As amostras de água foram descongeladas e cuidadosamente tiveram o sobrenadante descartado por pipetagem e o decantado coletado. Para as amostras de substrato, após o descongelamento, foram acrescentados 80 mL de água destilada estéril e o conteúdo foi agitado manualmente para que ocorresse o desprendimento do material aderido ao substrato. Após a agitação, o material foi deixado em repouso para a decantação e posterior coleta. Em todas as amostras, os sólidos decantados foram transferidos para tubos de 2 mL, sendo a estes adicionado etanol a 95 % (proporção 1:5, v:v) para posterior armazenamento a 4 °C. A extração de DNA foi realizada a partir de 200 µL destas amostras.

Por se tratar de amostras ambientais e, desta forma repleta de impurezas, a extração de DNA precisou receber um pré-tratamento, que foi padronizado para todas as amostras inclusive para os controles positivos. Como pré-tratamento, as amostras foram submetidas à maceração com pistilo, seguida de EDTA a 50 mM pH 8 (480 µL) e lisozima a 10 mg/mL (120 µL). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos (com vórtex a cada 20 minutos) e centrifugadas a 14000 rpm durante dois minutos. O DNA genômico foi então extraído das amostras e dos controles positivos usando o Kit Wizard® genomic DNA purification (Promega™ Corporation) de acordo com o protocolo do fabricante.

A quantificação do DNA extraído foi feita através de espectrofotômetro (Nanovue Plus™, Biochrom). A concentração de DNA foi determinada a uma absorbância de 260 nm e a pureza segundo a razão A260/A280 nm. Para uma amostra pura, valores abaixo de 1,8 para a razão A260/A280 indicam contaminação com proteínas ou solventes orgânicos (DHALIWAL, 2013), mas para amostras ambientais tais razões são esperadas devido à larga quantidade de impurezas. Sendo assim, apenas quando foram obtidas razões abaixo de 1,5, o protocolo de extração foi repetido para uma melhor pureza do DNA. Todo DNA extraído foi diluído para uma concentração final de 50 ng/µL e um volume final de 30 µL. A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), na qual foi confirmada a integridade do DNA utilizado nas amplificações de PCR.

PCR e eletroforese

Um total de 41 amostras foi submetido à PCR. A presença dos gêneros *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. nas amostras foi realizada através do uso de regiões específicas já publicadas, utilizando os primers descritos na Tabela 1. As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µL em termociclador (Techne, modelo TC-412, Reino Unido), seguindo as condições de amplificação e ciclo térmico dispostas na Tabela 2. As cepas de referência ATCC foram utilizadas como controles positivos e água ultrapura como negativo.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese (90 V, 150 mA) em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). O tamanho dos produtos de PCR foi estimado através do uso de marcador de peso molecular de 100 pb a cada gel (100 bp DNA ladder, Promega™, EUA). Os produtos amplificados foram visualizados através de um transiluminador de luz UV e fotografados com sistema de captura digital (KODAK Gel Logic 100 System).

Análise de dados

Os testes estatísticos foram empregados para todas as variáveis de qualidade de água (Temperatura, oxigênio dissolvido, pH, compostos nitrogenados, ortofosfato e sólidos sedimentáveis) e variáveis de produção (peso final, taxa de crescimento específico, sobrevivência, produtividade e conversão alimentar). Para o conhecimento sobre a homogeneidade e a normalidade das variâncias foram empregados os testes de Cochran e de Shapiro–Wilk, respectivamente. A análise de Variância (ANOVA, $\alpha = 0.05$) foi usada para determinar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos e o teste de Tukey para a comparação das médias. Para a análise das variâncias não paramétricas (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) foi aplicado o teste de Kruskal Wallis. Os dados de detecção dos diferentes gêneros bacterianos foram analisados através de estatística descritiva. Todos os dados foram analisados através do software SysEAPRO versão 1.0.

Tabela 1. Características dos primers usados no estudo.

Gênero	Primer	Sequência 5'–3'	pb	Referência
<i>Vibrio</i> sp.	VG C2694352 F46	GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG	689	Kim et al. (2015)
	VG C2694352 R734	ACYTTRATRCGNGTTTCRTTRCC		
<i>Pseudomonas</i> sp.	PA-GS-F	GACGGGTGAGTAATGCCTA	618	Spilker et al. (2004)
	PA-GS-R	CACTGGTGTTTCCTTCCTATA		
<i>Bacillus</i> sp.	BK1/F	TCACCAAGGCRACGATGCG	1114	Wu et al. (2006); Savadogo et al. (2011); Taale et al. (2015)
	BK1/R	CGTATTACCGCGGCATG		

Base mista: K = G + T; R = A + G; Y = C + T; N = A + C + G + T

Tabela 2. Condições de amplificação e ciclo térmico de PCR para detecção de *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. em amostras com biofilme.

Condições de amplificação	Mix para PCR (25 µL de volume final)						
	Água ultrapura	Tampão (10x)	MgCl ₂ (50 mM)	dNTP (10 mM)	Primer F e R** (10 pmoles)	Taq Polimerase (5U/µL)	DNA (50 ng/µL)
V _f	17,05 *(14,05)	2,5	0,75	0,5	1 *(2,5)	0,2	2
C _f	-	1	1,5	0,2	0,4 *(1)	1	4
Ciclo térmico							
Gêneros	Desnaturação inicial	Nº ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	
<i>Vibrio</i> sp.	95 °C; 5 min	40 x	95 °C; 1 min	58 °C; 1 min	72 °C; 1 min	72 °C; 10 min	
<i>Pseudomonas</i> sp.	95 °C; 2 min	25 x	94 °C; 20 s	54 °C; 20 s	72 °C; 40 s	72 °C; 1 min	
<i>Bacillus</i> sp.	94 °C; 5 min	30 x	94 °C; 1 min	56 °C; 45s	72 °C; 1 min	72 °C; 10 min	

V_f = volume final em µL; C_f = concentração final; *() Valores para *Vibrio* sp.; **Valores informados para cada primer (F e R).

Resultados

Variáveis físico-químicas da água e de desempenho zootécnico

Temperatura, oxigênio dissolvido, pH, compostos nitrogenados (NAT, N-NO₂ e N-NO₃) e ortofosfato foram estatisticamente iguais entre os tratamentos (Tabela 3). Em todos os tratamentos, a temperatura atingiu valores médios abaixo de 25 °C pela manhã e abaixo de 26 °C à tarde. Os valores médios de NAT foram relativamente altos em todos os tanques experimentais (~2 mg.L⁻¹) apesar da constante aplicação de melaço. Por outro lado, os sólidos sedimentáveis foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos, com maior média (16 mL/L) nos tanques controle (Tabela 3). Valores de sólidos sedimentáveis acima da média foram obtidos apenas nas três últimas semanas de cultivo, atingindo máximo de 20 mL/L no tratamento Manta e 25 mL/L no Controle e Tela (dados não mostrados).

Tabela 3. Variáveis de qualidade de água (média ± erro padrão) do cultivo berçário de *L. vannamei* com bioflocos e substratos artificiais.

Variáveis	Tela		Manta		Controle	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
Temp.	24,7±0,15	25,6±0,16	24,7±0,15	25,6±0,15	24,7±0,15	25,6±0,16
OD	7,2±0,07	6,7±0,10	7,2±0,07	6,6±0,11	7,3±0,07	6,7±0,11
pH	8,0±0,03	7,9±0,04	8,0±0,03	7,8±0,04	7,9±0,04	7,7±0,04
NAT	2,2±0,17		2,1±0,18		2,1±0,19	
N-NO ₂	0,10±0,02		0,09±0,01		0,14±0,03	
N-NO ₃	56,6±4,19		58,1±3,25		62,6±2,86	
PO ₄ ³⁻	22,5±2,39		23,4±1,80		21,8±2,29	
SS	15,0±1,34 ^{ab}		12,0±0,92 ^a		16,0±1,07 ^b	

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os tratamentos. Temp. = temperatura (°C); OD = oxigênio dissolvido (mg/L); NAT = nitrogênio na forma de amônia total (mg/L); N-NO₂ = nitrogênio na forma de nitrito (mg/L); N-NO₃ = nitrogênio na forma de nitrato (mg/L); PO₄³⁻ = ortofosfato (mg/L); SS = sólidos sedimentáveis (mg/L).

De maneira geral, a presença de substratos artificiais não influenciou o desempenho zootécnico das pós-larvas, com exceção à taxa de crescimento específico, que foi estatisticamente maior no tratamento Tela (10,01 %.dia⁻¹) em relação ao Controle (9,46 %.dia⁻¹) (Tabela 4). Os animais atingiram os seguintes valores de peso final (1,1–1,3g), FCA (1,1–1,2) produtividade (1575–1612 g.m³) e sobrevivência (54–64%), sem diferença estatística entre os tratamentos (P≥0,05).

Tabela 4. Desempenho zootécnico (média $\pm$ erro padrão) do cultivo berçário de *L. vannamei* com bioflocos e substratos artificiais.

Tratamentos	Peso final (g)	Sobrevivência (%)	Produtividade (g.m ³)	TCE (%/dia)	FCA
Tela	1,34 $\pm$ 0,07	55,28 $\pm$ 2,07	1612 $\pm$ 23,5	10,01 $\pm$ 0,08 ^b	1,17 $\pm$ 0,02
Manta	1,34 $\pm$ 0,07	54,48 $\pm$ 2,84	1575 $\pm$ 15,8	9,71 $\pm$ 0,08 ^{ab}	1,19 $\pm$ 0,01
Controle	1,14 $\pm$ 0,05	64,26 $\pm$ 4,47	1560 $\pm$ 55,1	9,46 $\pm$ 0,07 ^a	1,21 $\pm$ 0,04

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística entre os tratamentos. TCE = taxa de crescimento específico; FCA = fator de conversão alimentar.

PCR

Das 41 amostras analisadas (água e substrato de cultivos em Pernambuco, Rio Grande do Norte e Santa Catarina – Tabela 5), todas foram negativas para *Pseudomonas* sp. (Figura 1). *Bacillus* sp. foi detectado em quatro amostras de água, sendo duas do Rio Grande do Norte e duas de Santa Catarina, representando um total de 9,7% (Figura 2). Em relação à presença de *Vibrio* sp., apenas uma amostra de água (Santa Catarina) foi positiva, representando 2,4% (Figuras 3). Nenhum destes três gêneros (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Vibrio* sp.) foi detectado em todas as amostras de água e substratos do experimento (cultivo de Pernambuco).

Tabela 5. Informações sobre as amostras coletadas para o estudo.

Origem	Fase de cultivo	Tempo de cultivo	Nome das amostras	
			Água (80 mL)	Substratos (0,015 m ²)
PE - Tanques matriz	Berçário	Estocagem	MA1, MA2, MA4	–
PE - Tanques experimentais	Berçário	Primeiro mês	1A1, 1A2, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9	1S2, 1S3, 1S4, 1S5, 1S7, 1S9
PE - Tanques experimentais	Berçário	Despesca	7A1, 7A2, 7A3, 7A4, 7A5, 7A6, 7A7, 7A8, 7A9	7S2, 7S3, 7S4, 7S5, 7S7, 7S9
RN	Engorda	Primeiro mês	AB4, AB5, AD1, AD2	–
SC	Berçário	Primeiro mês	A1B, A4B	–
	Engorda	Segundo mês	A5E, A6E	–

PE = Pernambuco; RN = Rio Grande do Norte; SC = Santa Catarina.

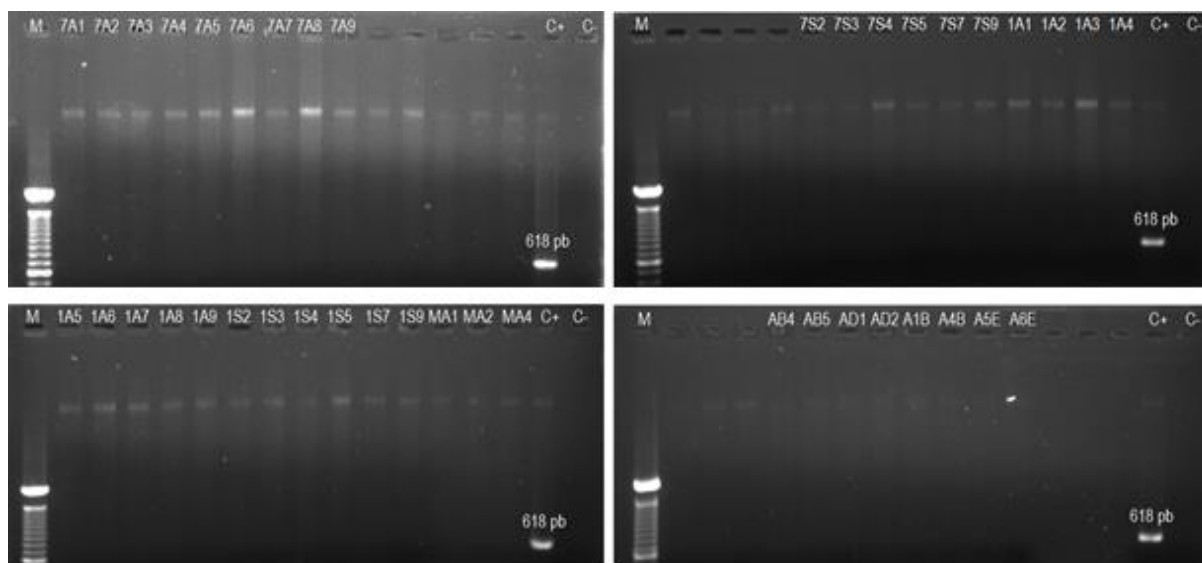


Figura 1. Amplicons para *Pseudomonas* sp. após eletroforese em gel de agarose a 1%. Todas as amostras para *Pseudomonas* sp. foram negativas. M = marcador 100 pb; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. Para legenda das amostras ver Tabela 5.

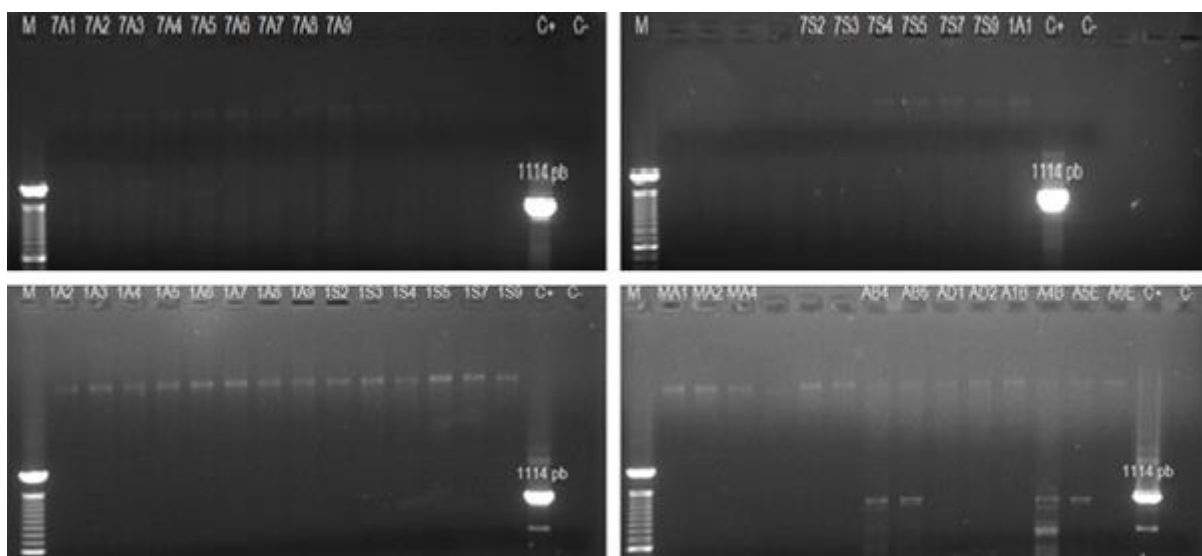


Figura 2. Amplicons para *Bacillus* sp. após eletroforese em gel de agarose a 1%. M = marcador 100 pb; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. Amostras AB4, AB5, A4B e A5E foram positivas para *Bacillus* sp. Para legenda das amostras ver Tabela 5.

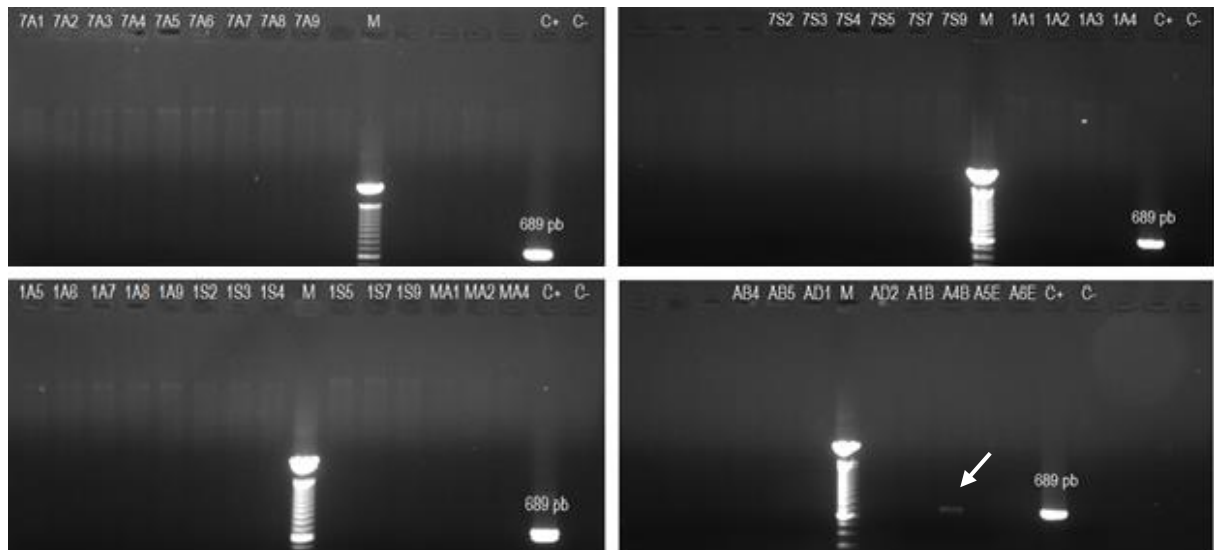


Figura 3. Amplicons para *Vibrio* sp. após eletroforese em gel de agarose a 1%. M = marcador 100 pb; C+ = controle positivo; C- = controle negativo. Apenas A4B foi positiva para *Vibrio* sp. Para legenda das amostras ver Tabela 5.

Discussão

A temperatura é um dos mais importantes fatores reguladores dos organismos aquáticos, sendo um dos principais limitantes por afetar diretamente o metabolismo, o consumo de oxigênio, o crescimento, a taxa de alimentação e a sobrevivência (LUTTERSCHMIDT & HUTCHINSON, 1997; VINATEA, 2010). Os baixos valores de temperatura encontrados no presente estudo (média 24,7 °C manhã e 25,6 °C tarde) ocorreram em virtude das baixas temperaturas ambientais (média de 24 °C) características do período chuvoso (outono e inverno) da zona litorânea do nordeste brasileiro (APAC, 2017).

Ponce-Palafox et al. (1997) relatam melhores valores de sobrevivência e crescimento em temperaturas entre 20–30 °C e 25–35 °C, respectivamente, para salinidades acima de 20 ‰, mas que quando analisados em conjunto um melhor desempenho ocorreria a um intervalo entre 28–30°C. Yan et al. (2007) encontraram valores semelhantes para ótima sobrevivência e crescimento (20–32 °C), em salinidades entre 11–32 ‰. Sendo assim, os valores encontrados estiveram dentro do intervalo de temperatura e salinidade indicado para cultivo de pós-larvas de *L. vannamei*.

Quanto às variáveis de oxigênio dissolvido e pH, estas foram mantidas acima de 4 mg/L e entre 7,5–8,5, respectivamente, como recomenda Chien (1992) para o cultivo de camarões

marinhos. Em sistema de cultivo com bioflocos, temperatura, oxigênio e pH são bastante importantes não apenas para os camarões, como também para todos os micro-organismos presentes, em especial as bactérias e seus processos, como a nitrificação. Tais variáveis foram mantidas em níveis adequados para um bom desempenho bacteriano indicados por diversos autores como Isnansetyo et al. (2014) que recomendam temperatura entre 20–35 °C e pH entre 7.5–8.0, e Cheng & Liu (2001) que relatam condições favoráveis quando concentrações de oxigênio dissolvido são mantidas entre 4–6 mg/L.

Compostos nitrogenados são bastante comuns em aquicultura devido ao excesso de matéria orgânica em decomposição e à excreção dos organismos (FRÍAS-ESPERICUETA & PÁEZ-OSUNA, 2001). Dentre estes compostos, amônia e nitrito são os mais tóxicos e podem afetar a saúde, o crescimento e a sobrevivência dos organismos (LIN & CHEN, 2001, 2003). Nitrito e nitrato permaneceram dentro da faixa considerada ideal para *L. vannamei* durante todo o cultivo (LIN & CHEN, 2003; FURTADO et al., 2015, 2016; MELO et al., 2016). Por outro lado, os valores médios de NAT (~ 2 mg/L) estiveram acima dos níveis de segurança recomendados por Frias-Espéricueta et al. (2000) para pós-larvas de *L. vannamei* (1,22 mg/L NAT). Isto pode explicar a baixa sobrevivência encontrada em todos os tratamentos (54% Manta, 55% Tela e 64% Controle). Sakkaravarthi (2015) também observou baixa sobrevivência (70%) com 1.02 mg/L de amônia e Kir & Kumlu (2006) relatam que a mortalidade aumenta com o aumento das concentrações de amônia e tempo de exposição.

Os altos valores de amônia do presente estudo podem estar associados à alta quantidade de excretas e restos de ração decorrentes da densidade de estocagem (2000 animais/m³), atrelado à ineficiência da redução de NAT mesmo quando melaço foi adicionado à água na relação C:N de 6:1. Tal resultado mostrou-se contrário aos obtidos por Ebeling et al. (2006), Samocha et al. (2007) e Xu et al. (2016), que ao utilizarem a mesma relação C:N em sistemas de biofloco conseguiram manter esta variável dentro dos valores aceitos para a espécie.

Talvez uma maior relação C:N como a de 10-20:1 usada em outros estudos (ASADUZZAMAN et al., 2008; EMERENCIANO et al., 2013; KUMAR et al., 2014) com base no nitrogênio da ração possa conferir melhores condições para a atuação das bactérias heterotróficas sobre a qualidade da água e consequentemente, sobre a sobrevivência do animal cultivado. Segundo Arnold et al. (2006, 2009) a elevação das concentrações de TAN e diminuição da sobrevivência são mais expressivos conforme o aumento da densidade. Arnold

et al. (2006) testaram densidades de 1000 e 2000 pós-larvas/m³ de *P. monodon*, ambos com e sem substratos e encontraram valores de TAN abaixo de 1 mg/L e sobrevivência igual a 88,1% e 82,2%, respectivamente. Já Arnold *et al.* (2009) avaliaram densidades (2500 e 5000 pós-larvas/m³ de *P. monodon*) e substratos (presença e ausência) e alcançaram resultados semelhantes aos do presente estudo. Tais autores encontraram valores de TAN abaixo de 2 mg/L e sobrevivência igual a 69% e 60,6%, respectivamente. Sendo assim, para uma maior sobrevivência e melhores níveis de TAN, menor densidade de estocagem deve ser empregada no cultivo de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*.

A presença e o tipo de substratos não interferiram sobre a qualidade da água ou o desempenho do camarão, com exceção dos sólidos sedimentáveis (16, 15, 12 mL/L em Controle, Tela e Manta, respectivamente) e da taxa de crescimento específico (10; 9,7; 9,5 %/dia em Tela; Manta e Controle, respectivamente). Asaduzzaman et al. (2008) maturaram os substratos (100% de aumento de área) por 10 dias e encontraram melhoria na qualidade da água, maior abundância de bactérias heterotróficas, além de aumento na sobrevivência (de 62,8 para 72%) e produtividade (75% maior) do camarão. Similarmente, Schweitzer et al. (2013) utilizaram substratos maturados com aumento de 100% da área do tanque. Contudo, observaram influência apenas no desempenho do camarão, relatando que os substratos aumentaram a área de superfície e reduziram a densidade relativa, mas sem efeito na qualidade da água e na atividade microbiana. Por outro lado, Anand et al. (2013), que também usaram substratos maturados mas com aumento de apenas 15% da área do tanque, observaram redução dos compostos nitrogenados, aumento do número de bactérias heterotróficas e autotróficas e aumento de crescimento e sobrevivência quando os substratos foram empregados. Sob as condições de alta densidade encontradas, acredita-se que a maturação dos substratos e um aumento de área maior que 65% seriam necessários para uma maior aceleração do desenvolvimento das bactérias heterotróficas e principalmente das nitrificantes, cujo desenvolvimento é mais lento, em torno de 4 a 8 semanas segundo KUHN et al. (2010).

Os três gêneros bacterianos (*Vibrio*, *Pseudomonas* e *Bacillus*) investigados são amplamente encontrados em cultivos de camarão e podem possuir ação probiótica, de biorremediação, de biocontrole ou patogênica (BALCÁZAR et al., 2007; ZHANG et al., 2016). *Vibrio* sp. é típico de ambientes marinhos e estuarinos constituindo-se, portanto, como parte da microbiota normal dos peneídeos, com muitas espécies citadas como patógenos em

vários estágios de vida do camarão (VANDENBERGHE et al., 1999). No presente estudo, *Vibrio* sp. foi encontrado em apenas uma amostra de água (Santa Catarina) e isto foi confirmado após várias reações de PCR para confirmação dos resultados.

Baixa carga de *Vibrio* sp. e até a sua ausência tem sido relatada em diversos cultivos com biofloco. A diminuição e o desaparecimento de *Vibrio* sp. após algumas semanas foi relatado por Monroy-Dosta et al. (2013), os quais atribuem o fato ao aumento de outros micro-organismos heterotróficos que, por competição, conseguem impedir a proliferação do patógeno. Souza et al. (2014) verificaram baixa quantidade de *Vibrio* spp. no biofloco (20.10^2 UFC/mL) em comparação com o controle em água clara (80.10^2 UFC/mL). Da mesma forma, Cardona et al. (2016) detectaram menor abundância de *Vibrio* sp. no biofloco (0.01 %) que em água clara (0.73 %). Os mesmos autores relatam que no sistema com biofloco os camarões são menos expostos às vibrioses, possivelmente devido à competição bacteriana e à comunicação via *quorum sensing*, como acontece com *Vibrio harveyi* (CRAB et al., 2010) e *Bacillus subtilis* (KUMAR & SINGH, 2013).

Com relação ao gênero *Pseudomonas* sp., este é composto por bactérias heterotróficas que ajudam na mineralização de nutrientes, com alguns representantes patogênicos e outros probióticos (CHYTHANYA et al., 2002; RATTANACHUAY et al., 2010). Apesar de serem comumente encontrados em cultivos de peixes e crustáceos, *Pseudomonas* sp. não foi detectado em nenhuma das amostras deste estudo. Por outro lado, a presença de *Bacillus* sp. em quatro amostras de água (Rio Grande do Norte e Santa Catarina) deve-se a adição da bactéria como probiótico nesses cultivos. Normalmente essa bactéria é adicionada aos cultivos para a melhoria da qualidade da água, competição contra patógenos e maior desempenho do camarão (ZOKAEIFAR et al., 2012; LIU et al., 2015), mas também pode ser encontrada naturalmente no ambiente de cultivo (GATESOUBE, 1999; NICHOLSON, 2002; FERREIRA et al., 2015). Devido ao seu rápido crescimento, capacidade de esporulação e produção de grande variedade de substâncias antimicrobianas, quando adicionada ao biofloco, *Bacillus* sp. predomina sobre as demais bactérias, inclusive as patogênicas como *Vibrio* sp. (ABRIOUEL et al., 2011; ZHAO et al., 2012).

Nenhum dos três gêneros foi detectado em todas as amostras de água e substratos do cultivo de Pernambuco. Schweitzer et al. (2013) relatam que altas densidades de camarão e o excesso de sólidos suspensos em sistemas super-intensivo com biofloco podem limitar o

desenvolvimento do perifíton e das bactérias nos substratos que, por sua vez, são mais abundantes na água. No presente trabalho, tal fenômeno pode ter culminado na ausência dos gêneros avaliados nos diferentes substratos ao longo do experimento.

Para a ausência na água, outros estudos apontam que há uma estreita relação entre a temperatura da água e a presença de bactérias, na qual altas temperaturas permitem maior diversidade e riqueza bacteriana do que temperaturas mais baixas (RUNGRASSAMEE et al., 2013; TANG et al., 2014), condição encontrada neste estudo. Um exemplo é a distribuição de *Vibrio* spp., o qual depende principalmente da temperatura da água, da concentração de sódio e da carga orgânica para se desenvolver (CABRAL, 2010). Contudo, é importante salientar que a diversidade bacteriana em cultivo com biofilme é controlada não apenas por fatores físico-químicos, mas também pela capacidade de exclusão competitiva e produção de compostos antimicrobianos entre populações bacterianas, principalmente quando se trata de patógenos (NICHOLSON, 2002; WU et al., 2012), o que confere vantagens do biofilme sobre o uso de sistemas de cultivo convencionais. Sendo assim, a detecção e o controle de grupos bacterianos são importantes para o equilíbrio do cultivo, e a investigação através de PCR convencional mostrou ser uma ferramenta simples e rápida para a avaliação de amostras provenientes de cultivo intensivo com biofilme sem a necessidade de isolamento prévio em cultura.

Conclusão

- A utilização de PCR simples juntamente com primers específicos na detecção de gêneros bacterianos do biofilme é uma ferramenta rápida, sensível e específica em comparação com técnicas baseadas em cultivo e possui um grande potencial para detecção de grupos bacterianos presentes no biofilme;
- Com exceção de *Bacillus* sp., que foi encontrado em dois dos três cultivos com biofilme, *Pseudomonas* sp., não esteve presente e *Vibrio* sp. não foi dominante nos diferentes cultivos com biofilme e, sendo assim, o biofilme, atrelado a condições ambientais, produziu baixa carga de patógenos. Nenhum dos três gêneros foram detectados nas amostras de água e substratos do cultivo de Pernambuco;

Agradecimentos

À CAPES pelo financiamento da bolsa de doutorado de Maria Gabriela P. Ferreira e ao CNPq pela bolsa de produtividade do Prof. Dr. Eudes S. Correia (Proc. 305144/2010-3). À Camanor e à Universidade Federal de Santa Catarina por permitir a coleta de amostras.

Referências Bibliográficas

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M.A.P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. **Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins***. FEMS Microbiology Reviews, v.35, n.1, p.201-232, 2011.

APAC, Agência Pernambucana de águas e clima. **Meteorologia**. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia>. Acesso realizado em janeiro de 2017.

ARNOLD, S.J.; SELLARS, M.J.; CROCOS, P.J.; COMAN, G.J. **Intensive production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evaluation of stocking density and artificial substrates**. Aquaculture, v.261, p.890–896, 2006.

ARNOLD, S.J.; COMAN, F.E.; JACKSON, C.J.; GROVES, S.A. **High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density**. Aquaculture, v.293, p.42–48, 2009.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology: A practical guide book**. The World Aquaculture Society, 1th ed., Baton Rouge, Louisiana, United States, 182 pp. 2009.

ANAND, P.S.S.; KUMAR, S.; PANIGRAHI, A.; GHOSHAL, T.K.; DAYAL, J.S.; BISWAS, G.; SUNDARAY, J.K.; DE, D.; RAJA, R.A.; DEO, A.D.; PILLAI, S.M.; RAVICHANDRAN, P. **Effects of C:N ratio and substrate integration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles**. Aquaculture International, v.21, p.511–524, 2013.

ANAND, P.S.S.; KOHLI, M.P.S.; KUMAR, S.; SUNDARAY, J.K.; ROY, S.D.; VENKATESHWARLU, G.; SINHA, A.; PAILAN, G.H. **Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon***. Aquaculture, v.418–419, p.108–115, 2014.

ASADUZZAMAN, M.; WAHAB, M.A.; VERDEGEM, M.C.J.; HUQUE, S.; SALAM, M.A.; AZIM, M.E. **C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds**. Aquaculture, v.280, p.117–123, 2008.

AUDELO-NARANJO, J.M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R.; VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, S. **Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates**. Aquaculture Research, v.42, p.1371-1377, 2011.

AUDELO-NARANJO, J.M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, S. VOLTOLINA, D. **Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* without water exchange and with an artificial substrate.** Hidrobiológica, v.22, n.1, p.1-7, 2012.

BALCÁZAR, J.L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, D.P. **Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*.** Journal of Invertebrate Pathology, v.96, p.147–150, 2007.

CABRAL, J.P.S. **Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v.7, p.3657-3703, 2010.

CAIPANG, C.M.A. & AGUANA, M.P.N. **Conventional PCR assays for the detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture in the Philippines.** Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society, v.4, n.3, 2011.

CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; LORGEUX, B.; PIQUEMAL, D.; PIERRAT, F.; NOGUIER, F.; SAULNIER, D. **Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system.** BMC Microbiology, p.1-9, 2016.

CHENG, J. & LIU, B. **Nitrification/denitrification in intermittent aeration process for swine waste water treatment.** Journal of Environmental Engineering, v.127, n.8, p.705-711, 2001.

CHIEN, Y.H. **Water quality requirements and management for marine shrimp culture.** Pages 144–156. In: J. Wyban, editor. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Baton Rouge, World Aquaculture Society. 1992.

CHYTHANYA, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. **Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain.** Aquaculture, v.208, p.1–10, 2002.

CRAB, R.; KOCHVA, M.; VERSTRAETE, W.; AVNIMELECH, Y. **Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia.** Aquacultural Engineering, v.40, n.3, p.105–112, 2009.

CRAB, R.; LAMBERT, A.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. **The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*.** Journal of Applied Microbiology, v.109, n.5, p.1643–9. 2010.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. **Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges.** Aquaculture, v.356–357, p.351–356, 2012.

DHALIWAL, A. 2013. **Extração e purificação de DNA.** Materiais e Métodos 2013;3:191, 16 p. Disponível em <http://www.labome.com.br/method/DNAExtractionandPurification.html>. Acesso em 17/01/2017.

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

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; PAREDES, A.; GAXIOLA, G. **Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc.** Aquaculture International, v.21, p.1381–1394, 2013.

- FAR, H.Z.; SAAD, C.R.B.; DAUD, H.M.; KAMARUDIN, M.S.; RAMEZANI-FARD, E. **Isolation and Identification of Bacteria Micro Flora of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, with Antagonistic Properties Against *Vibrio* Species**. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, v.8, p.293-300, 2013.
- FERREIRA, G.S.; BOLÍVAR, N.C.; PEREIRA, S.A.; GUERTLER, C.; VIEIRA, F.N.; Mouriño, J.L.P.; Seiffert, W.Q. **Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei***. Aquaculture, v.448, p.273–279, 2015.
- FRIAS-ESPERICUETA, M.G.; HARFUSH-MELENDZ, M.; PÁEZ-OSUNA, F. **Effects of Ammonia on Mortality and Feeding of Postlarvae Shrimp *Litopenaeus vannamei***. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, v.65, p.98-103, 2000.
- FRÍAS-ESPERICUETA, M. G., & F. PÁEZ-OSUNA. **Toxicidad de los compuestos de nitrógeno en camarones**. Páginas 224-242 in F. Páez-Osuna, editor. Camaronicultura y medio ambiente. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2001.
- FURTADO, P.S.; CAMPOS, B.R.; SERRA, F.P.; KLOSTERHOFF, M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY, W.Jr. **Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT)**. Aquaculture International, v.23, p.315–327, 2015.
- FURTADO, P.S.; VALENZUELA, M.A.J.; RODRIGUEZ-FUENTES, G.; CAMPOS, B.R.; WASIELESKY, W.Jr.; GAXIOLA, G. **Chronic effect of nitrite on the rearing of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in two salinities**. Marine and freshwater behaviour and physiology, v.49, n.3, p.201–211, 2016.
- GATESOUPÉ, F.J. **The use of probiotics in aquaculture**. Aquaculture, v.180, p.147–165, 1999.
- HAI, N.V. & FOTEDAR R. **A Review of Probiotics in Shrimp Aquaculture**. Journal of Applied Aquaculture, v.22, p.251–266, 2010.
- ISNANSETYO, A.; GETSU, S.; SEGUCHI, M.; KORIYAMA, M. **Independent effects of temperature, salinity, ammonium concentration and pH on nitrification rate of the Ariake seawater above mud sediment**. HAYATI Journal of Biosciences, v.21, n.1, p.21-30, 2014.
- JEYASEKARAN, G.; RAJ K.T.; SHAKILA, R.J.; THANGARANI, A.J.; SUKUMAR, D. **Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the specific detection of toxin-producing *Vibrio cholera* in fish and fishery products**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.90, p.1111–1118, 2011.
- KHAMESIPOUR, F.; NOSHADI, E.; MORADI, M.; RAISSY, M. **Detection of *Vibrio* spp. in shrimp from aquaculture sites in Iran using polymerase chain reaction (PCR)**. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society, v.7, n.1, 2014.
- KIM, J.-S.; MELE, P.M.; CROWLEY, D.E. **Application of PCR primer sets for detection of *Pseudomonas* sp. functional genes in the plant rhizosphere**. Journal of Agricultural Chemistry and Environment, v.2, n.1, p.8-15, 2013.
- KIM, H.-J.; RYU, J.-O.; LEE, S.-Y.; KIM, E.-S.; KIM, H.-Y. **Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics**. BMC Microbiology, v.15, n.239, p.1–12, 2015.

- KIR, M. & KUMLU, M. **Acute Toxicity of Ammonia to *Penaeus semisulcatus* Postlarvae in Relation to Salinity**. Journal of the world aquaculture society, v.37, n.2, 2006.
- KUHN, D.D.; DRAHOS, D.D.; MARSH, L.; FLICK Jr., G.J. **Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems**. Aquacultural Engineering, v.43, p.78–82, 2010.
- KUMAR, S.; ANAND, P.S.S.; DE, D.; SUNDARAY, J.K.; RAJA, R.A.; BISWAS, G.; PONNIAH, A.G.; GHOSHAL, T.K.; DEO, A.D.; PANIGRAHI, A.; MURALIDHAR, M. **Effects of carbohydrate supplementation on water quality, microbial dynamics and growth performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*)**. Aquaculture International, v.2, p.901–912, 2014.
- KUMAR, A. & SINGH, T.R. **A quantitative study of gene regulatory pathways in *Bacillus subtilis* for virulence and competence phenotype by quorum sensing**. Systems and Synthetic Biology, v.7, p.33–39, 2013.
- LIN, Y.C. & CHEN, J.C. **Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei*, Boone juveniles at different salinity levels**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 259:109–119. 2001.
- LIN, Y.C. & CHEN, J.C. **Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels**. Aquaculture, v.224, p.193–201, 2003.
- LIU, X.-F.; LI, Y.; LI, J.-R.; CAI, L.-Y.; LI, X.-X.; CHEN, J.-R.; LYU, S.-X. **Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture**. World journal of microbiology and biotechnology, v.31, p.795–803, 2015.
- LÓPEZ, J.R.; NAVAS, J.I.; THANANTONG, N.; HERRAN, R. de la; SPARAGANO, O.A.E. **Simultaneous identification of five marine fish pathogens belonging to the genera *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Photobacterium* and *Pseudomonas* by reverse line blot hybridization**. Aquaculture, v.324–325, p.33–38, 2012.
- LUTTERSCHMIDT, W.I. & HUTCHINSON, V.H. **The critical thermal maximum: history and critique**. Can. J. Zool., v.75, p.1561–1574, 1997.
- MELO, F.P.; FERREIRA, M.G.P.; BRAGA, I.F.M.; CORREIA, E.S. **Toxicidade do nitrito para o camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistemas de água clara e bioflocos**. Boletim do Instituto de Pesca, v.42, n.4, p.861-871, 2016.
- MONROY-DOSTA, M.C.; LARA-ANDRADE, R.; CASTRO-MEJÍA, J.; CASTRO-MEJÍA, G.; COELHO-EMERENCIANO, M.G. **Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia**. Revista de Biología Marina y Oceanografía, v.48, n.3, p.511-520, 2013.
- MORIARTY, D.J.W. **Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds**. Aquaculture, v.164, p.351–358, 1998.
- NICHOLSON, W. **Roles of *Bacillus* endospores in the environment**. Cellular and Molecular Life Sciences, v.59, n.3, p.410-416, 2002.
- PONCE-PALAFOX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C.A.; ROSS, L.G. **The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931**. Aquaculture, v.157, p.107-115, 1997.

RANGEL, A.B.F.; SOARES, J.T.A.; PEREIRA, M.M.; PEÇANHA, B.R.B.; COSTA, L.E.O.; NASCIMENTO, J.S. **Inhibition of food-related bacteria by antibacterial substances produced by *Pseudomonas* sp. strains isolated from pasteurized milk.** Brazilian journal of food technology, Campinas, v.16, n.4, p.326-333, 2013.

RATTANACHUAY, P. KANTACHOTE, D.; TANTIRUNGKIJ, M.; NITODA, T.; KANZAKI, H. **Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp. W3.** Electronic Journal of biotechnology, v.13, n.1, p.1-11, 2010.

REBOUÇAS, R.H.; SOUSA, O.A.; LIMA, A.S.; VASCONCELOS, F.R.; CARVALHO, P.B.; VIEIRA, R.H.S.F. **Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil.** Environmental Research, v.111, n.1, p.21–24, 2011.

ROBERT-PILLOT, A.; COPIN, S.; GAY, M.; MALLE, P.; QUILICI, M.L. **Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR.** International Journal of Food Microbiology, v.143, p.190–197, 2010.

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; CHAIYAPECHARA, S.; MAIBUNKAEW, S.; TANGPHATSORNRUANG, S.; JIRAVANICHPAISAL, P.; KAROONUTHAISIRI, N. **Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under Different Growth Stages.** PLoS ONE, v.8, n.4, e60802, 2013.

SAKKARAVARTHI, K. **Determination of effective microbial community for biofloc shrimp culture system.** International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, v.3, n.1, p.276-281, 2015.

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

SAVADOGO, A.; TAPI, A.; CHOLLET, M.; WATHELET, B.; TRAORÉ, A.S.; JACQUES, Ph. **Identification of surfactin producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using Polymerase Chain Reaction and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry methods.** International Journal of Food Microbiology, v.151, p.299–306, 2011.

SCHVEITZER, R.; ARANTES, R.M.; BALOI, F.; COSTÓDIO, P.F.S.; VINATEA, L.A.; SEIFFERT, W. Q.; ANDREATTA, E.R. **Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates.** Aquacultural Engineering, v.54, p.93–103, 2013.

SOUZA, D.M. de; SUITA, S.M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY, W.Jr.; BALLESTER, E.L.C. **Use of molasses as a carbon source during the nursery rearing of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Biofloc technology system.** Aquaculture Research, v.45, p.270–277, 2014.

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. **PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients.** Journal of Clinical Microbiology, v.42, n. 5, p.2074–2079, 2004.

TAALE, E.; SAVADOGO, A.; ZONGO, C.; SOMDA, M. K.; SEREME, S. S.; KAROU, S. D.; SOULAMA, I.; TRAORE, A. S. **Characterization of *Bacillus* species producing Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) isolated from fermented food in Burkina Faso.** International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, v.2, n.4, p.279–290, 2015.

TANG, Y.; TAO, P.; TAN, J.; MU, H.; PENG, L.; YANG, D.; TONG, S.; CHEN, L. **Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns.** International Journal of Molecular Sciences, v.15, p.13663-13680, 2014.

VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-ARZARENA, R.; RIVERA, G.; BOLLAND, A.; BALLADARES, M.; GOMEZ-GIL, B.; CALDERON, J.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J.; ***Vibrios* Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics.** Applied and environmental microbiology, v.65, n.6, p. 2592–2597, 1999.

VAN DER MEEREN, T.; BRUNVOLD, L.; SANDAA, R.-A.; BERGH, Ø.; CASTBERG, T.; THYRHAUG, R.; MANGOR-JENSEN, A. **Water quality and microbial community structure in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) cultures.** Aquaculture, v.316, p.111–120, 2011.

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.

VINATEA, L. A. **Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas.** Florianópolis: UFSC, 3ª edition, 238p, 2010.

WANG, Y.-B. **Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*.** Aquaculture, v.269, p.259–264, 2007.

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

WU, X.-Y.; WALKER, M.J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. **Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance.** Journal of Microbiological Methods, v.64, p.107–119, 2006.

WU, L.; PENG, C.; PENG, Y.; LI, L.; WANG, S.; MA, Y. **Effect of wastewater COD/N ratio on aerobic nitrifying sludge granulation and microbial population shift.** Journal of Environmental Sciences, v.24, n.2, p.234–241, 2012.

XU, W.J.; PAN, L.Q.; SUN, X.H.; HUANG, J. **Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks.** Aquaculture Research, v.44, p.1093–1102, 2013.

XU, W.-J.; MORRIS, T.C.; SAMOCHA, T.M. **Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system.** Aquaculture, v.453, p.169–175, 2016.

YAN, B.; WANG, X.; CAO, M. **Effects of salinity and temperature on survival, growth, and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*.** Journal of Shellfish Research, v. 26, n. 1, p.141–146, 2007.

ZHANG, Z.; XIAO, L.; LOU, Y.; JIN, M.; LIAO, C.; MALAKAR, P.K.; PAN, Y.; ZHAO, Y. **Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp.** Food Control, v.51, p.31-36, 2015.

ZHANG, H.; SUN, Z.; LIU, B.; XUAN, Y.; JIANG, M.; PAN, Y.; ZHANG, Y.; GONG, Y.; LU, X.; YU, D.; KUMAR, D.; HU, X.; CAO, G.; XUE, R.; GONG, C. **Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors.** Aquaculture, v.455, p.97–108, 2016.

ZHAO, P.; HUANG, J.; WANG, X.-H.; SONG, X.-L.; YANG, C.-H.; ZHANG, X.-G.; WANG, G.-C. **The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicas*.** Aquaculture, v.354–355, p.97–106, 2012.

ZHOU, X.-X.; WANG, Y.-B.; LI, W.-F. **Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities.** Aquaculture, v.287, p.349–353, 2009.

ZHOU, J.; FANG, W.; YANG, X.; ZHOU, S.; HU, L.; LI, X.; QI, X.; SU, H.; XIE, L. **A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strain Is Associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp.** PLoS ONE, v. 7, n.2, e29961, 2012.

ZOKAEIFAR, H.; BALCÁZAR, J.L.; SAAD, C.R.; KAMARUDIN, M.S.; SIJAM, K.; ARSHAD, A.; NEJAT, N. **Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.** Fish & Shellfish Immunology, v.33, p.683e689, 2012.

3- Artigo científico II

Antibacterial Activity of Commercial Molasses Commonly Used in Biofloc Technology**Abstract**

Heterotrophic and autotrophic bacteria are important organisms in biofloc culture to maintain water quality and balance of the system. All biotic and abiotic factors are interrelated and the control of these variables is essential to the culture success. Therefore, any variation that compromises bacteria viability can be fatal to shrimp. The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of commercial molasses on four reference pathogenic strains to aquatic animals (*Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, and *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813) and on bacteria isolated from shrimp culture water samples with commercial molasses. Additionally, total heterotrophic bacteria (THB) and total autotrophic bacteria (TAB) were quantified in water samples. Total heterotrophic bacteria (THB) counts in water samples ranged from 1.2×10^4 to 3.3×10^4 CFU/mL and total autotrophic bacteria (TAB) counts were low with $< 10^3$ CFU/mL in all samples. Four distinct colonies were isolated from water samples according to their morphology, and were identified as *Staphylococcus epidermidis*, *Microbacterium* sp., *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, and *Neisseria* sp. In relation of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination, except for *P. aeruginosa*, all bacteria were inhibited according to increase in molasses concentration. Commercial molasses enriched with minerals and destined to bovine supplementation is not indicated for use in biofloc culture due its antibacterial action. This is the first study that describes antibacterial activity of commercial molasses in systems with biofloc technology (BFT).

Keywords: *L. vannamei*, shrimp, carbon source, water quality, BFT

Introduction

Intensive systems with biofloc technology (BFT) work with limited or no water exchange, use biofloc as supplementary nutritional source, allow water reuse in other cycles, and implement biosecurity measures in order to prevent entry, spread and output of pathogens (WASIELESKY *et al.*, 2006; CRAB *et al.*, 2012; KRUMMENAUER *et al.*, 2014). This advantages are possible due mainly to induction of heterotrophic and autotrophic bacteria developments that remove nitrogenous compounds, controlling water quality and improving shrimp performance (AVNIMELECH, 2009).

Nitrogenous compounds occur naturally in aquatic environments and they are formed from excretion of organisms and degradation of feed remains (GROSS *et al.*, 2000). Among the principal nitrogenous compounds (ammonia, nitrite and nitrate), ammonia (especially NH_3) is the most toxic (FRÍAS-ESPERICUETA *et al.*, 2001), although nitrate is found in greater concentration in biofloc cultures, but with lower toxicity (LIN & CHEN, 2001; FURTADO *et al.*, 2015). Toxicity of nitrogenous compounds is dependent on pH, temperature and salinity and the non-observance of the safety limits may lead to low growth and mortality of cultured animals (VINATEA, 2010).

Control of nitrogenous compounds is achieved by the adjustment of carbon / nitrogen ratio (C/N). Addition of a carbon source is one of the most important factors in biofloc, because it stimulates heterotrophic growth (forty times faster than autotrophic) and ammonia assimilation, recycling toxic compound in microbial biomass for shrimp supplementary feeding (AVNIMELECH, 1999, 2009; EBELING *et al.*, 2006). Autotrophic bacteria, in turn, have slower development (around four to eight weeks), but they are also very important for the system to perform nitrification and contribute to the water nitrogen removal (KUHN *et al.* 2010).

Molasses is the most abundant and cheap carbon source found in Brazil due the high production of sugarcane (MAPA, 2016). Molasses is a by-product of sugarcane with approximately 50% sugar (LIU *et al.*, 2012) and 30% of carbon. Moreover, it can be found in lesser proportion, minerals (metal ions as calcium, iron, magnesium, phosphorus, potassium, sodium and zinc), vitamins, lipids (JIANG *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012), and antioxidants such as flavonoid derivatives (GUAN *et al.*, 2014).

In BFT a wide carbon/nitrogen ratio between 6-20, using molasses as carbon source to stimulate heterotrophic growth until autotrophic development has achieved excellent results in water quality and shrimp performance (SAMOCHA *et al.*, 2007; EMERENCIANO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2014). However, not all molasses is suitable for use as carbon source in aquaculture, especially those intended for specific purposes, because the excess of metal ions is harmful, despite being essential element for many microorganisms (LIU *et al.* 2012; LEMIRE *et al.* 2013).

Therefore, knowing the importance of heterotrophic and autotrophic bacteria to maintain water quality and balance of the system, any variation that compromises their viability can be fatal to shrimp. Thus, the aim of this study was to investigate the antibacterial activity of commercial molasses on four reference pathogenic strains to aquatic animals and on bacteria isolated from shrimp culture water samples with commercial molasses. Additionally, total heterotrophic bacteria (THB) and total autotrophic bacteria (TAB) were quantified in water samples.

Material and Methods

Sampling

Nine water samples were collected from *Litopenaeus vannamei* grow out intensive culture system with biofloc (mean weight: 1,4 g – initial and 11 g – final, stocking density: 450 shrimp/m³) located at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil. In all samples, commercial sugar cane molasses enriched with micro minerals intended for energy supplementation of bovines (see its composition in Table 1) was added for ammonia control in a C/N ratio of 6:1 based on total ammonia nitrogen - TAN (EBELING *et al.*, 2006).

Table 1. Basic composition and use indication of commercial molasses employed in this study.

Molasses composition	Levels
Magnesium oxide	(Mg) 5.000mg/Kg
Iron sulfate	(Fe) 1.870mg/Kg
Cobalt sulfate	(Co) 46mg/Kg
Copper sulphate	(Cu) 200mg/Kg
Manganese sulfate	(Mn) 1000mg/Kg
Zinc oxide	(Zn) 700mg/Kg
Calcium iodate	(I) 40mg/Kg
Sodium selenite	(Se) 5mg/Kg
Sulfur	(S) 5.400mg/Kg
Sulfur	0.64 %
Carbon	30.86 %
Hydrogen	6.49 %
Nitrogen	0.48 %
Indication: For use in energetic mineral supplementation of bovines.	

Counting and Isolation of Heterotrophic and Autotrophic Bacteria

The water samples were collected from all tanks on the last day of culture, stored in sterile containers, and immediately put up in an isothermal box for the transport. At the laboratory, the samples were counting through the technique of "spread plate" using Plate Count Agar (PCA) medium for heterotrophic bacteria, and specific mediums for autotrophic bacteria (Oliveira 2003). Different morphologies of colonies were selected, peaked, purified and stored in Brain Heart Infusion (BHI) Agar medium for identification.

Molecular Identification of Bacteria

The extraction and purification of bacterial DNA was performed according to the protocol provided by PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen). Genomic DNA was quantified by fluorometer (Qubit® 2,0 Fluorometer / Invitrogen). The PCR reaction for the 16S rRNA gene was performed using the primers P1 (8-27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and P2 (1520-1541r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (AO *et al.*, 2012) in a final volume of 30 µL

containing 0,3 μ M of each primer, 15 μ l of 2x GoTaq Master Mix PCR SyberGreen (Promega), 10 ng/ μ L of bacterial DNA, and ultrapure water. The thermal cycle was: 95 C for 2 min, followed by 35 cycles of 95 C for 40 s, 55 C for 40 s, 72 C for 90 s, ending at 72 C for 10 min. PCR product (1400-1500 bp) was visualized after electrophoresis in 1.5 % agarose gel stained with Blue green loading dye (LGC Bio).

PCR products were purified, quantified, and the concentration was adjusted at 10 and 40 ng / μ L, for sequencing analysis (Genetic Analyzer ABI 3500). The STADEN 1.6 software package (Pregap 4, Trev, and Gap 4 tools) were used for chromatograms analysis. The BLAST software package was used to compare the nucleotide sequences found to sequence from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). For species identification was assumed a 97% minimum similarity between sequences.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The sensibility test for molasses was performed by dilution method in agar through which minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by following NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003). Different concentrations of molasses ranging from 10 to 100% (v/v) at intervals of 10% were incorporated into Agar Mueller-Hinton (Himedia). Dilutions were performed in triplicate and were reported as C0 – C10, where C0 = Plates with only agar, and C1 to C10 = Plates ranging from 10 to 100 μ L of molasses /mL of agar, respectively (Table 2).

Bacterial suspensions of *Aeromonas hydrophila* (IOC / FDA 110-36), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), and selected isolates from water of shrimp culture were inoculated onto agar surface. ATCC bacteria were chosen because they are all pathogens of aquatic animals. Bacterial suspensions were prepared with turbidity corresponding to a 0.5 McFarland standard, and diluted so that the 2 μ L inoculum stayed with concentration of 10^4 CFU/mL. Plates remained at room temperature until the drops were absorbed by the agar, when then were inverted and incubated at 35 C for 20 hours. MIC was recorded as the lowest molasses concentration that completely inhibited the growth of bacteria.

Results

Mean total heterotrophic bacteria (THB) counts in water samples ranged from 1.2×10^4 to 3.3×10^4 CFU/mL, and total autotrophic bacteria (TAB) counts were low with $< 10^3$ CFU/mL in all samples. Only four distinct colonies from water samples grew and were isolated from plate count agar (PCA) according to their morphology, and were identified as *Staphylococcus epidermidis*, *Microbacterium* sp., *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Neisseria* sp.

Results of agar dilution test for MIC determination of molasses against bacteria are in Table 2. Except for *P. aeruginosa*, that grew in all molasses concentrations, bacteria growth was divided in two groups. A group that was inhibited only in C10 (99,94 µL/mL) formed by *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *Microbacterium* sp., and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, and a group that was inhibited according to increase in molasses concentration formed by *S. agalactiae* (C2 - 19.99 µL/mL), *S. epidermidis* (C3 - 29.98 µL/mL) and *Neisseria* sp. (C4 - 39.97 µL/mL).

Table 2. Dilution test in Agar for analysis of antimicrobial activity of molasses against reference strains and isolates of *L. vannamei* culture with biofloc and commercial molasses.

Molasses concentrations	Bacteria species							
	Ah	Pa	Vp	Sa	Se	M	Ll	N
C0 (0 µL/mL)	D	D	D	D	D	D	D	D
C1 (9,99 µL/mL)	D	D	D	D	D	D	D	D
C2 (19,99 µL/mL)	D	D	D	ND	D	D	D	D
C3 (29,98 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	D
C4 (39,97 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	ND
C5 (49,97 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	ND
C6 (59,96 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	ND
C7 (69,96 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	ND
C8 (79,95 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	ND
C9 (89,94 µL/mL)	D	D	D	ND	ND	D	D	ND
C10 (99,94 µL/mL)	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Ah= *Aeromonas hydrophila*, Pa= *Pseudomonas aeruginosa*, Vp= *Vibrio parahaemolyticus*, Sa= *Streptococcus agalactiae*, Se= *Staphylococcus epidermidis*, M= *Microbacterium* sp., Ll= *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, N= *Neisseria* sp., D= development, ND= without development.

Discussion

In biofloc cultures the increase of ammonia concentration is prevented using an organic carbon source as related by Samocha *et al.* (2007), which affirmed that molasses can be used to prevent increase of TAN. Several other studies use molasses as carbon source and report benefits to water quality and consequently for the shrimp production (CORREIA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014). However, not all molasses is suitable for use in culture. Bacteria results indicated a low growth of total autotrophic bacteria ($< 10^3$ CFU/mL) in all samples. According to several authors, high carbon concentrations affects nitrifying bacteria (more sensitive and with slow growth) and favors heterotrophic bacteria due its fast growth rate, competing for oxygen and space (ZHU & CHEN, 2001; EBELING *et al.*, 2006; AVNIMELECH, 2009; TIMMONS & EBELING, 2010).

When compared with other studies total heterotrophic bacteria growth was also low (1.2 to 3.3×10^4 CFU/mL). Asaduzzaman *et al.* (2008) found mean THB ranging from 3.4 to 5.8×10^5 CFU/mL according to increase of C/N ratio from 10 to 20, respectively. Anand *et al.* (2013) registered increase of THB load of 90% to 215% in C/N ratio of 20 as compared to C/N ratio of 10 (with $< 1.6 \times 10^5$ CFU/mL). Kumar *et al.* (2014) found 3.1 to 4.5×10^6 CFU/mL in treatments with supplementation of molasses (C/N ratio of 10) in comparison with 1.2 to 1.9×10^6 CFU/mL in treatments without molasses. Ferreira *et al.* (2017), found THB load between 10^7 to 10^8 CFU/mL independent the use or not of commercial probiotic in a C/N ratio of 6. Therefore, heterotrophic bacteria grew in presence of commercial molasses enriched with micro minerals, but not in the amount expected for biofloc cultures.

According to minimum inhibitory concentration (MIC), it appears that high concentration of some molasses components or set of them hampered growth and performance of some bacterial species, where bacteria were inhibited according to increase in molasses concentration. Among the most common inhibitors of micro-organisms are found antibiotics, chemotherapeutic agents, fungicides, colorants, in addition to other components such as salts of organic acids, and salts of heavy metals as mercury, arsenic, copper, calcium and zinc also may act as antimicrobials (AZEVEDO, 2008; SILVA *et al.*, 2013).

Other studies have demonstrated the antimicrobial properties of oxides of magnesium (MgO), zinc (ZnO), and calcium (CaO), particularly against gram-negative and gram-positive

bacteria such as *Escherichia coli* (BRAYNER *et al.*, 2006; SUNDRARAJAN *et al.*, 2012), *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (YAMAMOTO, 2001; SAWAI, 2003; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2012), *Bacillus subtilis* (HUANG *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2009; VIDIC *et al.*, 2013), *Pseudomonas fluorescens* (JIANG *et al.*, 2009) and *P. aeruginosa* (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2012). In most of studies is cited the high antibacterial action of nanoparticulates oxides when compared to macroparticulates. Antimicrobial properties of iron sulfate (PANDE *et al.*, 2015), cobalt sulfate (CHOHAN *et al.*, 1999), copper sulphate (AARESTRUP & HASMAN, 2004), sodium selenite (VASIĆ *et al.*, 2011), and sulfur (DESHPANDE *et al.*, 2008) were also related in other studies against gram positive and gram negative bacteria, being all this compounds presents in commercial molasses used in present study.

However, studies have demonstrating that although many of these compounds are essential micronutrients for several groups of organisms, depending of the concentration, other groups besides bacteria may also be affected as yeast and fungi (DESHPANDE *et al.*, 2008), protozoa and nematodes (SCHNEIDER *et al.*, 2011), and fishes like rainbow trout (MISRA & NIYOGI, 2009). Heinlaan *et al.* (2008) demonstrated that CuO, ZnO, nano ZnO and ZnSO₄ • 7H₂O were toxic for *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. The same authors also stated that particles of metal oxide do not necessarily have to be inside the cell to cause toxicity, only contact with bacterial cell and crustaceans intestinal cell can damage the membranes. The functions of cell membrane, the enzyme activity associated with it and the maintenance and integrity of cell depends on its surface structure. The probable reason for gram-positive bacteria be more susceptible to antimicrobials that gram-negative is due to structure of cell membrane. Cell wall of gram-negative bacteria mainly consists of layers of lipid A, lipopolysaccharide and peptidoglycan, whereas gram-positive have only one layer of peptidoglycan constituting their membrane (ESPITIA *et al.*, 2012; TANG & LV, 2014). These characteristics may possibly explain bacteria behavior in relation to molasses in the present study. The small permeability of cell wall, intrinsic to *P. aeruginosa*, explains its natural resistance to structurally different antimicrobials (HANCOCK 1998).

Therefore, our data indicated that special care should be taken with the commercial molasses used in culture. It should be observed for what purpose the product is indicated and

especially examine carefully its composition. Because what appears to be a small detail can compromise a whole culture.

Conclusion

Commercial molasses enriched with minerals and destined to bovine supplementation is not indicated for use in biofloc cultures to have antibacterial action and consequently, to interfere in bacterial development. This is the first work to demonstrate bacterial activity inhibition in commercial molasses applied in an aquaculture system.

Acknowledgements

The authors would like to thank the CAPES-Brazil for the Ph.D. grant to Maria Gabriela P. Ferreira and Carolina N. Barros, and CNPq-Brazil for providing the Research Fellowship to Dr. Eudes S. Correia (Proc. 305144/2010-3).

References

- Aarestrup, F. M. & H. Hasman. 2004. **Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection.** Veterinary Microbiology 100:83–89.
- Anand, P. S. S., S. Kumar, A. Panigrahi, T. K. Ghoshal, J. S. Dayal, G. Biswas, J. K. Sundaray, D. De, R. A. Raja, A. D. Deo, S. M. Pillai, and P. Ravichandran. **Effects of C:N ratio and substrate integration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles.** Aquaculture International 21:511–524. 2013.
- Asaduzzaman, M., M. A. Wahab, M. C. J. Verdegem, S. Huque, M. A. Salam, and M. E. Azim. **C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds.** Aquaculture 280:117–123. 2008.
- Avnimelech, Y. 1999. **Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems.** Aquaculture 176:227–235.
- Avnimelech, Y. **Biofloc Technology: A practical guide book.** The World Aquaculture Society, 1th ed., Baton Rouge, Louisiana, United States, 182 pp, 2009.

Azevedo, J. L. **Genética de Microrganismos**. 2. ed. Goiânia: UFG, 2008, 536p.

Brayner, R., R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M. F. Benedetti, and F. Fiévet. **Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium**. Nano Letters 6(4):866-870. 2006.

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

Chohan, Z. H., and M. Praveen. **Biological role of anions (sulfate, nitrate, oxalate and acetate) on the antibacterial properties of cobalt (II) and nickel(II) complexes with pyrazinedicarboxamide derived, furanyl and thienyl compounds**. Metal-Based Drugs 6(2):95–99. 1999.

Correia, E. S., J. S. Wilkenfeld, T. C. Morris, L. Wei, D. I. Prangnell, and T. M. Samocha. 2014. **Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system**. Aquacultural Engineering 59:48–54.

Deshpande, A. S., R. B. Khomane, B. K. Vaidya, R. M. Joshi, A. S. Harle, and B. D. Kulkarni. **Sulfur nanoparticles synthesis and characterization from H₂S gas, using novel biodegradable iron chelates in W/O microemulsion**. Nanoscale Research Letters 3:221–229. 2008.

Ebeling, J. M., M. B. Timmons, and J. J. Bisogni. **Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems**. Aquaculture 257:346–358, 2006.

Emerenciano, M., G. Cuzon, A. Paredes, and G. Gaxiola. **Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc**. Aquaculture International 21:1381–1394. 2013.

Espitia, P. J. P., N. F. F. Soares, J. S. R. Coimbra, N. J. Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros. 2012. **Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications**. Food Bioprocess Technology, v.5, p. 1447-1464.

Ferreira, M. G. P., C. N. Barros, E. C. Lima, M. Vasconcelos, E. S. Correia, and E. S. Mendes. **Efeito da suplementação de probiótico sobre a comunidade microbiana no cultivo berçário do *Litopenaeus vannamei***. In: World Aquaculture Society, Natal, RN. CD-Rom. 2011.

Ferreira, L. M. H., G. Lara, W. Wasielesky Jr., and P. C. Abreu. 2016. **Biofilm versus biofloc: Are artificial substrates for biofilm production necessary in the BFT system?** Aquaculture International 24(4):921–930.

Frías-Espericueta, M. G., and F. Páez-Osuna. **Toxicidad de los compuestos de nitrógeno en camarones**. Pages 224-242 in F. Páez-Osuna, editor. Camaronicultura y medio ambiente. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2001.

- Furtado, P. S., B. R. Campos, F. P. Serra, M. Klosterhoff, L. A. Romano, and W. Wasielesky Jr. **Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology (BFT).** Aquaculture International 23:315–327. 2015.
- Gross, A., C. E. Boyd, and C. W. Wood. **Nitrogen budget and transformations in channel catfish ponds.** Aquaculture Engineering 24:113-132, 2000.
- Guan, Y., Q. Tang, X. Fu, S. Yu, S. Wu, and M. Chen. 2014. **Preparation of antioxidants from sugarcane molasses.** Food Chemistry 152:552–557.
- Hancock, R. E. W. 1998. **Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria.** Clinical Infectious Diseases 27(1):S93–S99.
- Heinlaan, M., A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier, and A. Kahru. 2008. **Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*.** Chemosphere 71:1308–1316.
- Huang, L., D.-Q. Li, Y.-J. Lin, M. Wei, D.G. Evans, and X. Duan. **Controllable preparation of nano-MgO and investigation of its bactericidal properties.** Journal of Inorganic Biochemistry 99:986–993. 2005.
- Jiang, L., J. Wang, S. Liang, X. Wang, P. Cen, and Z. Xu. **Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses.** Bioresource Technology 100:3403–3409. 2009.
- Jiang, W., H. Mashayekhi, and B. Xing. 2009. **Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles.** Environmental Pollution 157:1619–1625.
- Krishnamoorthy, K., G. Manivannan, S. J. Kim, K. Jeyasubramanian, and M. Premanathan. **Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy.** Journal of Nanoparticle Research 14(1063):10 pp. 2012.
- Krummenauer, D., T. Samocha, L. Poersch, G. Lara, and W. Wasielesky Jr. **The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System.** Journal of the World Aquaculture Society 45(1): 3-14, 2014.
- KUHN, D.D.; DRAHOS, D.D. MARSH, L.; FLICK Jr., G.J. **Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems.** Aquacultural Engineering, v.43, p.78–82, 2010.
- Kumar, S., P. S. S. Anand, D. De, J. K. Sundaray, R. A. Raja, G. Biswas, A. G. Ponniah, T. K. Ghoshal, A. D. Deo, A. Panigrahi, and M. Muralidhar. **Effects of carbohydrate supplementation on water quality, microbial dynamics and growth performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*).** Aquaculture International 22:901–912. 2014.
- Lemire, J. A., J. J. Harrison, and R. J. Turner. **Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications.** Nature Reviews Microbiology 11:371-384. 2013.

- Lin, Y.-C., and J.-C. Chen. **Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 259:109–119, 2001.
- Liu, J., J. Huang, Y. Jiang, and F. Chen. **Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*.** Bioresource Technology 107:393–398. 2012.
- MAPA, 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana de açúcar.** [http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar]. Reviewed: 17 July 2016.
- Misra, S., & S. Niyogi. **Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress.** Toxicology in Vitro 23:1249–1258. 2009.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2003. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A6, Wayne, Pa, USA
- Oliveira, R. M. 2003. (CD-ROM). **Microbiologia.** Centro Universitário do Sul de Minas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Varginha, MG, Brazil.
- Pande, N. S., D. K. Jaspal, A. Malviya, and V. P. Jayachandran. **Green route synthesis of iron nanoparticles and antibacterial studies.** Proceedings of 20th IRF International Conference, 22nd February 2015, Pune, India, p. 74-78. 2015.
- Samocha, T. M., S. Patnaik, M. Speed, A.-M. Ali, J.M. Burger, R. V. Almeida, Z. Ayub, M. Harisanto, A. Horowitz, and D. L. Brock. 2007. **Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*.** Aquaculture Engineering 36:184-191.
- Sawai, J. 2003. **Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay.** Journal of Microbiological Methods 54:177–182.
- Schneider, T., A. Baldauf, L. A. Ba, V. Jamier, K. Khairan, M.-B. Sarakbi, N. Reum, M. Schneider, A. Röseler, K. Becker, T. Burkholz, P.G. Winyard, M. Kelkel, M. Diederich, and C. Jacob. **Selective Antimicrobial Activity Associated with Sulfur Nanoparticles.** Journal of Biomedical Nanotechnology 7:1–11. 2011.
- Silva, B. C., F. N. Vieira, J. L. P. Mouriño, G. S. Ferreira, and W. Q. Seiffert. **Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition.** Aquaculture 384–387:104–110. 2013.
- Souza, D. M., S. M. Suita, L. A. Romano, W. Wasielesky, and E. L. C. Ballester. **Use of molasses as a carbon source during the nursery rearing of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Biofloc technology system.** Aquaculture Research 45:270–277. 2014.

Sundrarajan, M., J. Suresh, and R. R. Gandhi. **A comparative study on antibacterial properties of MgO nanoparticles prepared under different calcination temperature.** Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 7(3):983-989. 2012.

Tang, Z. X., and B. F. LV. **MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity.** Brazilian Journal of Chemical Engineering 31(03):591 - 601. 2014.

Timmons, M. B., & Ebeling, J. M. **Recirculating Aquaculture.** 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, New York, 948 pp. 2010.

Vasić, S., I. Radojević, N. Pešić, and L. Čomić. **Influence of sodium selenite on the growth of selected bacteria species and their sensitivity to antibiotics.** Kragujevac journal of science 33:55-61. 2011.

Vidic, J., S. Stankic, F. Haque, D. Ciric, R. L. Goffic, A. Vidy, J. Jupille, and B. Delmas. **Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles.** Journal of Nanoparticle Research 15(1595):10 pp. 2013.

Vinatea, L. A. **Qualidade da água em aquicultura: princípios e práticas.** Florianópolis: UFSC, 3^a edition, 238p, 2010.

Wasielesky Jr, W., H. Atwood, A. Stokes, and C. L. Browdy. **Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*.** Aquaculture 258:396–403, 2006.

Yamamoto, O. **Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide.** International Journal of Inorganic Materials 3:643–646. 2001.

Zhu, S. & S. Chen. **Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters.** Aquacultural Engineering 25:1–11. 2001.

4- Considerações finais

- O uso da PCR convencional mostrou ser bastante eficiente para a investigação da presença dos gêneros bacterianos (*Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.) selecionados no presente estudo. Obtendo-se os primers desejados, a PCR pode ser aplicada para qualquer bactéria ou grupo de interesse, o que torna tal ferramenta bastante atraente principalmente para se saber, de forma rápida e eficiente, informações sobre a presença de grupos importantes como patógenos ou probióticos no sistema de cultivo com bioflocos.
- O emprego de altas densidades de estocagem pode refletir em elevação dos níveis de amônia e sólidos suspensos, com consequente diminuição da sobrevivência do animal cultivado. Aliado a isso, as altas densidades e o excesso de sólidos podem também interferir na eficiência dos substratos, que foram pouco vantajosos no presente estudo.
- Outro fato observado no presente estudo é que nem todo melaço é indicado para uso em aquicultura. O melaço na forma mais bruta é preferível que alguns tipos de melaços comerciais com suplementação de minerais, pois grande quantidade desses nutrientes aliado com a possível presença de outros componentes como compostos fenólicos e íons metálicos que geralmente são encontrados no melaço podem gerar ação antimicrobiana e comprometer a atuação das bactérias no cultivo com bioflocos.

5- Referências

- ARNOLD, S.J.; SELLARS, M.J.; CROCOS, P.J.; COMAN, G.J. Intensive production of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon*: An evaluation of stocking density and artificial substrates. **Aquaculture**, v. 261, p. 890-896, 2006.
- ARNOLD, S.J.; COMAN, F.E.; JACKSON, C.J.; GROVES, S.A. High-intensity, zero water-exchange production of juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*: An evaluation of artificial substrates and stocking density. **Aquaculture**, v. 293, p. 42-48, 2009.
- AUDELO-NARANJO, J.M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R.; VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, S. Water quality, production parameters and nutritional condition of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) grown intensively in zero water exchange mesocosms with artificial substrates. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 1371-1377, 2011.
- AVNIMELECH, Y.; MOZES, N.; WEBER, B. Effects of aeration and mixing on nitrogen and organic matter transformations in simulated fish ponds. **Aquacultural Engineering** 11: 157-169, 1992.

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

AVNIMELECH, Y. 2009. Biofloc Technology – A practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 182p.

AZIM, M.E.; VERDEGEM, M.C.J.; KHATOON, H.; WAHAB, M.A.; VAN DAM A.A.; BEVERIDGE, M.C.M. A comparison of fertilization, feeding and three periphyton substrates for increasing fish production in freshwater pond aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture*, v. 212, p. 227 – 243, 2002.

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

BALLESTER, E. L.C.; WASIELESKY Jr, W.; CAVALLI, R. O.; ABREU, P. C. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture* v. 269, p. 355–362, 2007.

BRATVOLD, D. e BROWDY, C.L. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, v. 195, p. 81-94, 2001.

CAIPANG, C.M.A. & AGUANA, M.P.N. **Conventional PCR assays for the detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture in the Philippines.** *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society*, v.4, n.3, 2011.

CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; LORGEUX, B.; PIQUEMAL, D.; PIERRAT, F.; NOGUIER, F.; SAULNIER, D. **Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system.** *BMC Microbiology*, p.1-9, 2016.

CAZETTA, M.L. & CELLIGOI, M.A.P.C. **Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria.** *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina*, v.26, n.2, p.105-112, 2005.

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

EMERENCIANO, M.; BALLESTER, E.L.C.; CAVALLI, R.O.; WASIELESKY, W. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 1–11, 2011.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v. 180, p. 147–165, 1999.

GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. **Metallic Copper as an Antimicrobial Surface.** *Applied and environmental microbiology*, v.77, n.5, p.1541–1547, 2011.

GROSS, A.; ABUTBUL, S. e ZILBERC, D. Acute and Chronic Effects of Nitrite on White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in Low-Salinity Brackish Water. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 35, n. 3, p. 315-321, 2004.

- GUAN, Y.; TANG, Q.; FU, X.; YU, S.; WUA, S.; CHEN, M. **Preparation of antioxidants from sugarcane molasses**. Food Chemistry, v.152, p.552–557, 2014.
- HOPKINS, J.S.; HAMILTON II, R.D.; SANDIFER, P.A.; BROWDY, C.L.; STOKE, A.D. Effect of Water Exchange Rate on Production, Water Quality, Effluent Characteristics and Nitrogen Budgets of Intensive Shrimp Ponds. **J World Aquaculture Society**, v. 24, n. 3, p. 304-320, 1993.
- HUCHETTE, S.M.H.; BEVERIDGE, M.C.M.; BAIRD, D.J.; IRELAND, M. The impacts of grazing by tilapias (*Oreochromis niloticus* L.) on periphyton communities growing on artificial substrate in cages. **Aquaculture**, v. 186, p. 45–60, 2000.
- JEYASEKARAN, G.; RAJ K.T.; SHAKILA, R.J.; THANGARANI, A.J.; SUKUMAR, D. **Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the specific detection of toxin-producing *Vibrio cholera* in fish and fishery products**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.90, p.1111–1118, 2011.
- JIANG, L.; WANG, J.; LIANG, S.; WANG, X.; CEN, P.; XU, Z. **Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses**. Bioresource Technology, v.100, p.3403–3409, 2009.
- KHATOON, H.; YUSOFF, F.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M.; BUJANG, J. S. Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackishwater shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 273, p. 470–477, 2007.
- KIM, H.-J.; RYU, J.-O.; LEE, S.-Y.; KIM, E.-S.; KIM, H.-Y. **Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics**. BMC Microbiology, v.15, n.239, p.1–12, 2015.
- KRUMMENAUER, D.; PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY, W.Jr. Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. **Journal of the world aquaculture society**, v. 42, n. 5, 726-733, 2011.
- KURODA, K.; CHOSEI, T.; NAKAHARA, N.; HATAMOTO, M.; WAKABAYASHI, T.; KAWAI, T.; ARAKI, N.; SYUTSUBO, K.; YAMAGUCHI, T. **High organic loading treatment for industrial molasses wastewater and microbial community shifts corresponding to system development**. Bioresource Technology, v.196, p.225–234, 2015.
- LEMIRE, J.A.; HARRISON, J.J.; TURNER, R.J. **Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications**. Nature reviews, microbiology, v.11, p.371-384, 2013.
- LIU, J., HUANG, J.; JIANG, Y.; CHEN, F. **Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis***. Bioresource Technology, v.107, p.393–398, 2012.
- MAEDA, M. 2002. Microbial communities and their use in aquaculture. p.61-78. In: Lee, C.-S. e O'Bryen, P. editores. Microbial approaches to aquatic nutrition within environmental sound aquaculture pond systems. The world Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EUA. 187p.
- MAICÁ, P.F.; BORBA, M.R.; WASIELESKY, W. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. **Aquaculture Research** 1-10, 2011.
- MISRA, S. & NIYOGI, S. **Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress**. Toxicology in Vitro, v.23, p.1249–1258, 2009.

- Mc NEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. **Global Aquaculture Advocate**, junho, 3 (3), 72–76, 2000.
- MOSS, K.R.K. & MOSS, S.M. Effects of Artificial Substrate and Stocking Density on the Nursery Production of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, n. 4, p. 536-542, 2004.
- NAJAFPOUR, G.D. & SHAN, C.P. **Enzymatic hydrolysis of molasses**. Bioresource Technology, v.86, p. 91–94, 2003.
- NOOTONG, K.; PAVASANT, P.; POWTONGSOOK, S. Effects of Organic Carbon Addition in Controlling Inorganic Nitrogen Concentrations in a Biofloc System. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 3, p. 339-346, 2011.
- OLIVEIRA, R.F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M.V.S.; LIMA, H.O.S. **Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei***. Brazilian Journal of Food Technology, VII BMCFB, junho, 2009.
- OTOSHI, C. A.; MONTGOMERY, A.D.; MATSUDA, E.M.; MOSS, S.M. Effects of Artificial Substrate and Water Source on Growth of Juvenile Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 2, p. 210-213, 2006.
- PONCE-PALAFOX, J., MARTINEZ-PALACIOS, C.A., ROSS, L.G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture** 157:107-115, 1997.
- QUAN, Z.-X.; JIN, Y.-S.; YIN, C.-R.; LEE, J.J.; LEE, S.-T. **Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal**. Bioresource Technology, v.96, p.1690–1695, 2005.
- RAY, A.J.; SEABORN, G.; LEFFLER, J.W.; WILDE, S.B.; LAWSON, A.; BROWDY, C.L. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. **Aquaculture**, v. 310, p. 130– 138, 2010a.
- RAY, A.J.; LEWIS, B.L.; BROWDY, C.L.; LEFFLER, J.W. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture** v. 299, p. 89–98, 2010b.
- RICHARD, M.; TROTTIER, C.; VERDEGEM, M.C.J.; HUSSENOT, J.M.E. Submersion time, depth, substrate type and sampling method as variation sources of marine periphyton. **Aquaculture**, v. 295, p. 209–217, 2009.
- ROBERT-PILLOT, A.; COPIN, S.; GAY, M.; MALLE, P.; QUILICI, M.L. **Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR**. International Journal of Food Microbiology, v.143, p.190–197, 2010.
- SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A.-M.; BURGER, J.M.; ALMEIDA, R.V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D.L. **Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei***. Aquacultural Engineering, v.36, p.184–191, 2007.
- SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E.H.; VERRETH, J.A.J. **Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste**. Aquaculture, v.261, p.1239–1248, 2006.

SCHRYVER, P.D.; CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, v. 277, p. 125–137, 2008.

SCHVEITZER, R.; ARANTES, R.; BALOI, M.F.; COSTÓDIO, P.F.S.; VINATEA, L.A.; SEIFFERT, W.Q.; ANDREATTA, E. R. **Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates.** Aquacultural Engineering, v.54, p.93–103, 2013.

SIERRA, M.; SANHUEZA, A.; ALCÁNTARA, R.; SÁNCHEZ, G. **Antimicrobial evaluation of copper sulfate (II) on strains of *Enterococcus faecalis*. In vitro study.** Journal of Oral Research, v.2, n.3, p.114-118, 2013.

SOUZA, D.M. de; SUITA, S.M.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY, W.Jr.; BALLESTER, E.L.C. **Use of molasses as a carbon source during the nursery rearing of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Biofloc technology system.** Aquaculture Research, v.45, p.270–277, 2014.

TAKARA, K.; USHIJIMA, K.; WADA, K.; IWASAKI, H.; YAMASHITA, M. **Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria.** Journal of oleo science, v.56, n.11, p.611-614, 2007.

TANG, Y.; TAO, P.; TAN, J.; MU, H.; PENG, L.; YANG, D.; TONG, S.; CHEN, L. **Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns.** International Journal of Molecular Sciences, v.15, p.13663-13680, 2014.

THOMPSON, F.L.; ABREU, P.C.; WASIELESKY, W. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. **Aquaculture**, v. 203, p. 263–278, 2002.

VAN DER MEEREN, T.; BRUNVOLD, L.; SANDAA, R.-A.; BERGH, Ø.; CASTBERG, T.; THYRHAUG, R.; MANGOR-JENSEN, A. **Water quality and microbial community structure in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) cultures.** Aquaculture, v.316, p.111–120, 2011.

WANG, B.-S.; CHANG, L.-W.; KANG, Z.-C.; CHU, H.-L.; TAI, H.-M.; HUANG, M.-H. **Inhibitory effects of molasses on mutation and nitric oxide production.** Food Chemistry, v.126, p.1102–1107, 2011.

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

ZHANG, Z.; XIAO, L.; LOU, Y.; JIN, M.; LIAO, C.; MALAKAR, P.K.; PAN, Y.; ZHAO, Y. **Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp.** Food Control, v.51, p.31-36, 2015.

ZHAO, P.; HUANG, J.; WANG, X.-H.; SONG, X.-L.; YANG, C.-H.; ZHANG, X.-G.; WANG, G.-C. **The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*.** Aquaculture, v.354–355, p.97–106, 2012.

ANEXO

Normas de formatação do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura

Todo o texto deve ser digitado em Letra Times New Roman 12, tabulação 1, espaçamento 1,5. A capa será branca (papel cartolina de 120g).

As referências devem seguir este modelo:

Quando entre parênteses:

Um autor: sobrenome em caixa alta, vírgula e ano de publicação. Exemplo: O Brasil é o melhor país do mundo (MENDES, 2005);

Dois autores: sobrenomes em caixa alta separados por “e”, vírgula e ano de publicação. Exemplo: O Brasil é o melhor país do mundo (MENDES e SALES, 2005).

Mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor em caixa alta, a expressão et al., vírgula e ano de publicação. Exemplo: O Brasil é o melhor país do mundo (SALES et al., 2005);

Mesmo autor e ano: sobrenome em caixa alta, vírgula, ano, a, vírgula, b, vírgula, ano de publicação. Exemplo: O Brasil é o melhor país do mundo (CORREIA, 2005 a, b).

Mesmo autor em anos diferentes: sobrenome em caixa alta, vírgula, ano, vírgula, ano de publicação. Exemplo: O Brasil é o melhor país do mundo (MENDES, 2005, 2007);

Citação de citação: sobrenome do autor, vírgula, ano de publicação desse autor, seguido pela expressão apud e da citação que o referenciou. Exemplo: O Brasil é o melhor país do mundo (CORREIA, 2005 apud SALES, 2007); Este tipo de citação não é bem visto em decorrência de haver possibilidades de o mestrando divulgar informações errôneas. Recomenda-se buscar o trabalho original.

Fora dos parênteses

Utilizar as recomendações acima referenciadas, no entanto o(s) nome(s) do(s) autor(es) devem ser em caixa baixa, excetuando-se a primeira letra e o ano sempre entre parênteses. Exemplos: Segundo Mendes (2005) o Brasil é o melhor país do mundo; Sales et al. (2005) concluíram que o Brasil é o melhor país do mundo.

A referência bibliográfica deverá ser ordenada em função dos nomes de referência, observando ainda:

- 1- Todas as citações realizadas no texto devem constar na referência como citadas;
- 2- Todas as referências devem ter sido citadas no texto;
- 3- Tem que constar todos os nomes dos autores;
- 4- Entre autores utilizar a pontuação ponto e vírgula para separá-los.
- 5- Todas as referências devem conter as datas de publicação;
- 6- Sempre que existir o título da obra ou da revista utilizar negrito;

Exemplos:**1- Anais de Eventos**

SILVA, A.D.R.; SOARES, M.C.F.; CARMO, J.L. Determinação da letalidade em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, sob diferentes temperaturas, utilizando alevinos de tilápia-do-nilo, linhagem chitralada, *Oreochromis niloticus* (teleostei: cichlidae). In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 13., 2003. Porto Seguro. **Anais**. Porto Seguro/BA. FAEP-BR, 2003. p. 726-734. CD-ROM.

2- Periódicos

WYBAN, J.A.; LEE, C.S.; SATO, V.T.; SWEENEY, J.N.; RICHARDS JUNIOR, W.K. Effect of stocking density on shrimp growth rates in manure-fertilized ponds. **Aquaculture**, v.61, p.23-32, 1987.

3- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F.. O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

4- Livros

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 850p.

5- Monografias, dissertações e Teses

MATHEUS, C.E. Aspectos do crescimento e reprodução de *Sarotherodon niloticus* (Tilápia do Nilo) em lagoas de estabilização e sua influência no tratamento biológico. 1984. 148p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

6- Fontes eletrônicas

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FishStat plus**: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>>. Acesso em: 6 maio 2006.