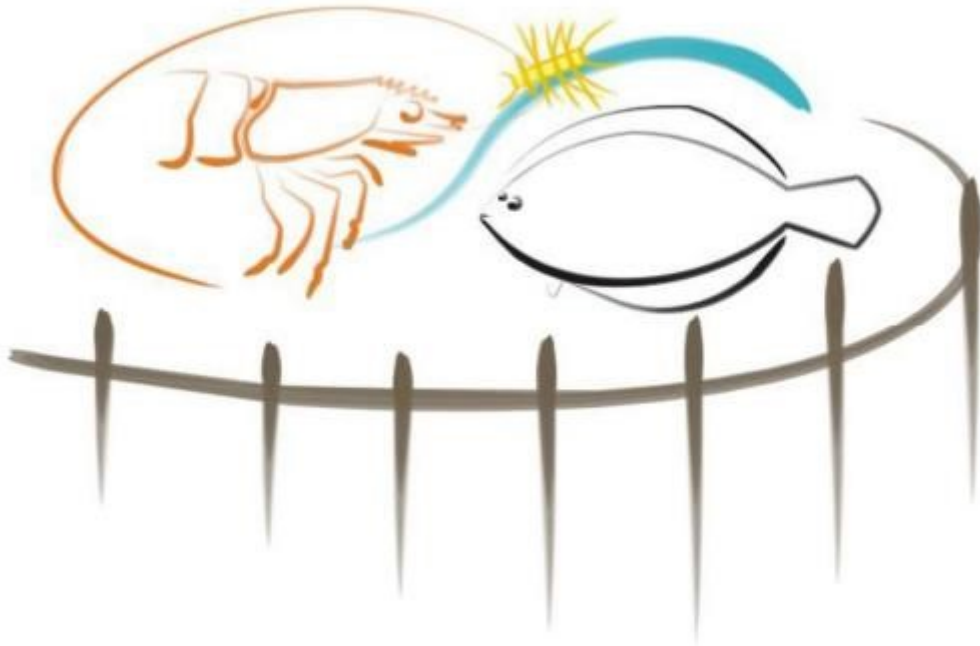


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS NOS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM JUVENIS DE *Piaractus*
mesopotamicus CRIADOS EM SISTEMA BFT**

ANDRESSA LARRÉ BITENCOURT

RIO GRANDE, RS

2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS NOS
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM JUVENIS DE *Piaractus*
mesopotamicus CRIADOS EM SISTEMA BFT**

ANDRESSA LARRÉ BITENCOURT

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUCIANO DE OLIVEIRA GARCIA
COORIENTADOR: PROF. DR. WILSON WASIELESKY Jr.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

**RIO GRANDE, RS
FEVEREIRO DE 2024**

ÍNDICE

Resumo Geral	9
Abstract General	10
1.Introdução Geral	11
2.Objetivos	18
2.1.Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3.Referências Bibliográficas.....	19
Capítulo I.....	24
4. Conclusão.....	64
5.Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem microscópica de partículas de bioflocos com aumento de 20x	12
Figura 2. Juvenil de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	13
Figura 3. Superóxido dismutase no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	34
Figura 4. Catalase no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	35
Figura 5. GST no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	36
Figura 6. GSH no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	37
Figura 7. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	38
Figura 8. PSH no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	39
Figura 9. Lipoperoxidação no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	40
Figura 10. Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos no tratamento controle (RAS).....	41
Figura 11. Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 250 mg/L SST.....	41
Figura 12. Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 500 mg/L SST.....	42
Figura 13. Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 750 mg/L SST.....	42
Figura 14. Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 1000 mg/L SST.....	43
Figura 15. Contagem de ionócitos nas brânquias de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	43
Figura 16. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de cocoides livres no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	44
Figura 17. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de cocoides aderidas no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	45
Figura 18. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de filamentosas aderidas no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	46

Figura 19. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de filamentosas livres no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	47
Figura 20. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de bacilos no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	48
Figura 21. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de <i>Vibrio sp.</i> no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	49
Figura 22. Abundância de bactérias no floco microbiano (A) cocoides livres e (B) cocoides aderidas com aumento de 1000x.....	50
Figura 23. Abundância de bactérias no floco microbiano (A) filamentosas livres e (B) filamentosas aderidas com aumento de 1000x.....	50
Figura 24. Abundância de bactérias no floco microbiano (A) bacilos e (B) vibrios com aumento de 1000x.....	51
Figura 25. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de flagelados no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	51
Figura 26. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de ciliados no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	52
Figura 27. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de rotíferos no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	53
Figura 28. Valores médios ($\pm$ erro padrão) de microalgas no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST.....	54
Figura 29. Fotografias de (A) flagelados e rotífero e (B) ciliados presentes no cultivo de pacu em BFT com aumento de 20x	55
Figura 30. Fotografias de (A) microalgas e (B) nematóides presentes no cultivo de pacu em BFT com aumento de 20x	55
Figura 31. Fotografias de dáfrias presentes no cultivo de pacu em BFT com aumento de 20x	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água (média $\pm$ erro padrão) durante 15 dias de cultivo de <i>P. mesopotamicus</i> , em diferentes concentrações de SST no sistema BFT.....	33
Tabela 2. Valores médios ($\pm$ erro padrão) das estruturas branquiais nos diferentes tratamentos durante o cultivo do <i>P. mesopotamicus</i> em sistema BFT.....	44

DEDICATÓRIA

“Um sonho é apenas um desejo, até o momento em que você começa a atuar sobre ele, e propõe-se a transformá-lo em uma meta”.

-Mary Kay Ash

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus por me permitir saúde, determinação e por me ajudar a alcançar meus objetivos.

Aos meus pais e familiares, por sempre me apoiarem, independente das minhas decisões, sempre me incentivando ao longo dos anos. Saiba que amo vocês!!

Aos meus amigos que ganhei ao longo dessa jornada e com quem vivi nos últimos anos, principalmente a Anne, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me escutando nos meus “piores dias”, amo você imensamente e com certeza é uma amizade que vou levar para o resto da vida. Aos amigos do LAC, agradeço pela companhia e aos servidores do laboratório que sempre me ajudaram quando necessário.

Ao meu orientador, por ter aceitado me orientar, por esses anos de ensinamentos e amizade, por todas diversões no laboratório, além do trabalho, agradeço muito por tudo. Ao meu coorientador, por ter aceitado participar do projeto, por sempre me ajudar no que eu precisava, muito obrigada!!

A FURG pela oportunidade de realizar a pós e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pela ajuda financeira.

RESUMO GERAL

O sistema de bioflocos possui variadas vantagens, como reutilização de água, ciclagem de nutrientes, permite que tenha altas densidades de estocagem no cultivo, além de manter a qualidade da água e possibilitar a diminuição da quantidade de ração ofertada durante o cultivo. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie que além de suas características favoráveis para produção, pode apresentar alta adaptabilidade em diferentes meios de cultivo, favorecendo a possibilidade de criação em sistema de bioflocos (BFT). Contudo, a falta de cuidados necessários no sistema BFT, pode levar ao aumento dos sólidos suspensos totais (SST), podendo ocasionar problemas fisiológicos nos animais. Até o momento não há na bibliografia estudos mostrando qual a melhor concentração de SST para a criação do pacu em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, e que possam comprometer o seu desenvolvimento. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sólidos suspensos totais sobre os parâmetros de defesa antioxidante e estresse oxidativo em juvenis de pacu criados em sistema BFT. Para o trabalho, foram testadas cinco concentrações de SST (mg/L) (T1: controle água clara; T2: 250; T3: 500, T4: 750 e T5:1000), durante um período de 15 dias, cada tratamento com 3 repetições (caixas de 310 L - 15 animais por repetição). No decorrer deste período, foram realizadas duas coletas de tecidos (brânquias, fígado e cérebro), sendo uma inicial e outra final, onde foram avaliados parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo (Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione reduzida (GSH), Capacidade antioxidante total contra radicais peróxido (ACAP), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT)), dano lipídico (LPO) e dano proteico (PSH). Além disso, foram realizadas análises histológicas das brânquias e contagem da comunidade microbiana dos bioflocos. De acordo com as análises, nossos resultados demonstram que em 750 e 1000 mg SST/L ocorreu maior atividade das enzimas SOD, CAT e GST, e concentrações de GSH. Com relação a ACAP e P-SH, não houveram diferenças significativas. Entretanto, os níveis de LPO, foram maiores até a concentração de 750 mg SST/L nas brânquias ($p < 0,05$). As análises histológicas apresentaram maior contagem de ionócitos e menor espessura entre as lamelas ($p < 0,05$) no tratamento controle e em 1000 mg SST/L. Observando a abundância de microrganismos, podemos constatar que as bactérias e ciliados apresentaram um aumento de acordo com aumento da concentração de SST ($p < 0,05$). Rotíferos, nematóides e microalgas, estiveram presentes no meio, porém não foi encontrada presença de rotíferos em 500 mg SST/L, para nematóides em 1000 mg

SST/L e microalgas só foi verificada presença no início e fim do experimento em 1000 mg SST/L, nos demais tratamentos apenas no final ($p < 0,05$). Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos, concluímos que a criação de pacu no sistema de bioflocos pode ser realizada até a concentração de 500 mg SST/L, já que acima de 750 mg SST/L começa ocorrer danos nas brânquias e alterações no sistema antioxidante dos animais.

Palavras chave: Bioflocos, estresse oxidativo, qualidade da água, piscicultura

GENERAL ABSTRACT

The biofloc system has several advantages, such as water reuse, nutrient cycling, allows for high storage densities in cultivation, in addition to maintaining water quality and enabling a reduction in the amount of feed offered during cultivation. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a species that, in addition to its favorable characteristics for production, can present high adaptability in different cultivation media, favoring the possibility of creation in a biofloc system (BFT). However, the lack of necessary care in the BFT system can lead to an increase in total suspended solids (TSS), which can cause physiological problems for the animals. So far, there are no studies in the literature showing the best TSS concentration for pacu breeding in relation to biomarkers of oxidative stress, which could compromise its development. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of different concentrations of total suspended solids on oxidative stress parameters in juvenile pacu raised in a BFT system. For the study, five concentrations of TSS (mg/L) (T1: clear water control; T2: 250; T3: 500, T4: 750 and T5: 1000) were tested over a period of 15 days (each treatment with 3 replications (310 L boxes - 15 animals per repetition). During this period, two tissue collections were carried out (gills, liver and brain), one initial and one final, where biochemical parameters of oxidative stress were evaluated (Glutathione S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), total antioxidant capacity against peroxyl radicals (ACAP), superoxide dismutase (SOD) e catalase (CAT)), lipid damage (LPO) and protein damage (PSH). Furthermore, histological analyzes of the gills and the microbial communities of the bioflocs were counted. According to the analyses, our results demonstrate that at 750 and 1000 mgTSS/L there was greater activity of the enzymes SOD, CAT and GST, and concentrations of GSH. In relation to ACAP and P-SH, there were no significant differences. However LPO levels were higher up to a concentration of 750 mgTSS/L in the gills ($p < 0.05$). Histological analyses showed a higher ionocyte count and lower thickness were observed between the lamellae ($p < 0.05$) in the control treatment and at 1000 mgTSS/L. Observing the abundance of microorganisms, we can observe that bacteria and ciliates showed an increase in accordance with the increase in TSS concentration ($p < 0.05$). Rotifers, nematodes and microalgae were present in the system, but no presence of rotifers was found at 500 mgTSS/L, for nematodes at 1000 mgTSS/L and microalgae were only found at the beginning and the end of the experiment at 1000 mgTSS/L, in the other treatments only at the end ($p < 0.05$). Therefore, according to the

results obtained, we conclude that the creation of pacu in the biofloc system can be carried out up to a concentration of 500 mgTSS/L, since up 750 mgSST/L, damage to the gills and changes in the animals' antioxidant system begin to occur.

Keywords: Biofloc, oxidative stress, water quality, fish farming

1. INTRODUÇÃO GERAL

O sistema de bioflocos (sistema BFT) é um sistema que tem como característica a produção de biomassa microbiana a partir da inserção de uma fonte de carbono orgânico no cultivo (Dauda, 2020) e da manipulação de concentrações de carbono/nitrogênio (C:N) (Avnimelech, 2015), onde se estabelece o funcionamento de grupos de microrganismos por meio de reciclagem e reaproveitamento de nutrientes (Luo et al., 2017). Geralmente as relações C:N variam entre 10:1 e 25:1, com uso contínuo de um sistema eficaz de aeração e com objetivo de desenvolver microrganismos, os quais irão realizar a transformação dos compostos nitrogenados (Sondoal Vargas et al., 2020), que posteriormente são utilizados para a formação de proteína microbiana (Avnimelech, 2015) servindo como fonte de alimentação (Wang et al., 2015) para os organismos cultivados.

Então, a base de desenvolvimento desse sistema é a estimulação do crescimento das bactérias heterotróficas através da relação C:N, pela adição de fontes de carbono orgânico (Avnimelech, 1999). A principal vantagem do desenvolvimento das bactérias heterotróficas é a absorção acelerada da amônia, a qual subsequentemente é transformada em biomassa bacteriana, a qual é um dos constituintes dos sólidos suspensos totais (SST) (Gaona et al., 2017). Neste sistema há uma relação entre fatores biológicos, químicos e físicos, que agem sobre a qualidade da água, sendo eficiente tanto para a produtividade quanto uso de recursos hídricos, pois o sistema tem a capacidade de reutilizar os nutrientes (Kathia et al., 2017). A partir disso, propicia uma renovação mínima de água, contribuindo para uma redução na quantidade de efluentes produzidos, e assim minimizando o impacto no ambiente (Kathia et al., 2017).

Os bioflocos são formados por diferentes microrganismos, como os fungos, diversas bactérias, microalgas, micro invertebrados, rotíferos e matéria orgânica (Luo et al., 2017), sendo de tamanhos variados, possuindo elevada porosidade e permeabilidade aos fluídos (Crab et al., 2012; Souza et al., 2019). Esses microrganismos têm como uma das funções manter a qualidade de água, absorvendo compostos nitrogenados e matéria orgânica proveniente da nutrição, diminuindo a conversão alimentar, o que consequentemente irá resultar na redução dos gastos com alimentação (Emerenciano et al., 2017).

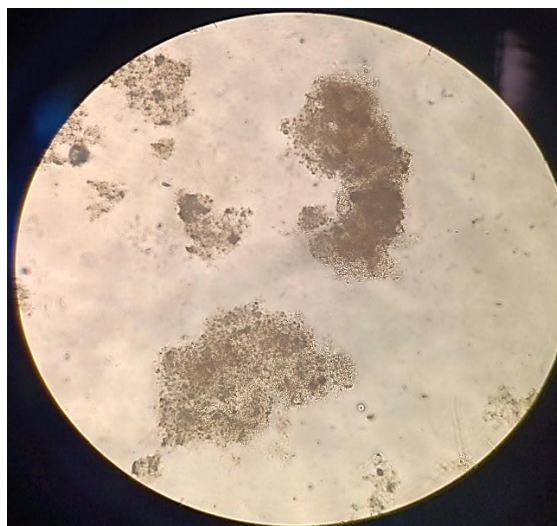


FIGURA 1: Imagem microscópica de partículas de bioflocos com aumento de 20X
(Fonte: Arquivo pessoal)

Devido às interações microbianas que ocorrem no sistema, o estado imunológico do animal pode ser estimulado, se fortalecendo (Kim et al., 2014), e assim prevenindo a manifestação de doenças, minimizando os custos com antibióticos/probióticos (Ajadi et al., 2016). Aliando-se isso, com o aumento de produtividade, renovação mínima de água e incremento nutricional, se tem umas das principais vantagens do uso do sistema BFT (Sondoval Vargas et al., 2020).

Mesmo com todos esses benefícios, a maior produção com o sistema BFT ocorre nas criações de camarões e tilápia (Zhang et al., 2016), sendo a tilápia a primeira espécie de peixe que foi criada em sistema BFT (Martins et al., 2017). Desta forma, há poucos trabalhos desenvolvidos com diferentes espécies nativas brasileiras (Sondoval Vargas et al., 2020), as quais podem de acordo com suas características, apresentarem um bom desenvolvimento nesse sistema, sendo o pacu uma dessas espécies em evidência.

No Brasil, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma das espécies nativas mais produzidas na piscicultura dulcícola, tendo uma produção de 7.318 mil toneladas, junto com a patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*) (IBGE, 2023). Isso é devido ao seu rápido crescimento, rusticidade, carne de boa qualidade, boa aceitação no mercado consumidor (nacional e internacional) e hábito alimentar onívoro, exigindo menores quantidades de proteína na alimentação (Urbinati & Gonçalves, 2013; Nitz et al., 2019).



FIGURA 2: Juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Fonte: Arquivo pessoal)

O pacu apresenta ótimos resultados em sistemas de cultivo intensivo devido a sua tolerância em relação aos parâmetros de qualidade da água, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Nitz et al., 2020), diferentes faixas de pH (Pellegrin et al., 2020), SST (Pellegrin et al., 2022) temperatura (Nitz et al., 2020) e altas concentrações de amônia (Nitz et al., 2019). Devido a essas características, a criação de pacus no sistema de bioflocos pode ser viável, tanto pela otimização do reuso de água, como pela quantidade utilizada de rações, principalmente em virtude do hábito alimentar onívoro, capaz de se alimentar-se dos bioflocos, e assim promover uma complementação de sua nutrição (Dauda, 2020; Pellegrin et al., 2022).

Em um estudo realizado recentemente, verificou-se que o pacu possui resistência a concentrações de até 5000 mg SST/L (Pellegrin et al., 2022). Já em estudo realizado com pirapitinga (*Piaractus brachipomus*), essa espécie demonstrou que tolera uma faixa entre 200 a 600 mg SST/L, mas apresenta melhores resultados sobre o desempenho zootécnico em uma faixa de 200 a 300 mg SST/L (Angeles-Escobar et al., 2021).

Contudo, o acúmulo de ração não consumida e fezes excretadas acarretam no aumento dos sólidos suspensos totais (SST), colaborando para a formação de maiores densidades de bioflocos, os quais também podem aumentar pelo resultado metabólico das bactérias heterotróficas presentes no sistema (Holanda et al., 2020). O excesso de SST causa algumas adversidades, como complicações na estabilização das comunidades microbianas (Gaona et al., 2017), e o aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido (Beveridge, 1991). Isto pode acabar

prejudicando a ação respiratória dos animais através de obstruções nas brânquias (Romano et al., 2020), causando danos aos processos fisiológicos e bioquímicos dos organismos (Redding et al., 1987).

Este aumento de SST, pode ainda causar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, e caso se deposite no fundo pode criar zonas anaeróbicas (Hattem et al., 2013). Também podem ocorrer, devido a isso, irritações na pele, desgaste das nadadeiras e modificação das funções branquiais, como alteração na excreção dos nitrogenados e troca iônica (Schumann & Brinker, 2020).

O volume dos sólidos irá depender de alguns fatores, como a quantidade de ração que é ofertada (Crab et al., 2012), a relação C:N e componentes de carbono orgânico e inorgânico (Ueno-Fukura et al., 2019), elevação da comunidade microbiana, a excreção dos organismos (Holanda et al., 2020) e a renovação quase nula de água também resulta em altas concentrações de SST (Van Wyk, 2006).

Parâmetros da qualidade da água também podem influenciar na concentração de SST, como o oxigênio dissolvido, que afeta os microrganismos presentes no sistema, e assim, influência na formação dos bioflocos (De Schryver et al., 2008), já que com uma boa aeração os microrganismos conseguem manter sua atividade (Ray et al., 2010). Problemas com aeração (OD baixo), no sistema BFT, pode causar a sedimentação dos bioflocos, gerando uma zona anaeróbica e conseqüentemente prejudicando a atividade microbiana (Soaudy et al., 2023). De acordo com isso, este parâmetro é essencial para o bom desenvolvimento e manutenção do sistema. Outro fator é a temperatura, que pode influenciar nos bioflocos em relação a sua estrutura e morfologia, onde altas temperaturas proporcionam aumento das concentrações de SST (De Schryver et al., 2008). Com isso, indica-se uma temperatura entre 20-25°C para atingir bioflocos mais estáveis (De Schryver et al., 2008), pois temperaturas baixas podem provocar a defloculação, em virtude da redução da atividade microbiana (Willen et al., 2000).

Com isso, situações de estresse aos animais podem ocasionar alterações bioquímicas. Alterações nas condições ambientais são capazes de influenciar as defesas antioxidantes dos peixes e assim, induzir um estado de estresse oxidativo (Stoliar & Lushchak, 2012). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes do organismo leva a uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), caracterizando assim o estresse oxidativo.

As ERO são classificadas em radicais livres, tendo como exemplo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$); radical hidroxila ($HO^{\cdot}$); radical peroxil ($ROO^{\cdot}$); radical

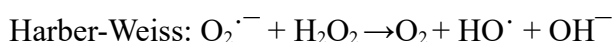
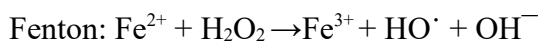
hidroxiperoxil ($\text{HO}_2^\cdot$); radical alcóxila ($\text{RO}^\cdot$) e não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$); ozônio (O_3) e o ácido hipocloroso (HOCL) (Srikanth et al., 2013).

Os radicais livres são átomos que possuem um elétron desemparelhado (e^-), e por isso se tornam reativos e instáveis (Ferreira & Matsubara, 1997; Hohn et al., 2013). Cada radical possui um grau de reatividade e meia-vida em particular, e podem causar danos as biomoléculas (Hamanaka & Chandel, 2010).

O primeiro radical a ser formado é o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o qual é formado quando um elétron se junta ao oxigênio molecular (Miller et al., 1990), seguido da formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\text{HO}^\cdot$), sendo o $\text{HO}^\cdot$ o mais prejudicial (Halliwell & Gutteridge, 2015).

O ânion superóxido pode ser produzido de três maneiras: pelo processo natural da cadeia transportadora de elétrons, pela NAD(P)H oxidase ou pela xantina oxidase, (Birben et al., 2012). O ânion superóxido não possui muita reatividade, porém causa diversas alterações, como: liberação de ferro, abstração de átomos de hidrogênio de moléculas como as catecolaminas, DNA ou ácidos graxos (Buetler et al., 2004).

Mesmo não sendo um radical livre, o peróxido de hidrogênio tem a capacidade de ultrapassar as membranas biológicas com mais facilidade, e se ocorrer a presença de íons metálicos, como no momento em que a hemoglobina libera ferro da sua composição (Gutteridge, 1986), pode atuar como precursor da $\text{HO}^\cdot$ (Birnie-Gauvin et al., 2017), como por exemplo na reação de Fenton e Harber-Weiss:



O radical hidroxila é a espécie reativa de oxigênio que possui maior reatividade quando comparada as outras, tendo alta afinidade com outros metais. Caso algum DNA esteja ligado a um metal, o $\text{HO}^\cdot$ pode fazer com que ocorra mudanças nas bases púricas e pirimídicas, danificando o DNA (Ferreira & Matsubara, 1997). Além disso, pode causar oxidação nas pontes dissulfeto e grupos sulfidril de proteínas e começar a reação em cadeia da lipoperoxidação, atacando ácidos graxos poliinsaturados (Ferreira & Matsubara, 1997).

Os animais dispõem de sistemas de defesas antioxidantes, atuando na eliminação das ERO que são produzidas, reduzindo os danos sofridos e protegendo contra o estresse oxidativo (Li et al., 2019). Algumas das ERO são consideradas moléculas

instáveis, podendo ser formados interiormente na cadeia transportadora de elétrons (Birnie-Gauvin et al., 2017) a partir do metabolismo mitocondrial e possuem capacidade de causar oxidação, danos nas proteínas e DNA (Rotílio et al., 1995). O sistema antioxidante tem três principais funções: impedir a geração de ERO; neutralizar as espécies reativas de oxigênio, que podem vir a ser formadas e, restaurar os possíveis danos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Caso os antioxidantes não consigam eliminar as ERO, irá ocorrer o estresse oxidativo e possíveis danos nos animais. O estresse oxidativo, além de causar danos no DNA, proteínas e lipídios, também provoca apoptose, ou seja, morte nas células (Martínez-Alvarez et al., 2005) e pode gerar degeneração dos neurônios (Srinivasan, 2002). Após ocorrer o estresse oxidativo, algumas consequências podem ocorrer e de acordo com Halliwell e Gutteridge (2007) são essas: (1) PROLIFERAÇÃO: determinadas células têm como resposta ao estresse o aumento da sua atividade de multiplicação; (2) ADAPTAÇÃO: as células se adaptam pela ação de alguns antioxidantes, tornando as células mais protegidas e resistentes; (3) DANO CELULAR: quando ocorre alguma degradação as biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios) (4) SENESCÊNCIA: nessa parte a célula já está danificada, ainda podendo ocorrer a sua sobrevivência, porém não poderá mais realizar o processo de divisão celular; e (5) MORTE CELULAR: posteriormente aos danos recebidos, as células sofrerão de necrose ou apoptose.

As defesas antioxidantes podem ser divididas em dois grupos, sendo eles enzimáticos e não enzimáticos. O grupo de defesas não enzimáticos são formados pelas seguintes moléculas: GSH, α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e carotenóides (α -caroteno, β -caroteno) (Johnson et al., 2003). Já as defesas enzimáticas são: glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (Hermes-Lima et al., 2015).

Cada uma destas enzimas atua em um determinado alvo, quando temos o estado de estresse oxidativo instalado no organismo. A SOD atua na degradação do ânion superóxido, que após esse processo vira oxigênio e peróxido de hidrogênio (Kabel, 2014), segundo a reação abaixo:



A CAT é uma hemoproteína e encontra-se nos seres procariontes e eucariontes, mais propriamente dito nos peroxissomos (Ho et al., 2004; Scandalios, 1990). Essa enzima atua na catalização do H_2O_2 em O_2 e H_2O , de acordo com a reação a seguir:



A Glutathione S-Transferase (GST) é uma enzima que faz parte de um grupo de proteínas diméricas que atuam na detoxificação da fase II, onde protege as células de efeitos nocivos e tóxicos, os quais resultam de danos oxidativos de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Schlenk et al., 2008; Armstrong, 1997). GSH é um tiol que possui baixa massa molecular, tendo significativa contribuição na proteção contra ERO, podendo servir como substrato para demais enzimas detoxificadoras (Srikanth et al., 2013), e é formada pela ligação de três aminoácidos (cisteína, glutamato e glicina), estabelecendo um grupo tiol (SH) (Wang et al., 2018). É encontrada em organismos na sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (Wang et al., 2018).

Ainda, podem ocorrer danos lipídicos pelo estresse oxidativo, onde a lipoperoxidação se dá pelo ataque de radicais livres a ácidos graxos poliinsaturados, gerando quantidades de malondialdeído (MDA), que é um subproduto resultante da degradação dos lipídios, sendo possível detectar sua presença através de análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Oakes & Van Deer Kraak, 2003). A degradação dos lipídios é dita como uma das mais responsáveis em relação a perda da mobilidade das células no estresse oxidativo, assim sendo usada como biomarcador (Cattaneo et al., 2011). Além de danos lipídicos, danos proteicos podem acontecer, e verificamos a existência desses danos através dos tióis proteicos (P-SH). Os tióis são classificados como biomarcadores na oxidação das proteínas (Erel & Neselioglu, 2014) e exercem funções nas estruturas proteicas (Dickinson & Forman, 2002).

E, no geral, podemos mensurar como as defesas antioxidantes agem diante de condições pró-oxidantes, através da análise da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), já que essa análise interpreta as moléculas que tem a capacidade de agir como um antioxidante, seja enzimático ou não enzimático (Amado et al., 2009).

Devido a isto, observações dos parâmetros de estresse oxidativo são importantes, pois foram classificados como marcadores biológicos para a degradação do ambiente (Monserrat et al., 2007) e possuem relação com contato com amônia (Hegazi et al., 2010), produção com elevada densidade de estocagem (Andrade et al., 2015), variações de temperatura (Castro et al., 2012) e patógenos (Ali et al., 2011). Os danos sofridos pelo estresse oxidativo, além de causar desordem fisiológica e bioquímica, pode causar danos nos tecidos, prejudicando as funções dos órgãos dos animais (Sun et al., 2014). Portanto, deve haver estudos para as diferentes espécies, pois sua ação é

espécie-específica, e com isso, descobrir uma concentração de SST que não afete o desenvolvimento do animal.

De acordo com o exposto acima, o presente trabalho teve como proposta verificar qual a melhor concentração de SST no cultivo de pacu, a qual não afete os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e lipoperoxidação, e com isso melhorar as condições de bem estar destes animais no processo de criação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de sólidos suspensos totais (SST) sobre parâmetros de estresse oxidativo de juvenis de pacu criados em sistema BFT.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar os possíveis efeitos de diferentes concentrações de SST nos parâmetros de estresse oxidativo no cérebro, fígado e brânquias de juvenis de pacu criados em sistema BFT;
- Analisar histologicamente as brânquias de juvenis de pacu criados em diferentes concentrações de SST em sistema BFT;
- Verificar a comunidade microbiana nas diferentes concentrações de SST no sistema BFT.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajadi, A., Sabri, M. Y., Dauda, A. B., Ina-Salwany, M. Y., Hasliza, A. H., & Malaysia, P. (2016). Immunoprophylaxis: A Better Alternative Protective Measure against Shrimp Vibriosis-A Review. *PJSRR*, 2, 58-69.
- Ali, E. H., Hashem, M., & Al-Salahy, M. B. (2011). Pathogenicity and oxidative stress in Nile tilapia caused by *Aphanomyces laevis* and *Phoma herbarum* isolated from farmed fish. *Diseases of aquatic organisms*, 94(1), 17-28
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J.S., & Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the total Environment*, 407(6), 2115-2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Andrade, T., Afonso, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J. M., Serradeiro, R., & Costas, B. (2015). Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture*, 438, 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.034>
- Angeles-Escobar, B. E., da Silva, S. M. B. C., & Severi, W. (2021). Growth, red blood cells, and gill alterations of red pacu (*Piaractus brachypomus*) fingerlings by chronic exposure to different total suspended solids in biofloc. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1–17. <https://doi.org/10.1111/jwas.12837>
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical research in toxicology*, 10(1), 2-18.
- Avnimelech Y (1999) Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227–235.
- Avnimelech, Y. (2015). *Biofloc technology – A practical guide book*, 3rd ed: The World Aquaculture Society.
- Beveridge, M. (1991). *Cage aquaculture*. Oxford: Fishing News Books, 351 p.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5, 9-19.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., & Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942.
- Buetler, T. M., Krauskopf, A., & Ruegg, U. T. (2004). Role of superoxide as a signaling molecule. *Physiology*, 19(3), 120-123.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., & Oliva-Teles, A. (2012). Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163(3-4), 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.003>
- Cattaneo, R., Clasen, B., Lucia Loro, V., de Menezes, C. C., Moraes, B., Santi, A., Toni, C., Avila, L.A. & Zanella, R. (2011). Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the herbicide penoxsulam in rice field conditions. *Journal of Applied Toxicology*, 31(7), 626-632.
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356, 351-356.
- Dauda, A. B. (2020). Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured

aquatic animals. Reviews in Aquaculture, 12(2), 1193-1210.<https://doi.org/10.1111/raq.12379>

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137

Dickinson, D.A., & Forman, H.J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64 (5-6): 1019-1026.

Emerenciano, M. G. C., Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., & Miranda-Baeza, A. (2017). Biofloc technology (BFT): a tool for water quality management in aquaculture. *Water quality*, 5, 92-109.

Erel, O., & Neselioglu, S. (2014). A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical biochemistry*, 47(18): 326-332.

Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica*

Gaona, C. A. P., de Almeida, M. S., Viau, V., Poersch, L. H., & Wasielesky Jr, W. (2017). Effect of different total suspended solids levels on a *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) BFT culture system during biofloc formation. *Aquaculture Research*, 48(3), 1070-1079.<https://doi.org/10.1111/are.12949>

Gutteridge, J. M. (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS letters*, 201(2), 291-295.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press, v.1, 851p.

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in biochemical sciences*, 35(9), 505-513.

Hatem M.H., Abdelhay Y.B., Alayafi A.H. and Suloma A. (2013). Application of new strategies to reduce suspended solids in zero-exchange system: I. Histological alterations in the gills of Nile tilapia. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 9, n. 2, p. 1186-1192.

Hegazi, M. M., Attia, Z. I., & Ashour, O. A. (2010). Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic toxicology*, 99(2), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.007>

Hermes-Lima, M., Moreira, D. C., Rivera-Ingraham, G. A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T. C., & Campos, É. G. (2015). Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1122-1143.

Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., & Ho, D. S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32804-32812.

Höhn, A., König, J., & Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of proteomics*, 92, 132-159.

Holanda, M., Santana, G., Furtado, P., Rodrigues, R. V., Cerqueira, V.R., Sampaio, L.A., Wasielesky, W., & Poersch, L.H. (2020). Evidence of total suspended solids control by *Mugil liza* reared in an integrated system with pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using biofloc technology. *Aquaculture Reports*, 18, 100479. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100479>

IBGE (2023). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Produção de Aquicultura.

- Johnson, L. J., Meacham, S. L., & Kruskall, L. J. (2003). The antioxidants-vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *Journal of agromedicine*, 9 (1): 65-82.
- Kabel, A.M. (2014). "Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition." *World Journal of Nutrition and Health*, vol. 2, no. 3, 35-38.
- Kathia, C. M., del Carmen, M. D. M., Aida, H. P., Jorge, C. M., & Daniel, B. C. (2017). Probiotics used in Biofloc system for fish and crustacean culture: A review. *aquaculture*, 23, 28.
- Kim, S. K., Pang, Z., Seo, H. C., Cho, Y. R., Samocha, T., & Jang, I. K. (2014). Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, 45(2), 362-371.
- Li, L., Li, M., Zhu, R., Yu, Z., Wang, J., Duan, J., Wang, T., & Wu, L. (2019). Effects of β -conglycinin on growth performance, antioxidant capacity and intestinal health in juvenile golden crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*, 50(11), 3231-3241. <https://doi.org/10.1111/are.14278>
- Luo, G., Zhang, N., Cai, S., Tan, H., & Liu, Z. (2017). Nitrogen dynamics, bacterial community composition and biofloc quality in biofloc-based systems cultured *Oreochromis niloticus* with poly- β -hydroxybutyric and polycaprolactone as external carbohydrates. *Aquaculture*, 479, 732-741. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.017>
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 15, 75-88.
- Martins, G. B., Tarouco, F., Rosa, C. E., & Robaldo, R. B. (2017). The utilization of sodium bicarbonate, calcium carbonate or hydroxide in biofloc system: Water quality, growth performance and oxidative stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 468, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.046>
- Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95-108.
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Amado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., Chaves, I. S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. and Physiol. Part C: Toxicol. & Pharmacol.*, 146(1-2), 221-234. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>
- Nitz, L. F., Maltez, L. C., Pellegrin, L., Garcia, L. D. O., Barbas, L. A. L., & Prentice-Hernandez, C. (2019). Flesh quality and stress responses of *Piaractus mesopotamicus* after exposure to sublethal levels of ammonia and subsequent recovery. *B. Inst. Pesca*, e325-e325.
- Nitz, L. F., Pellegrin, L., Pinto, D. S., Maltez, L. C., Copatti, C. E., & Garcia, L. (2020). Secondary stress responses to hypoxia and re-oxygenation at different temperatures in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles. *Aquaculture Research*, 51(11), 4471-4481. <https://doi.org/10.1111/are.14792>
- Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447-463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)
- Pellegrin, L., Nitz, L. F., Maltez, L. C., Copatti, C. E., & Garcia, L. (2020). Alkaline water improves the growth and antioxidant responses of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 519, 734713. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734713>
- Pellegrin, L., Nitz, L. F., Pinto, D. D. S. B., Copatti, C. E., Wasielesky, W., & Garcia, L. (2022). Effects of suspended solids in the survival and haematological parameters of

pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) in a biofloc technology culture system. *Aquaculture Research*, 53(1), 276-284. <https://doi.org/10.1111/are.15575>

Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L., & Leffler, J.W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299 (1-4), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>.

Redding, J. M., Schreck, C. B., & Everest, F. H. (1987). Physiological effects on coho salmon and steelhead of exposure to suspended solids. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116(5), 737-744. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1987\)116<737:PEOCSA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1987)116<737:PEOCSA>2.0.CO;2)

Romano, N., Surratt, A., Renukdas, N., Monico, J., Egnew, N., & Sinha, A. K. (2020). Assessing the feasibility of biofloc technology to largemouth bass *Micropterus salmoides* juveniles: Insights into their welfare and physiology. *Aquaculture*, 520, 735008.

Rotilio, G., Rossi, L., Martino, A. D., Ferreira, A. M. D. C., & Ciriolo, M. R. (1995). Free radicals, metal ions and oxidative stress: Chemical mechanisms of damage and protection in living systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 6, 221–227. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.19950037>

Sandoval-Vargas, L. Y., Jiménez-Amaya, M. N., Rodríguez-Pulido, J., Guaje-Ramírez, D. N., Ramírez-Merlano, J. A., & Medina-Robles, V. M. (2020). Applying biofloc technology in the culture of juvenile of *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): Effects on zootechnical performance and water quality. *Aquaculture Research*, 51(9), 3865-3878. <https://doi.org/10.1111/are.14734>

Scandalios, J. G. (1990). Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in genetics*, 28, 1-41.

Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E. P., George, S., James, M., Kullman, S. W., Van Der Hurk, P. & Willett, K. (2008). Biotransformation in fishes. *The toxicology of fishes*, 1.

Schumann, M., & Brinker, A. (2020). Understanding and managing suspended solids in intensive salmonid aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 12, 2109–2139. <https://doi.org/10.1111/raq.12425>

Soady, M. R., Ghonimy, A., Greco, L. S. L., Chen, Z., Dyzenchauz, A., & Li, J. (2023). Total suspended solids and their impact in a biofloc system: Current and potentially new management strategies. *Aquaculture*, 739524.

Souza, J., Cardozo, A., Wasielesky Jr, W., & Abreu, P. C. (2019). Does the biofloc size matter to the nitrification process in Biofloc Technology (BFT) systems?. *Aquaculture*, 500, 443-450.

Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, A. C., & Ahmad, I. (2013). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2133-2149.

Srinivasan, V. (2002). Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases.

Stoliar, O. B., & Lushchak, V. I. (2012). Environmental pollution and oxidative stress in fish. *Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants*, 131-166.

Sun, S., Ge, X., Zhu, J., Xuan, F., & Jiang, X. (2014). Identification and mRNA expression of antioxidant enzyme genes associated with the oxidative stress response in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in response to acute nitrite exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 159, 69-77.

Ueno-Fukura, M., Corredor-Ruiz, J.S., Jiménez-Ojeda, Y.K., & Collazos-Lasso, L.F. (2019). Use of alkaline agents in nursery cultivation of *Piaractus brachypomus* with

Biofloc–BFT technology. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation International Journal of the Bioflux Society, 12(4), 989–995

Urbinati, E. C.; & Gonçalves, F. D. (2013). Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), In: Baldissotto, B.; Gomes, L. C. (Eds.) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. UFMS, Santa Maria, 2013, Cap.8, p. 225-246.

Van Wyk, P. (2006). Production of *Litopenaeus vannamei* in recirculating aquaculture systems: Management and design considerations. In: Rakestraw, T.T., Douglas, L.S., Marsh, L., Granata, L., Correa, A., Flick, G.J. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Conference on Recirculation Aquaculture*. Roanoke, VA, pp. 38–47

Wang, G., Yu, E., Xie, J., Yu, D., Li, Z., Luo, W., Qiu, L. & Zheng, Z. (2015). Effect of C/N ratio on water quality in zero-water exchange tanks and the biofloc supplementation in feed on the growth performance of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 443, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.015>

Wang, X., Xu, W., Zhou, H., Zhang, Y., Gao, W., Zhang, W., & Mai, K. (2018). Reduced glutathione supplementation in practical diet improves the growth, anti-oxidative capacity, disease resistance and gut morphology of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 73, 152-157. [10.1016/j.fsi.2017.11.043](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.043)

Wilén, B. M., Nielsen, J. L., Keiding, K., & Nielsen, P. H. (2000). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(2), 145-156.

Zhang, N., Luo, G., Tan, H., Liu, W., & Hou, Z. (2016). Growth, digestive enzyme activity and welfare of tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in a biofloc-based system with poly-β-hydroxybutyric as a carbon source. *Aquaculture*, 464, 710–717. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.013>

Capítulo I

Manuscrito

Efeito da concentração dos sólidos suspensos totais nos parâmetros de estresse oxidativo em juvenis de *Piaractus mesopotamicus* criados em sistema BFT

Andressa Larré Bitencourt^{1,3}, Wilson Wasielesky^{2,3}, Luciano Garcia^{1,3*}.

¹Instituto de Oceanografia, Laboratório de Aquacultura Continental, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

²Instituto de Oceanografia, Laboratório de Carcinocultura, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

³Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

*Autor correspondente: Luciano Garcia - Laboratório de Aquacultura Continental, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.
Email: garcia_log@hotmail.com

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar parâmetros de estresse oxidativo, por meio da avaliação de antioxidantes (SOD, CAT, GST, GSH, ACAP) danos nas proteínas (PSH) e danos nos lipídios (LPO) em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a diferentes concentrações de sólidos suspensos totais (SST) em sistema BFT, além da realização de análise de histologia branquial e comunidade microbiana dos bioflocos. Sendo assim, 225 juvenis de pacu ($51,70 \pm 1,07$ g) foram expostos a cinco diferentes concentrações (3 repetições, $n = 45$ peixes/tratamento) de SST (mg/L): T1: controle-água clara, T2:250; T3:500; T4:750; T5:1000, durante 15 dias. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (9 e 15h) com 5% da biomassa total de cada tratamento, com ração comercial (32% PB). Foram coletados três tecidos para as análises: cérebro, fígado e brânquias, no início e ao final do período experimental. A taxa de sobrevivência, durante o experimento, foi de 100% em todos os tratamentos. Como resultados, observamos que nas concentrações mais elevadas de SST (750 e 1000 mg/L) ocorreu maior atividade dos antioxidantes nos tecidos analisados. Quanto aos danos oxidativos, não foi demonstrado danos proteicos nas diferentes concentrações, porém nos lipídios em 750 mg SST/L ocorreu maiores níveis de LPO nas brânquias. Na histologia verificou-se diferenças estatística em relação a contagem de ionócitos e espessura entre as lamelas, sobre os microrganismos, as bactérias e ciliados, observamos uma relação positiva entre a abundância e níveis de SST, demais microrganismos tiveram suas presenças observada apenas em determinados tratamentos e/ou tempo experimental. De acordo com esses resultados, indicamos uma concentração de até 500 mg SST/L, visto que não causa grandes danos ao seu bem estar animal, alterações nas defesas antioxidantes e alterações morfológicas.

Palavras-chave: Piscicultura, pacu, sistema antioxidante, SST, microrganismos, qualidade da água

1. INTRODUÇÃO

O sistema de bioflocos (sistema BFT) tem como uma de suas principais características a estimulação do desenvolvimento de bactérias heterotróficas e quimioautotróficas através da relação carbono/nitrogênio (C:N) (Avnimelech, 1999). Para que essa relação permaneça constante, torna-se necessário a adição de fontes de carbono no meio de cultivo (De Schryver et al., 2008).

Com a reutilização dos nutrientes e a troca mínima de água, o sistema BFT acarreta em uma melhor sustentabilidade, biossegurança e produtividade dos ambientes de produção (Yu et al., 2020). Em relação às questões nutricionais, pode ser uma fonte de probióticos e compostos bioativos, além de servir como fonte complementar na alimentação, melhorando a saúde fisiológica dos animais (Ren et al., 2019), e também na condição antioxidante. Mesmo com todos os benefícios que o sistema BFT apresenta para várias espécies, não há muitos trabalhos com espécies nativas brasileiras, como o pacu.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é nativo da Bacia do Prata, sua ocorrência é maior em planícies do Pantanal sul americano, mais precisamente na região Centro-Oeste do Brasil (Urbinati & Gonçalves, 2010). É uma espécie de hábito alimentar onívoro, que possui rápido crescimento, rusticidade e é bem aceito no mercado consumidor (Urbinati & Gonçalves, 2013), já que seus filés são de boa qualidade (Pullela et al., 2000). Esta espécie é criada em grande parte da América do Sul e sua carne consumida, de diferentes formas e processamento, no continente Americano. Atualmente, alguns estudos estão sendo desenvolvidos e foi constatado que o pacu possui tolerância a concentrações de até 5000 mg/L de sólidos suspensos totais (SST) através da verificação por biomarcadores hematológicos (Pellegrin et al., 2022).

Os sólidos suspensos totais do sistema BFT são formados pela comunidade de microrganismos, além da ração não consumida e fezes, ou seja, do acúmulo da matéria orgânica, sendo que taxas elevadas de SST podem causar danos fisiológicos e bioquímicos aos animais (Redding et al., 1987). Como exemplo, podemos citar a obstrução das brânquias, o que consequentemente pode levar a uma situação de hipóxia (Hargreaves, 2013) induzindo o animal a uma situação de estresse.

O estresse pode ser descrito como alterações de respostas bioquímicas devido a um evento estressor, como alterações no ambiente (Stoliar & Lushchak, 2012), e dependendo da continuidade que o agente estressor atua sobre o animal, poderá ocorrer

o estresse oxidativo. O oxigênio, apesar da sua grande importância, pode contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Srikanth et al., 2013).

Sabe-se que espécies reativas de oxigênio podem causar danos nas células e no DNA, como exemplo a peroxidação lipídica, onde os ácidos graxos poliinsaturados tendem a ser atacados por radicais livres, e com isso se inicia uma reação em cadeia (Lushchak, 2011). Além disso, causam danos a outras organelas, podendo ocorrer apoptose (Dutordoir & Bates, 2016). Para então reduzir os possíveis danos a serem causados, os organismos utilizam os antioxidantes que auxiliam as células a combater os danos oxidativos, podendo ser divididos em dois grupos: enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx)) e não enzimáticos (GSH, ácido ascórbico, vitamina E e carotenóides). A falta de equilíbrio entre defesas antioxidantes e radicais livres é nomeado de estresse oxidativo e, os danos causados por esse, levam ocasionalmente o organismo a sofrer danos tanto fisiológicos quanto bioquímicos (Sohal, 2002).

Dessa forma, um ambiente desfavorável pode afetar fisiologicamente o animal, levando ao estresse oxidativo, sendo que um dos primeiros sinais que assinala um ambiente degradado é a alteração dos parâmetros físico-químicos da água (Chowdhury & Saikia, 2020). De acordo com isso, o presente estudo teve como objetivo verificar se os sólidos suspensos totais podem ocasionar alterações nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo como biomarcadores na criação de juvenis de pacu.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados 225 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ($51,70 \pm 1,07$ g) obtidos de uma piscicultura comercial. Os animais foram transportados até o Laboratório de Aquacultura Continental (LAC) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, onde foram submetidos a um período de quarentena (30 dias). Durante este período os animais permaneceram, em uma sala climatizada (26°C), com aeração constante (6 mgOD/L) e fotoperíodo artificial (12L/12E) em sistemas de recirculação (RAS). O RAS era composto por tanques de 310 L, com filtro mecânico e biológico. A alimentação dos animais foi com ração comercial (32% PB) e ofertada em 5% de sua biomassa diariamente. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Bem-estar Animal da FURG (No. P001/2021).

2.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Após a quarentena, os animais foram acondicionados nas caixas onde o experimento foi realizado. O experimento teve duração de 15 dias e contou com cinco tratamentos/concentrações de SST (mg/L): T1: controle água clara; T2: 250; T3: 500, T4: 750 e T5: 1000, cada um com 3 repetições (caixas com 250 L de volume útil), com 15 animais por repetição (45 animais por tratamento). O sistema adotado para realização do experimento foi fechado, e os animais foram submetidos ao sistema de bioflocos (BFT), nas diferentes concentrações de SST, nos diferentes tratamentos. Para a formação dos bioflocos do experimento, foi utilizado um inóculo, proveniente de um cultivo de tilápia em sistema BFT, já em andamento no laboratório “N Concept” (Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA). A partir desse inóculo foi realizado o seu desenvolvimento até que atingisse as concentrações pré-determinadas (T2, T3, T4 e T5) para a realização do experimento. Após as concentrações de SST atingirem o ideal para cada tratamento, o experimento foi iniciado com alocação dos animais nos tanques experimentais. Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia (9 e 15:00h) com 5% de sua biomassa.

2.2. PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA

Os parâmetros de qualidade de água, temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro digital), pH (pHmetro digital), alcalinidade total (Eaton et al., 1995), dureza (Adad, 1982), amônia total (UNESCO, 1983), amônia não-ionizada (Colt, 2002), nitrito (Boyd & Tucker, 2014), foram verificados diariamente e ajustados para os níveis ideais para a espécie. Sólidos suspensos (SS; cone Imhoff - 30 min.) foram verificados diariamente e SST (Strickland & Parsons, 1972) foi verificado a cada 3 dias, sendo de acordo com os valores estabelecidos para cada tratamento. O índice de volume de bioflocos foi determinado pela seguinte fórmula: $FVI = SS \text{ (mL)} / SST \text{ (g)}$ (Yousuf, 2013).

2.3. COLETAS

Durante o experimento foram realizadas duas coletas, inicial e final, onde foram coletados tecidos (brânquias, fígado e cérebro) para análises dos parâmetros de respostas antioxidantes e de estresse oxidativo e análises histológicas (brânquias). Para realização destas coletas os peixes foram anestesiados com hidrocloreto de

benzocaína e após, eutanasiados por secção da medula espinhal. Amostras de tecido foram coletadas, armazenadas em microtubos (2 mL), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em um ultrafreezer (-80 °C) até o momento das análises de estresse oxidativo.

2.4. HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS

As amostras dos tecidos (brânquias, fígado e cérebro) foram homogeneizadas (1:5, m/v) de acordo com a metodologia de da Rocha et al. (2009), em tampão Tris-HCl (pH ajustado em 7,75) contendo Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e Mg²⁺ (5 mM). Os homogeneizados foram centrifugados (10,000 xg, 20 minutos, 4 °C) e os sobrenadantes foram utilizados para as análises.

2.5. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

2.5.1. Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi determinada em leitor de microplacas (BioTek LX 800) pelo método de Biureto (550 nm) utilizando kit comercial (Labtest®).

2.5.2. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nas amostras dos diferentes tecidos como descrito por Misra & Fridovich (1972). Este método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da epinefrina em adenocromo. A reação de cor foi medida em 480 nm. Alíquotas da amostra (20, 40 e 60 µL) foram adicionadas em uma mistura contendo 10 µL de epinefrina e 1000 µL de tampão Na₂CO₃ (0,05M, pH 10,2). Uma unidade de enzima (1 UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de auto-oxidação da epinefrina em 50% a 26°C.

2.5.3. Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi avaliada de acordo com a metodologia de Aebi (1984). Foi utilizado o tampão de fosfato de potássio (TFK) (50 mM, pH 7) e o H₂O₂ (300 mM), onde as amostras de fígado e brânquias foram diluídas na proporção 1:10. Para verificação da atividade da CAT, foram utilizadas as seguintes proporções de diferentes substâncias, onde no fígado foi usado 20 µL da amostra, 905 µL do tampão

TFK e 40 µL do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), nas brânquias foi usado 20 µL da amostra, 925 µL do tampão TFK e 30 µL de H₂O₂ e para o cérebro 10 µL da amostra, 935 µL do tampão TFK e 30 µL de H₂O₂. A metodologia se baseia na decomposição do H₂O₂ nas amostras, seguida da leitura por espectrofotômetro a 240 nm.

2.5.4. Determinação da atividade da Glutathione-S transferase (GST)

Para determinação dessa enzima, foi utilizado o reativo de 1 cloro-2,4 dinitrobenzeno (CNDB) que, na presença da glutathione, forma GS-dinitrobenzeno (GS-DNB). A análise foi realizada com 20 µL (fígado) e 50 µL (cérebro e brânquias) de homogeneizado dos tecidos adicionados em 400 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5), 10 µL de GSH (3mM) e 10 µL de CNDB (1 mM). As amostras foram lidas a 340 nm. Para o cálculo da atividade enzimática utilizamos um coeficiente de extinção molar de 9.600. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína (Habig et al., 1974).

2.5.5. Glutathione reduzida (GSH)

Alíquotas de amostras (30 µL) dos diferentes tecidos foram precipitadas com ácido perclórico (30 µL) e após a centrifugação (3000 x g, 5 minutos) o sobrenadante foi utilizado para a determinação da fluorescência (excitação: 350 nm; emissão: 420 nm). Em seguida, 10 µL da amostra, 10 µL de GSH e 160 µL do tampão TFK (0,1M, pH 8) foram adicionados em uma microplaca para a leitura em um leitor de placas (Hissin & Hief, 1972).

2.5.6. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

A ACAP foi determinada por meio da detecção de ERO nas amostras com e sem a adição de um gerador de radicais peroxil, conforme descrito por Amado et al. (2009). As amostras foram antecipadamente padronizadas em 2 mg (para fígado e cérebro) e 0,5 mg (para brânquias) proteína/ mL, através da diluição com o tampão de homogeneização. Posteriormente, foram expostas a radicais peroxil gerados pela termod decomposição (37°C) do dicloridrato do 2,2'-azobis- (2- metilpropanoamidina) (ABAP, 4 mM). Radicais peroxil reagem com o substrato fluorescente (2',7' diacetato de diclorofluoresceína - H₂DCF-DA) e então a fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 520 nm) foi mensurada em espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer) a cada 5 minutos, durante 30 minutos.

2.5.7. Lipoperoxidação (LPO)

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Oakes & Van Der Kraak (2003). Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através da quantificação de MDA (Malondialdeído), 20 µL de solução de BHT (67µM), 150 µL de solução de ácido acético 20%, 150 µL solução de TBA 0.8 %, 50 µL de água Milli-Q, e 20 µL de SDS 8.1% foram adicionados a 41,2 µL (cérebro), 30 µL (fígado e brânquias) das amostras homogeneizadas, e então aquecidas até 95 °C, durante 30 minutos. Em seguida, 100 µL de água Milli-Q e 500 µL de n-butanol foram adicionados a solução final. O sobrenadante resultante após a centrifugação (3,000 x g, 10 minutos, 15 °C) foi utilizado para determinar a fluorescência (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm) em espectrofluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer). Os resultados foram expressos em nmol TMP/mg proteína, onde TMP representa tetrametoxipropano (ACROS Organics®), utilizado como padrão.

2.5.8. Determinação dos grupos sulfidrila (P-SH)

Para a determinação dos grupos sulfidrila (P-SH) foi empregado a metodologia de Sedlak & Lindsay (1968) utilizando DTNB (ácido 5,5-ditiobis- (2- nitrobenzóico; Sigma). Para a determinação do teor de P-SH, a proteína das amostras foi precipitada com ácido tricloroacético (TCA 50%) seguida de centrifugação (15 minutos, 4 °C 3000 x g). Em seguida, o pellet formado pela proteína precipitada, foi ressuspendido com tampão de homogeneização (Tris-HCl). Para essa etapa, as amostras foram divididas em duas alíquotas, uma contendo o agente redutor (NaBH₄) e a outra sem o agente redutor, a qual foi adicionado o tampão fosfato de sódio. As leituras foram realizadas por absorbância (405 nm) utilizando um leitor de microplacas (Biotek Elx 800®).

2.6. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para a realização das análises morfológicas foram coletadas amostras do segundo arco branquial esquerdo (nove peixes por tratamento). As lâminas foram confeccionadas mediante procedimentos histotécnicos de rotina, onde se obteve finos cortes com cinco micrômetros de espessura. Após, os cortes foram corados com azul de toluidina, para facilitar a identificação dos ionócitos, e fotomicrografadas com o auxílio

de um microscópio Axio Scope A1 model microscope digital image capture system Axiocam 105 color câmera (Zeiss, Germany). Após, as imagens foram analisadas com o software ImageJ.

2.7. ANÁLISE DE MICRORGANISMOS DOS BIOFLOCOS

Para caracterizar os microrganismos (bactérias e protozoários) associados aos bioflocos, foram retirados 18 ml de amostra de cada unidade de cultivo, no início e fim do experimento, e fixado em formol 37%. Para a determinação da abundância das bactérias foram realizadas confecções de lâminas, onde alíquotas das amostras (0,1mL para 250 e 500 mg SST/L; 20 µL para 750 mg SST/L e 10 µL para 1000 mg SST/L) foram filtradas em filtros de membrana de policarbonato e em seguida coradas com Laranja de Acridina (1%), na concentração de 1 µg/mL (Hobbie et al., 1977). As bactérias foram fotografadas utilizando uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio de epifluorescência, (Axioplan-Zeiss®), com magnificação de 1000X, onde posteriormente foram escolhidos 30 campos aleatórios para realização da contagem.

Em relação a determinação da abundância de protozoários foi utilizado o microscópio invertido (Olympus IX51®) com magnificação de 20 X, onde alíquotas de 0,5 mL (250 e 500 mg SST/L) e 0,3 mL (750 e 1000 mg SST/L) da amostra foram colocadas em uma câmara de sedimentação, seguido da escolha aleatória de 30 campos para contagem (Utermohl, 1958).

Os grupos de microrganismos foram delimitados da seguinte forma: Cocoides livres, cocoides aderidas, filamentosas livres, filamentosas aderidas, vibrios e bacilos para bactérias e flagelados e ciliados para protozoários. Além de grupos de rotíferos, nematoides e microalgas.

2.8. ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. A homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados foram previamente analisados pelos testes de Levene e Shapiro- Wilk, respectivamente. Para os dados de qualidade da água foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Após, os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguida de um teste post-hoc de Tukey. Para os microrganismos, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov e ANOVA de duas vias

(tempo e concentração de SST). As análises foram realizadas com um nível mínimo de significância de 95% ou $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. QUALIDADE DA ÁGUA

Os resultados de qualidade da água são apresentados na Tabela 1. Variáveis como a temperatura, oxigênio dissolvido, amônia total, amônia não ionizada e FVI não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, o pH, a alcalinidade, a dureza, o nitrito, o nitrato, o CO_2 , os sólidos sedimentáveis (SS) e os sólidos suspensos totais (SST) apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

TABELA 1: Parâmetros de qualidade da água (média $\pm$ erro padrão) durante 15 dias de cultivo de *P. mesopotamicus*, em diferentes concentrações de SST no sistema BFT. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

PARÂMETROS	TRATAMENTOS (mg/L SST)				
	0	250	500	750	1000
Temperatura (°C)	26,08 $\pm$ 0,14 ^a	26,38 $\pm$ 0,17 ^a	27,47 $\pm$ 0,19 ^a	26,47 $\pm$ 0,21 ^a	27,31 $\pm$ 0,13 ^a
Oxigênio Dissolvido(mg/L)	6,66 $\pm$ 0,03 ^a	6,94 $\pm$ 0,07 ^a	6,39 $\pm$ 0,04 ^a	6,54 $\pm$ 0,04 ^a	6,36 $\pm$ 0,03 ^a
pH	8,35 $\pm$ 0,01 ^c	8,48 $\pm$ 0,00 ^{ab}	8,51 $\pm$ 0,00 ^a	8,41 $\pm$ 0,00 ^{bc}	8,34 $\pm$ 0,00 ^c
Alcalinidade (mg CaCO_3 /L)	136,00 $\pm$ 1,70 ^b	150,79 $\pm$ 2,97 ^a	158,38 $\pm$ 2,06 ^a	157,44 $\pm$ 2,29 ^a	153,00 $\pm$ 1,65 ^a
Dureza (mg CaCO_3 /L)	146,00 $\pm$ 3,79 ^a	98,13 $\pm$ 5,08 ^c	108,66 $\pm$ 3,68 ^{bc}	117,86 $\pm$ 5,31 ^b	145,2 $\pm$ 5,25 ^a
NAT (mg/L)	0,02 $\pm$ 0,00 ^a	0,19 $\pm$ 0,06 ^a	0,11 $\pm$ 0,05 ^a	0,16 $\pm$ 0,06 ^a	0,13 $\pm$ 0,03 ^a
NH ₃ (mg/L)	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,03 $\pm$ 0,01 ^a	0,02 $\pm$ 0,01 ^a	0,02 $\pm$ 0,01 ^a	0,01 $\pm$ 0,00 ^a
NO ₂ (mg/L)	0,04 $\pm$ 0,00 ^b	0,20 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,06 $\pm$ 0,01 ^b	0,15 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,39 $\pm$ 0,16 ^a
NO ₃ (mg/L)FINAL	80 $\pm$ 0,00 ^a	17,33 $\pm$ 5,81 ^b	25,66 $\pm$ 10,39 ^b	33 $\pm$ 15,30 ^b	100 $\pm$ 0,00 ^a

CO ₂ (ppm) FINAL	1,04±0,00 ^{ab}	0,85±0,04 ^{bc}	0,83±0,04 ^c	1,02±0,04 ^{abc}	1,17±0,03 ^a
SS (ml/L)	-	11,47±0,92 ^a	20,5±0,63 ^b	33±0,98 ^c	55,79±2,77 ^d
SST (mg/L)	-	252,77±11,76 ^a	450,00±15,12 ^b	691,66±11,61 ^c	966,66±29,09 ^d
FVI (mL/g)	-	48,58±5,33 ^a	48,85±2,94 ^a	48,86±2,34 ^a	60,03±4,49 ^a

NAT: amônia total; NH₃: amônia não ionizada; NO₂: nitrito; NO₃: nitrato; CO₂: dióxido de carbono; SS: sólidos sedimentáveis; SST: sólidos suspensos totais; FVI: índice de volume de floco.

3.2. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.2.1. Superóxido dismutase (SOD)

No cérebro, houve maior atividade da SOD, na concentração com 1000 mg SST/L em relação a concentração de 250 mg SST/L, sendo que as demais concentrações não apresentaram diferenças significativas em relação aos demais (Figura 3A). A atividade da SOD no fígado, apresentou diferença significativa entre os tratamentos com concentrações de SST e o controle, que apresentou menor atividade (Figura 3B). Nas brânquias, a maior atividade apresentada da SOD foi em 1000 mg SST/L em relação ao controle e 250 mg SST/L. Além disso, a concentração de 500 mg SST/L também apresentou diferença significativa, com uma maior atividade, em relação ao controle (Figura 3C).

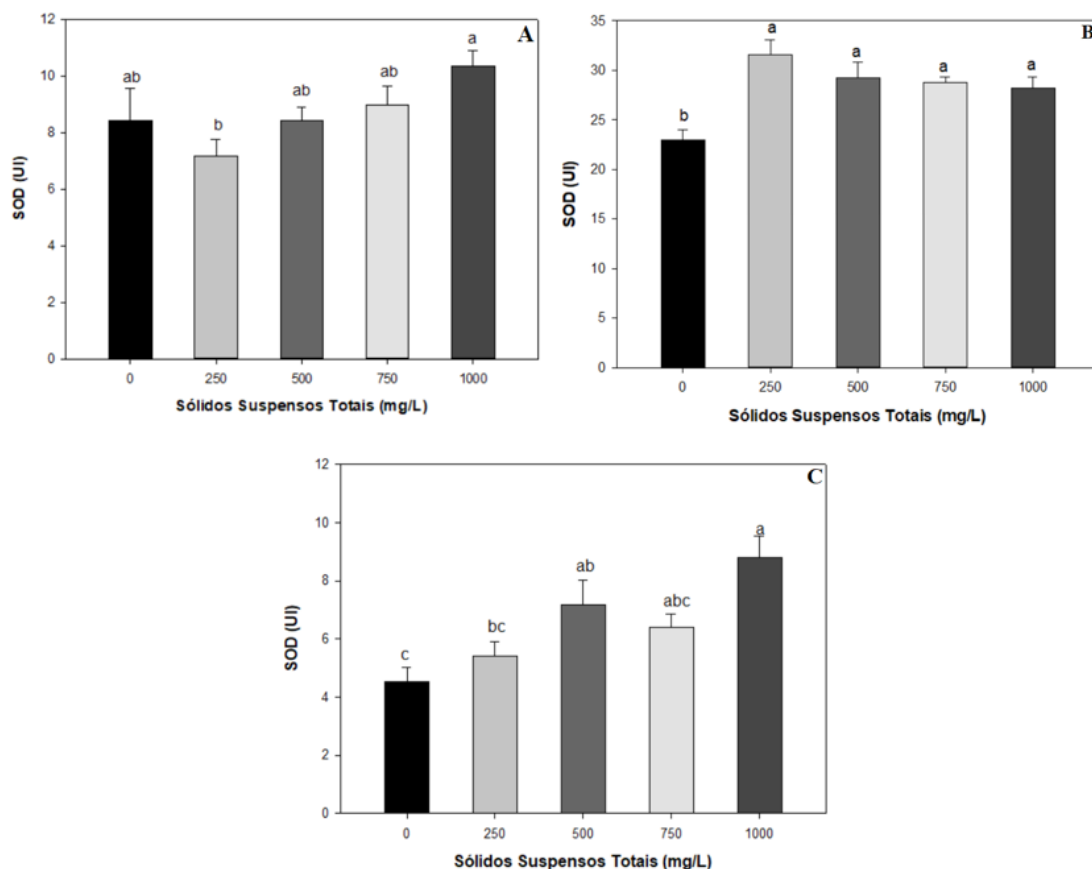


Figura 3: Superóxido dismutase no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2.2. Catalase (CAT)

Na Figura 4A, a maior atividade da catalase no cérebro, ocorreu a partir de 750 mg SST/L, diferindo significativamente do controle e 250 mg SST/L. No fígado, a atividade da catalase foi maior na seguinte sequência de concentrações: 1000 > controle > 250 = 500 = 750 mg SST/L (Figura 4B). Nas brânquias não ocorreu diferença significativa entre as concentrações de SST (Figura 4C).

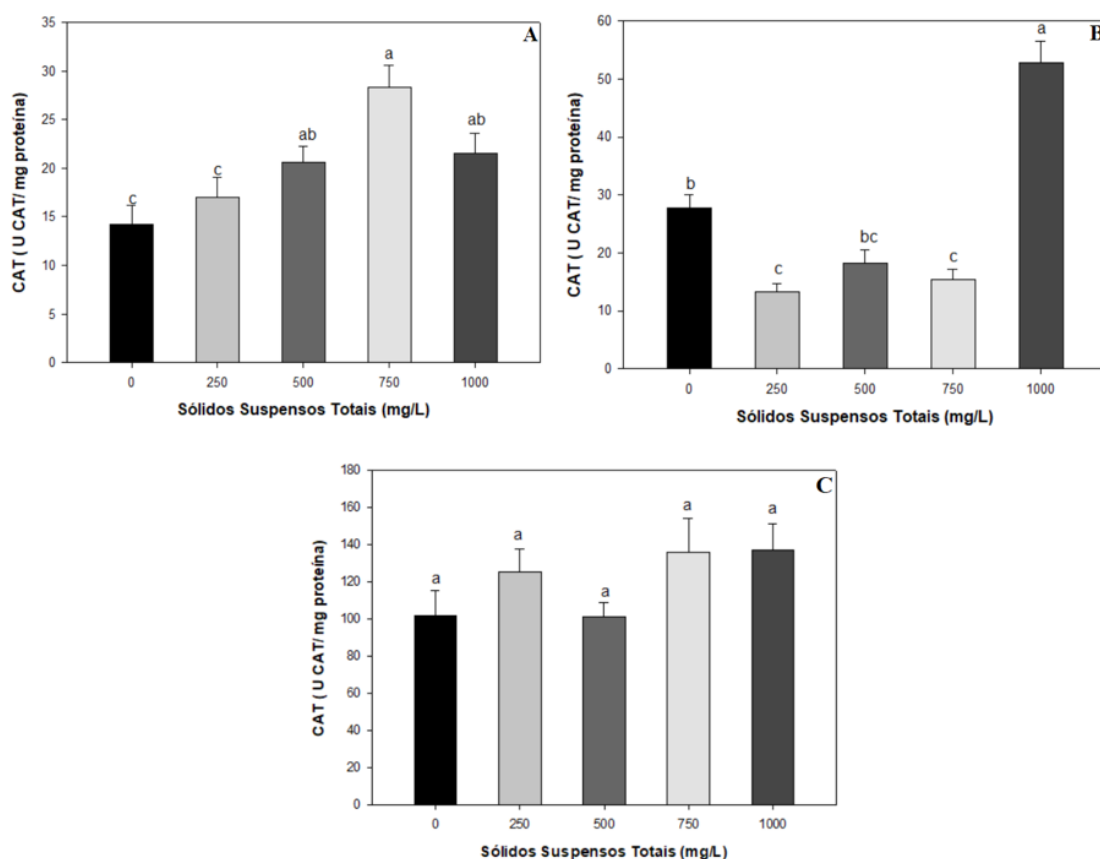


Figura 4: Catalase no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2.3. Glutathione S-Transferase (GST)

No cérebro, ocorreu maior atividade da GST nas concentrações 250, 750 e 1000 mg SST/L, em relação ao controle e 500 mg SST/L (Figura 5A). A atividade da GST, no fígado, foi significativamente maior no controle e nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L em relação a 250 e 500 mg SST/L (Figura 5B). Nas brânquias ocorreu atividade significativamente maior na concentração de 750 mg SST/L em relação ao controle e demais concentrações. Neste mesmo órgão, houve atividade significativamente maior no controle em relação a 500 e 1000 mg SST/L (Figura 5C).

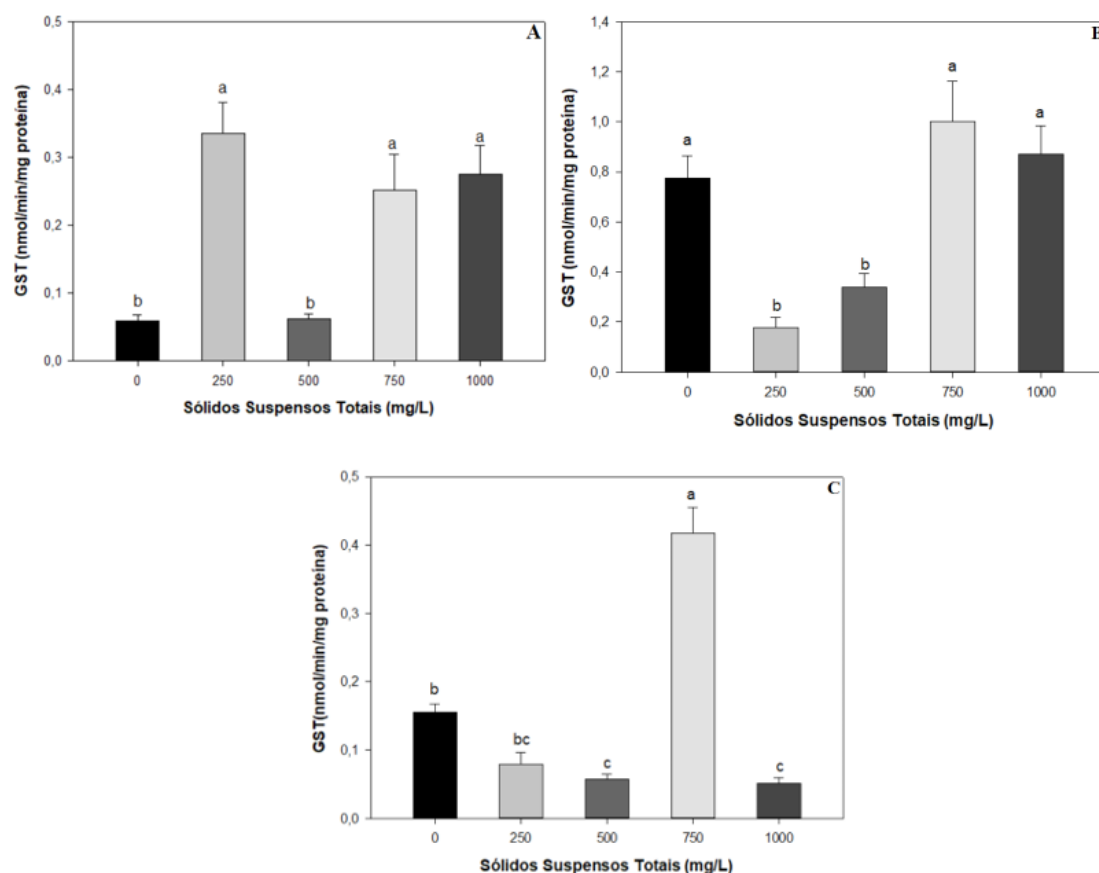


Figura 5: GST no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2.4. Glutathiona reduzida (GSH)

Como observado na Figura 6A, não houve diferença significativa no cérebro. No fígado, houve uma redução da concentração de GSH na concentração de 1000 mg SST/L em relação as demais concentrações, exceto a de 500 mg SST/L (Figura 6B). Nas brânquias a GSH foi significativamente maior no controle em relação as diferentes concentrações de SST, exceto a de 1000 mg SST/L. Nesta mesma estrutura, houve uma maior concentração de GSH na concentração de 1000 mg SST/L em relação a 750 mg SST/L (Figura 6C).

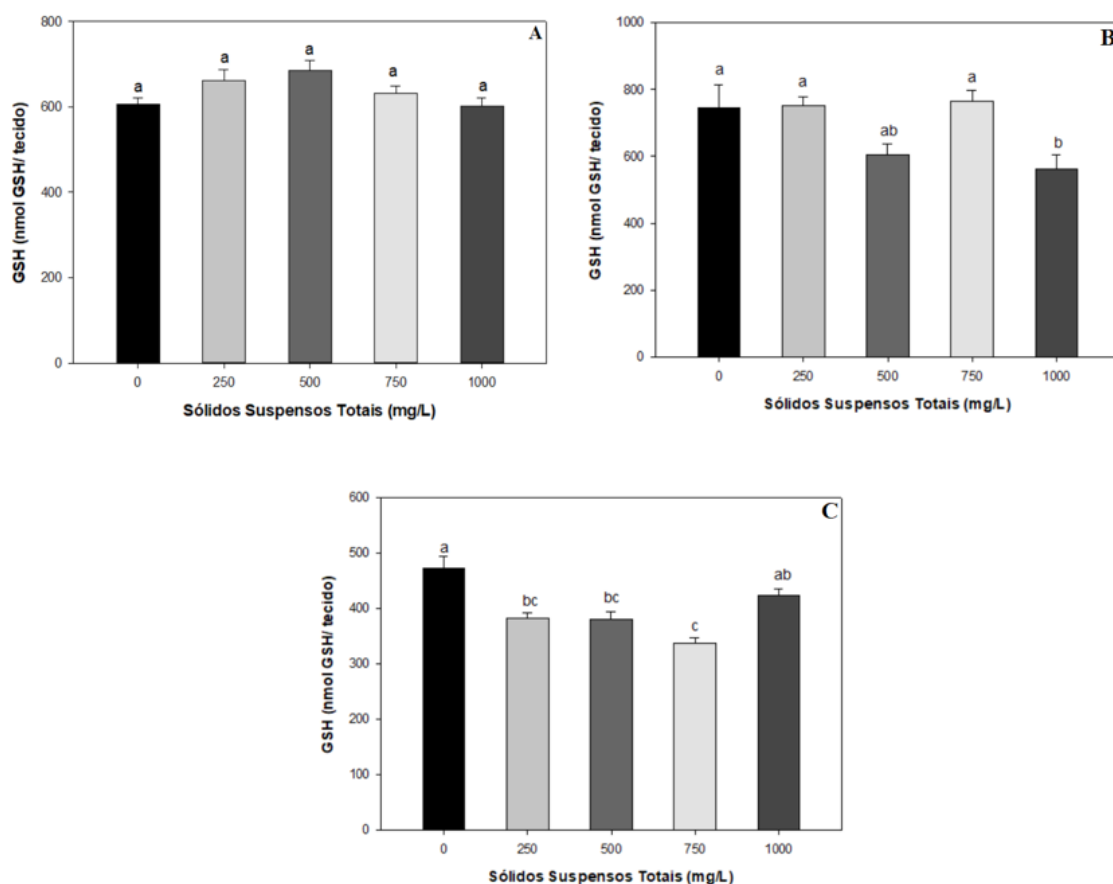


Figura 6: GSH no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2.5. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de SST testadas durante o período experimental em relação ao cérebro, fígado e brânquias (Figura 7 A, B e C).

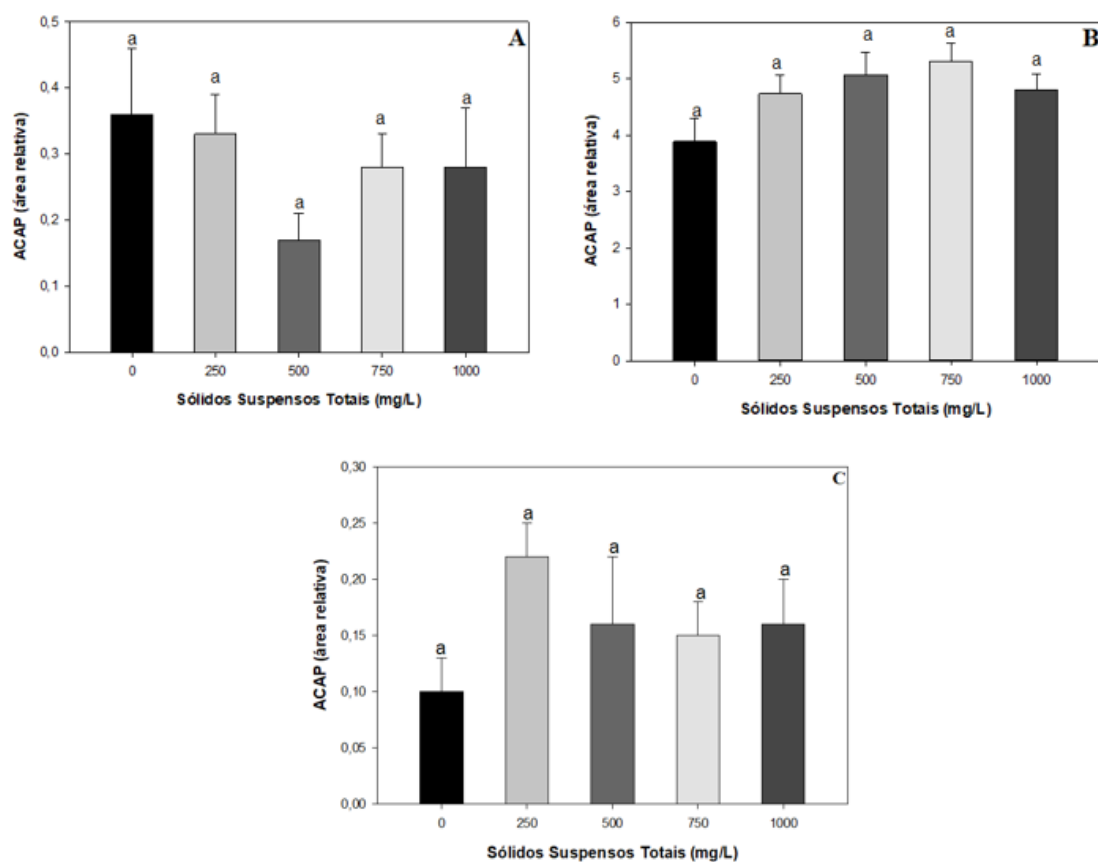


Figura 7: Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2.6. Tióis proteicos (PSH)

De acordo com a análise realizada, não houve diferença estatística nos diferentes tecidos analisados e nos diferentes tratamentos (Figura 8A, B e C).

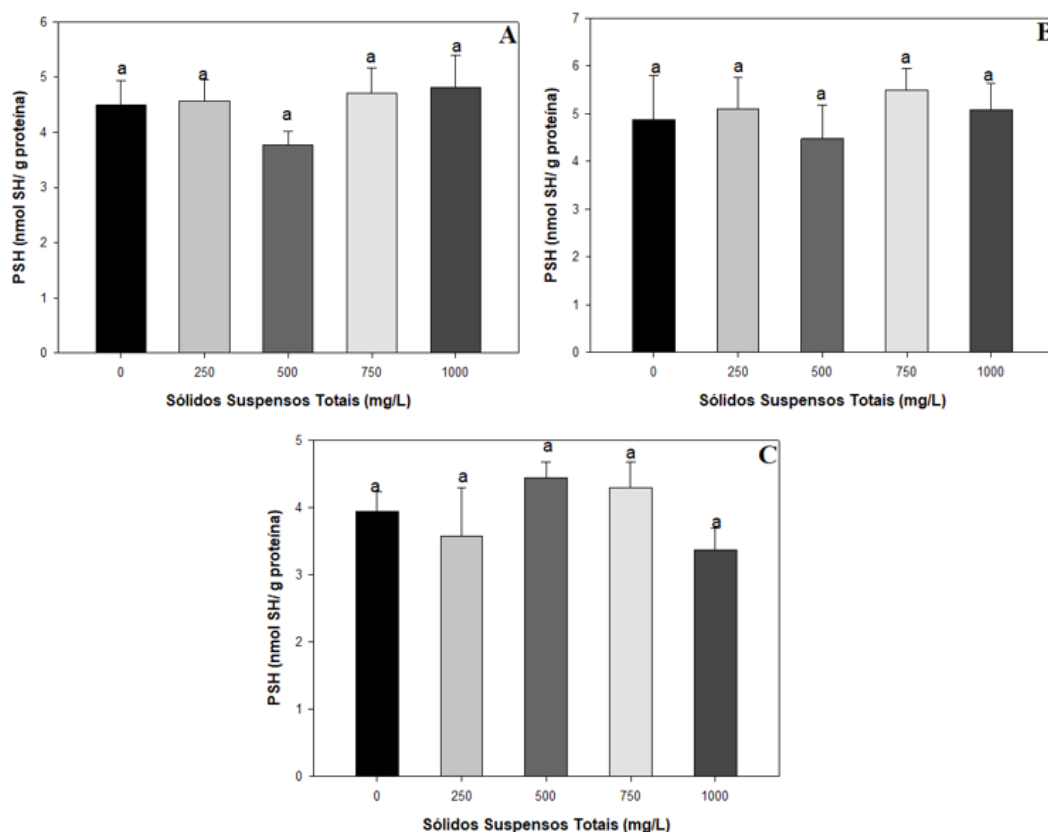


Figura 8: PSH no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.2.7. Lipoperoxidação (LPO)

Em relação ao cérebro, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de SST (Figura 9A). No fígado, podemos observar maior lipoperoxidação no controle em relação as concentrações de 500 a 1000 mg SST/L. Podemos observar que o dano lipídico diminui nas concentrações com SST em relação ao controle (Figura 9B). Nas brânquias, a concentração de 750 mg SST/L, apresentou maior dano lipídico em relação ao controle e 1000 mg SST/L (Figura 9C).

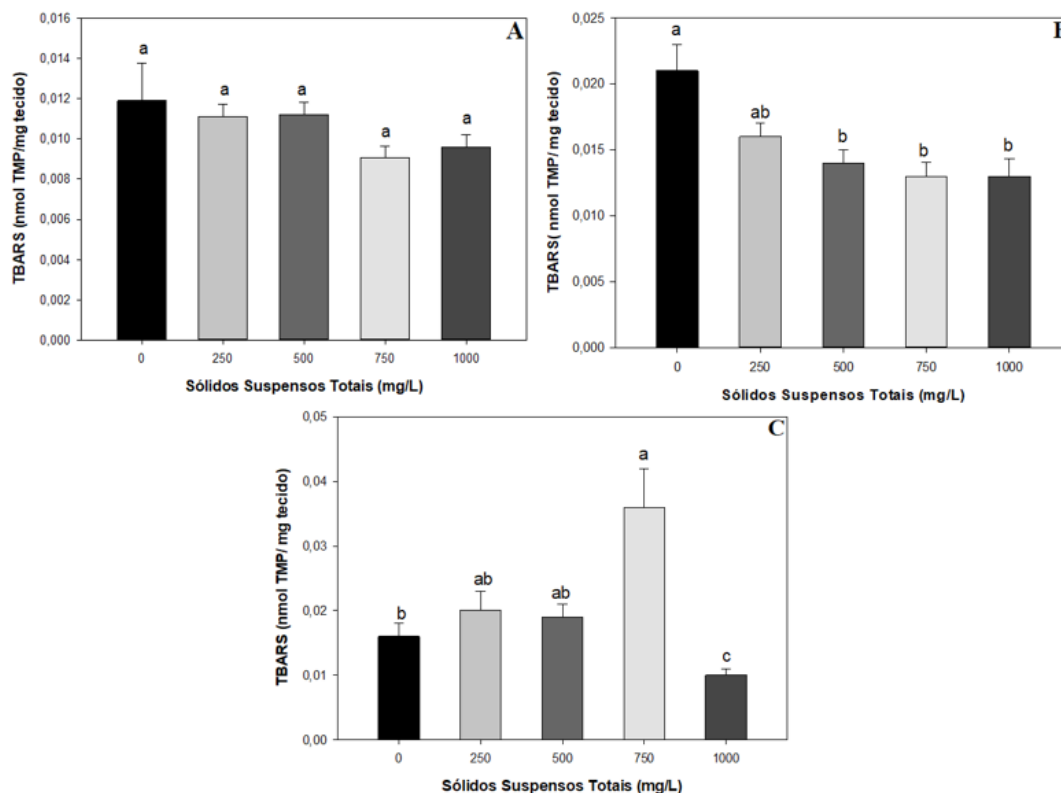


Figura 9: Lipoperoxidação no cérebro (A), fígado (B) e brânquias (C) de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

3.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA

A altura do epitélio e espessura das lamelas branquiais, não apresentaram diferenças significativas. Entretanto a espessura entre as lamelas branquiais apresentou-se menor significativamente no controle e na concentração de 1000 mg SST/L, em relação as concentrações de 250 e 500 mg SST/L (Tabela 2).

Os ionócitos presentes na estrutura branquial apresentaram diferenças significativas, com uma maior contagem no controle e na concentração de 1000 mg SST/L (Figuras 10 a 15).

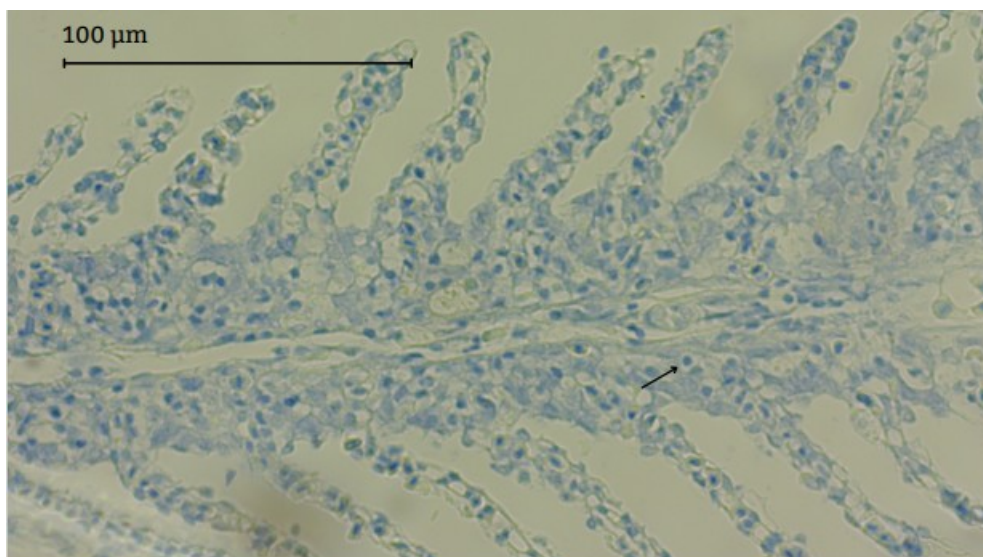


Figura 10: Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos no tratamento controle (RAS), seta indica os ionócitos.

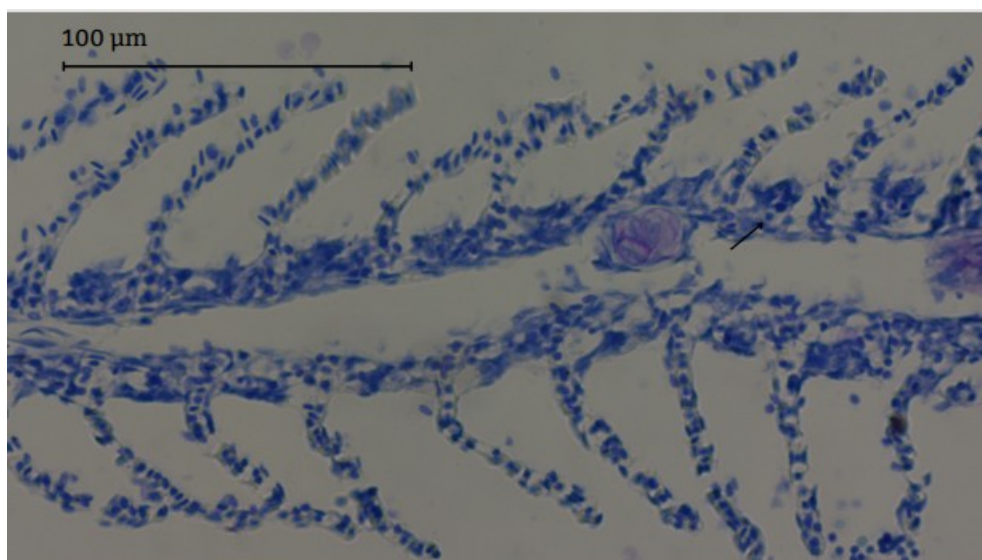


Figura 11: Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 250 mg/L SST, seta indica os ionócitos.

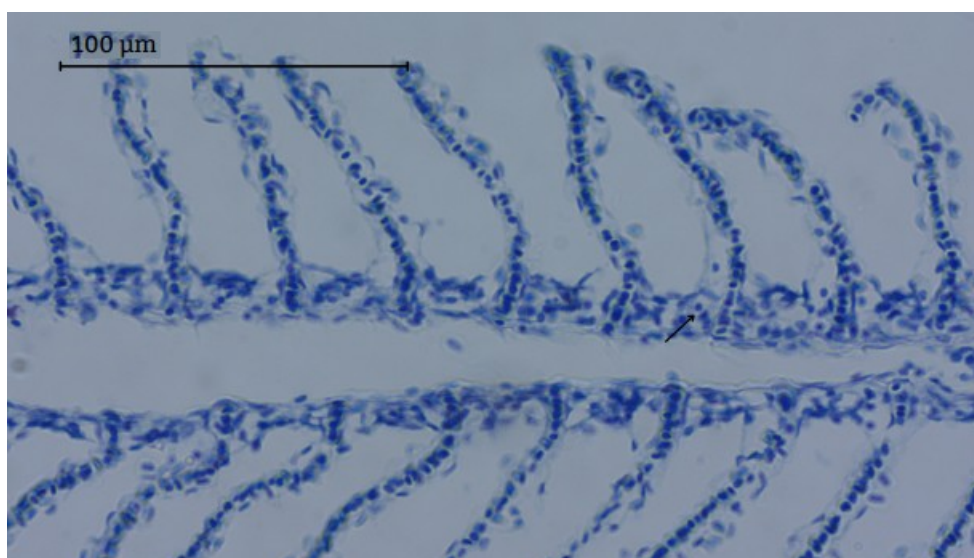


Figura 12: Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 500 mg/L SST, seta indica os ionócitos.

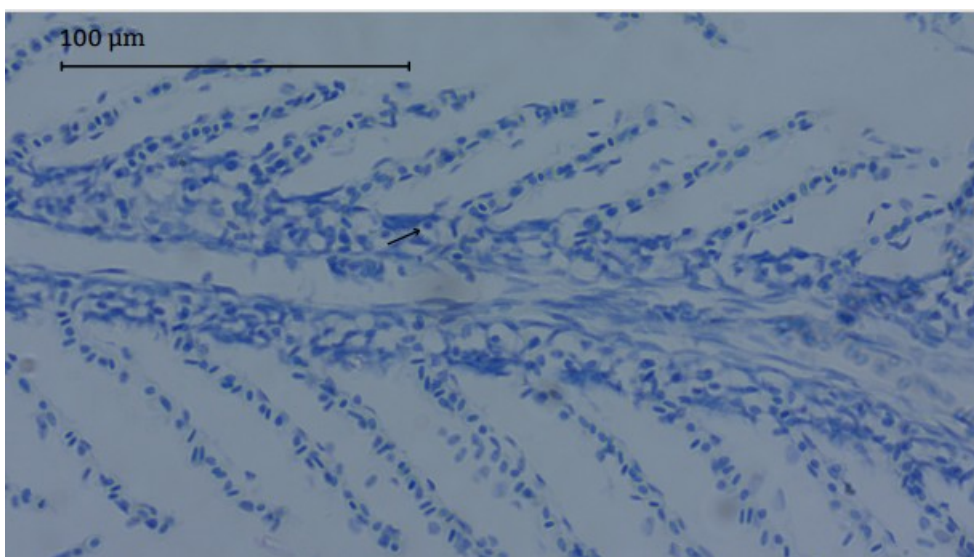


Figura 13: Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 750 mg/L SST, seta indica os ionócitos.

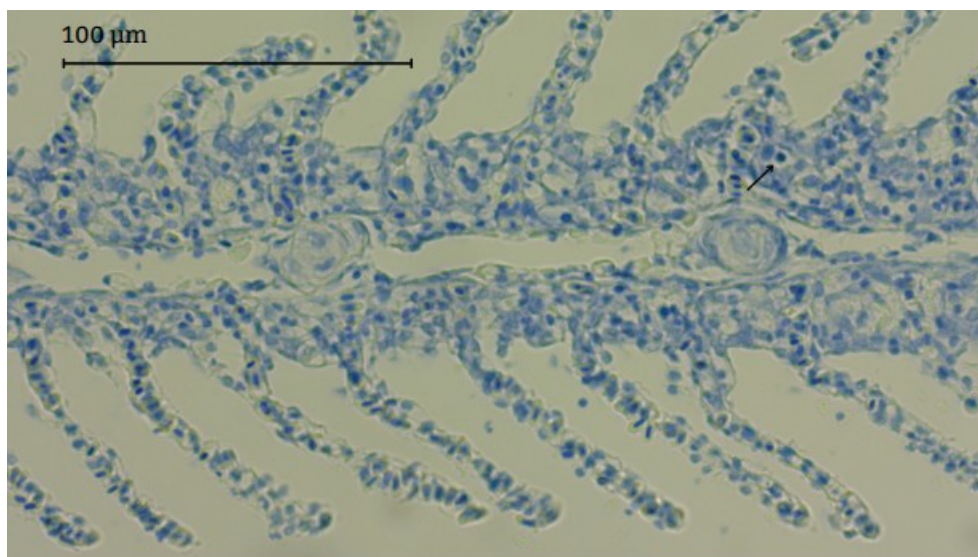


Figura 14: Histologia branquial de juvenis de pacu mantidos em 1000 mg/L SST, seta indica os ionócitos.

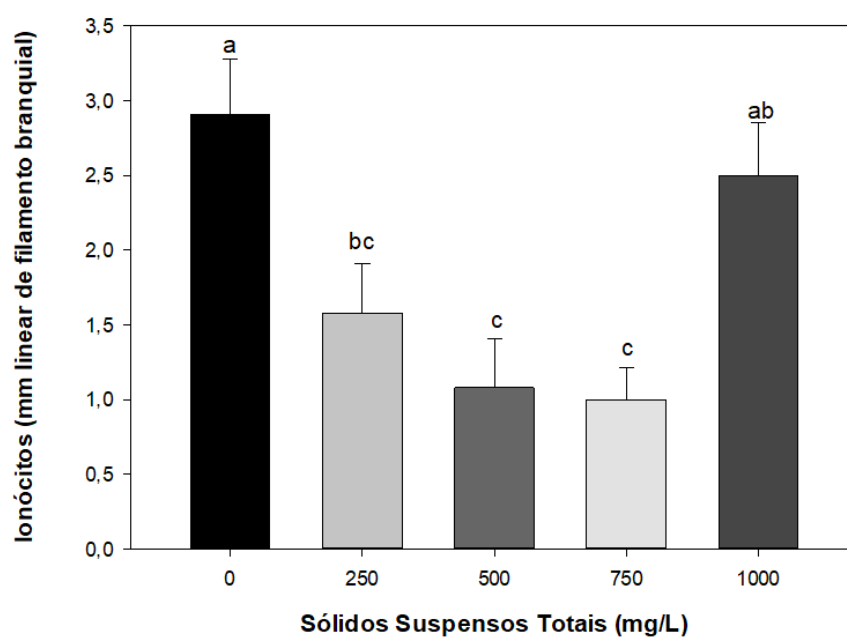


Figura 15: Contagem de ionócitos nas brânquias de juvenis de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

TABELA 2: Valores médios ($\pm$ erro padrão) das estruturas branquiais nos diferentes tratamentos durante o cultivo do *P. mesopotamicus* em sistema BFT. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

ESTRUTURAS BRANQUIAIS	TRATAMENTOS (mg/L SST)				
	0	250	500	750	1000
Altura do epitélio (μm)	17,8 $\pm$ 0,74 ^a	18,35 $\pm$ 0,59 ^a	18,24 $\pm$ 0,65 ^a	16,75 $\pm$ 0,70 ^a	19,53 $\pm$ 0,58 ^a
Espessura das lamelas (μm)	20,55 $\pm$ 0,42 ^a	17,75 $\pm$ 0,39 ^a	15,33 $\pm$ 0,32 ^a	20,82 $\pm$ 0,40 ^a	22,85 $\pm$ 0,53 ^a
Espessura entre lamelas (μm)	13,64 $\pm$ 0,29 ^b	21,53 $\pm$ 0,45 ^a	22,04 $\pm$ 0,35 ^a	17,00 $\pm$ 0,29 ^{ab}	13,00 $\pm$ 0,31 ^b

3.4. ANÁLISE DE MICRORGANISMOS

A quantificação das bactérias cocoides livres, no início e final do experimento, não apresentaram diferenças significativas nas diferentes concentrações de SST. Entretanto, podemos observar que houve uma abundância significativa maior no período final, nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L em relação as demais concentrações (Figura 16).

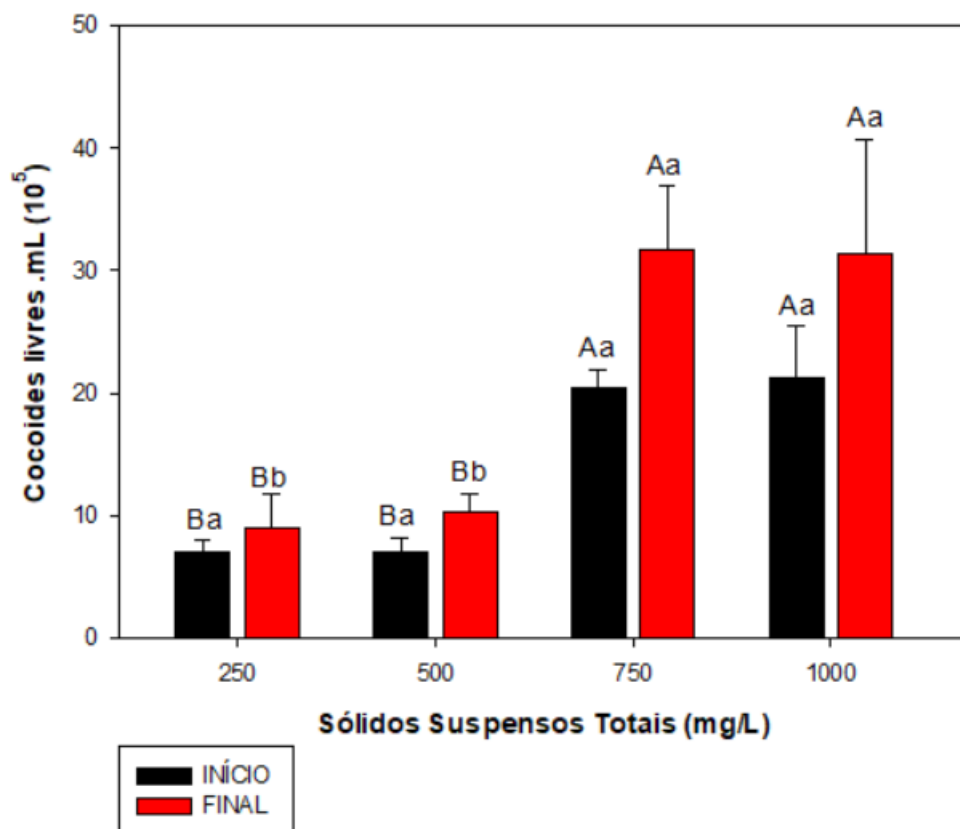


Figura 16: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de cocoides livres no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

No que se refere as cocoides aderidas nas concentrações de 250, 500 e 1000 mg SST/L a abundância não apresentou diferença significativa no início e fim do período experimental. A concentração de 750 mg SST/L apresentou diferença significativa, ocorrendo um aumento da abundância no final do experimento. Entretanto, a maior concentração de cocoides aderidas ocorreu na concentração de 1000 mg SST/L (Figura 17).

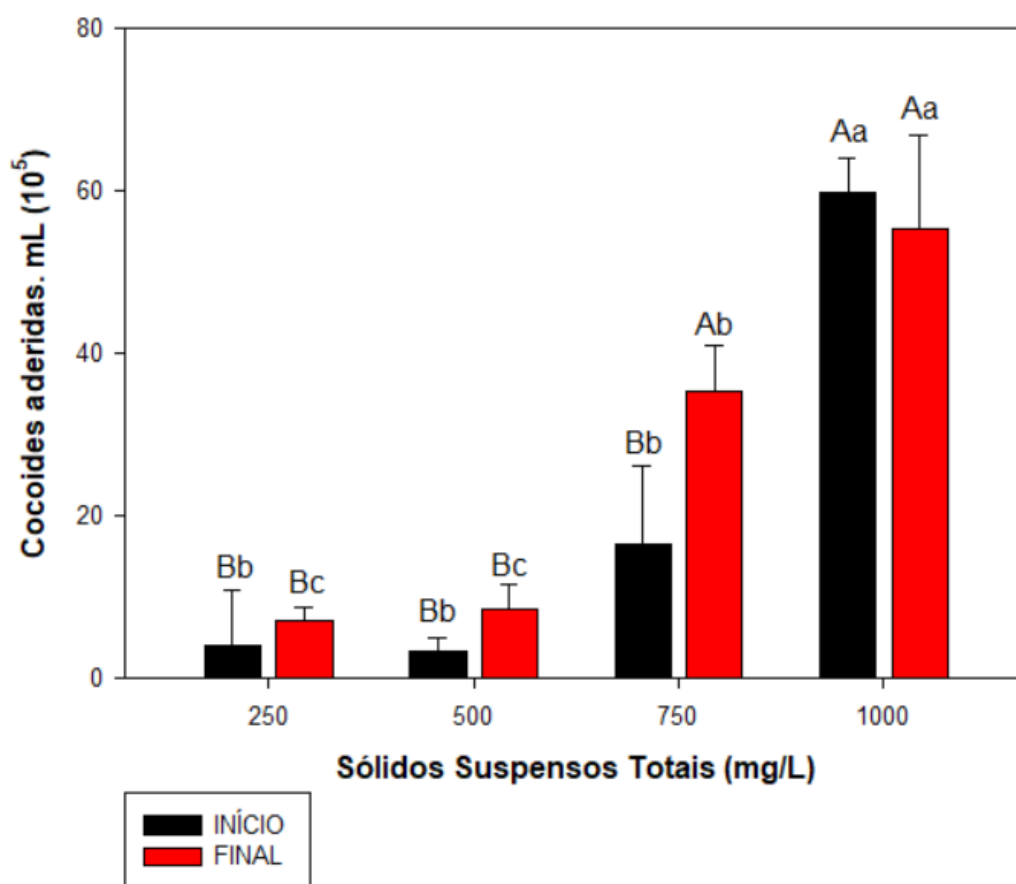


Figura 17: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de cocoides aderidas no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa em relação as bactérias filamentosas aderidas, no que diz respeito ao início e final do período experimental nas diferentes concentrações de SST. Contudo, essas bactérias, apresentaram uma maior quantificação no período final da concentração de 1000 mg SST/L, em relação as demais concentrações no mesmo período (Figura 18).

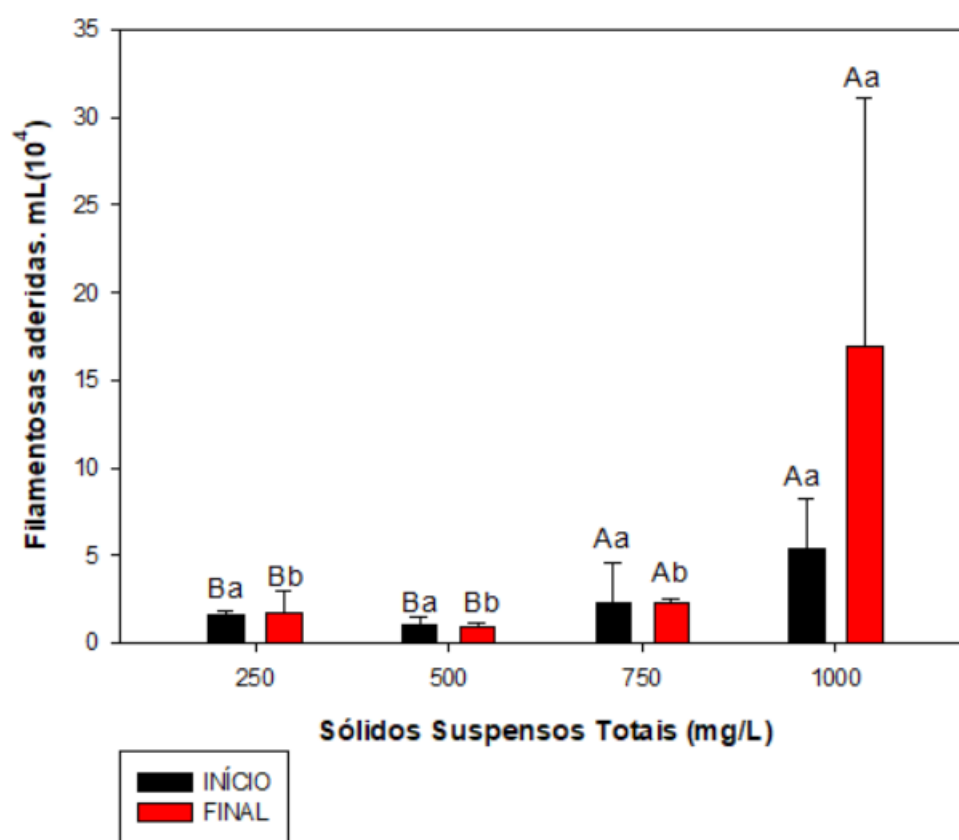


Figura 18: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de filamentosas aderidas no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

As bactérias filamentosas livres nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, apresentaram diferença significativa, tendo maior abundância destas bactérias ao final

do período experimental. Nas concentrações de 250 e 500 mg SST/L observamos que a abundância foi igual durante início e fim (Figura 19).

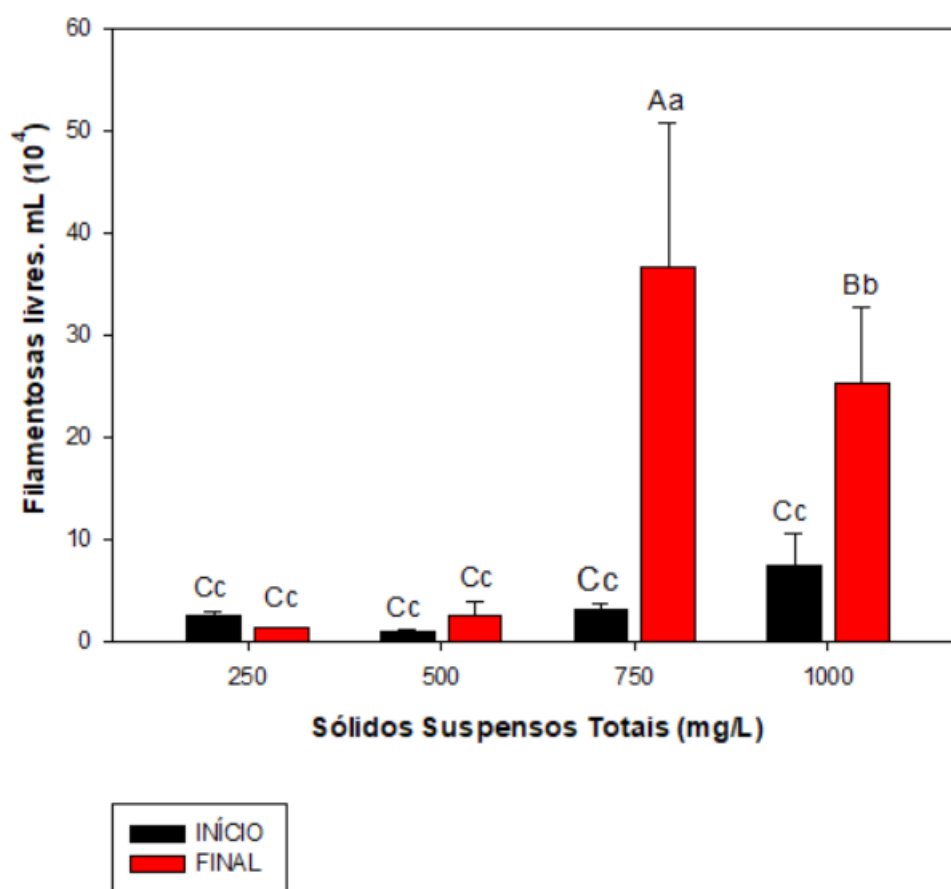


Figura 19: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de filamentosas livres no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

Com relação aos bacilos, não ocorreu diferença entre início e final, dentro de cada concentração, entretanto as concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, apresentaram quantificações significativamente maiores em relação as demais concentrações ao final do período experimental (Figura 20).

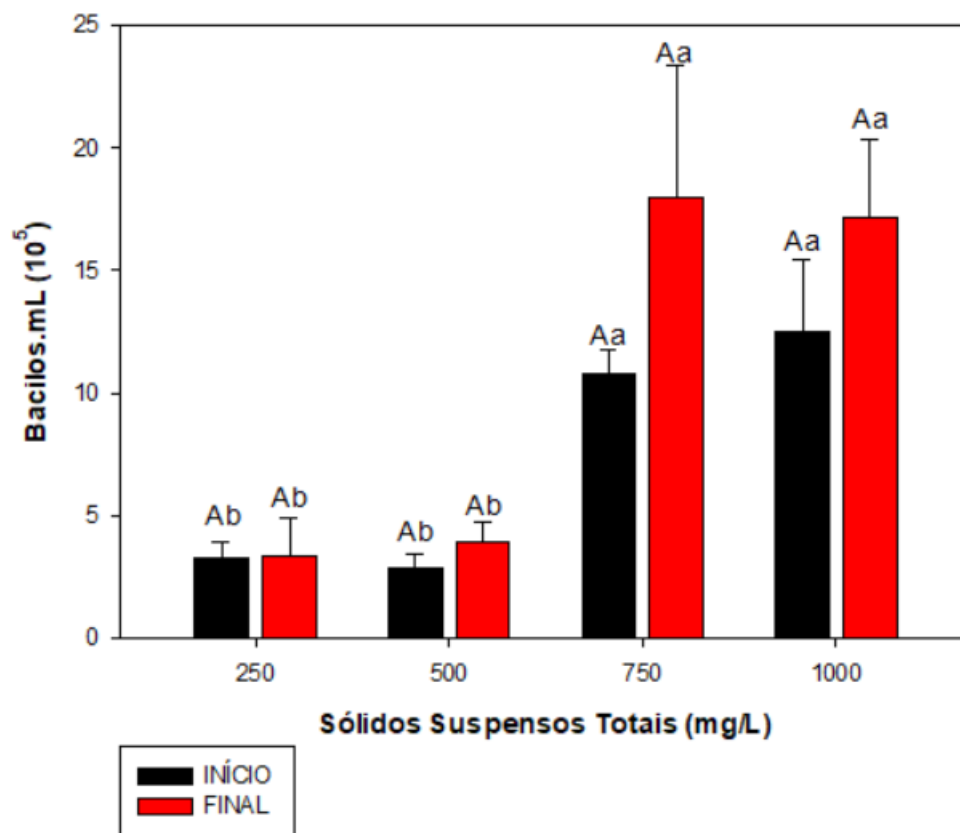


Figura 20: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de bacilos no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

A abundância dos vibrios não apresentou diferenças significativas (Figura 21).

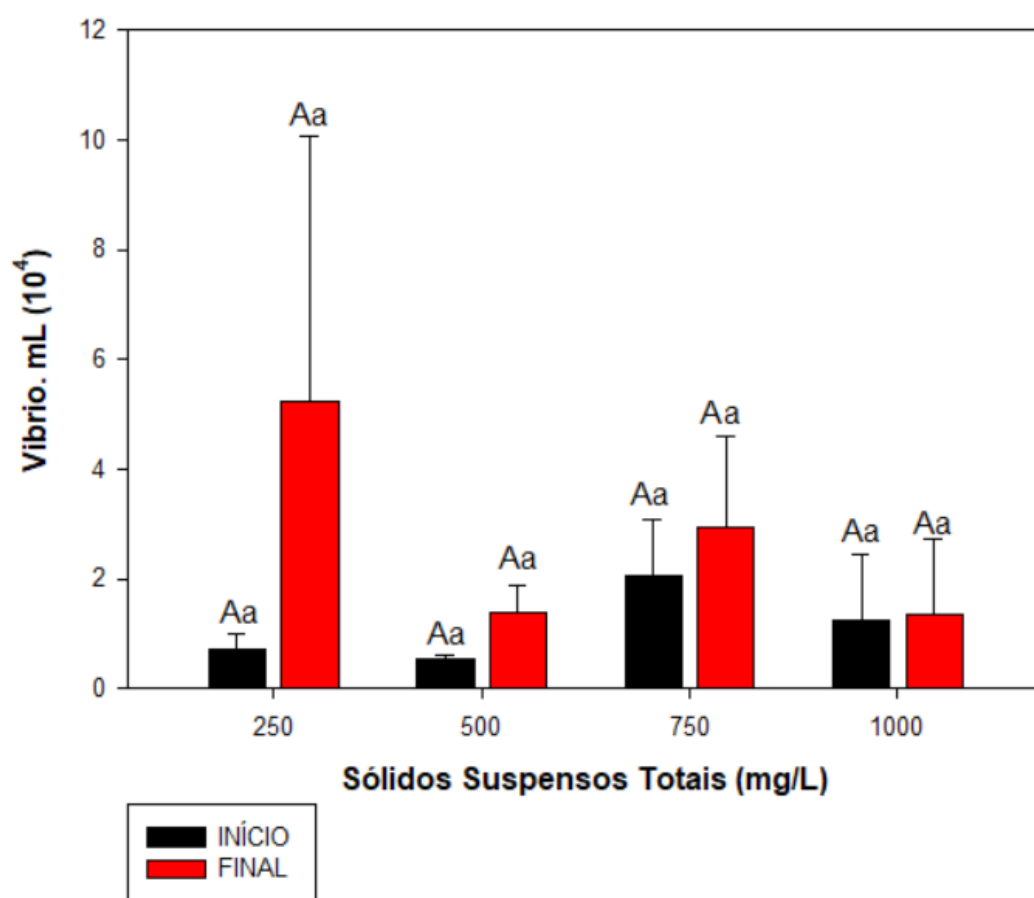


Figura 21: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de vibrio no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

As figuras de 22 a 24 apresentam fotomicrografias das bactérias observadas.

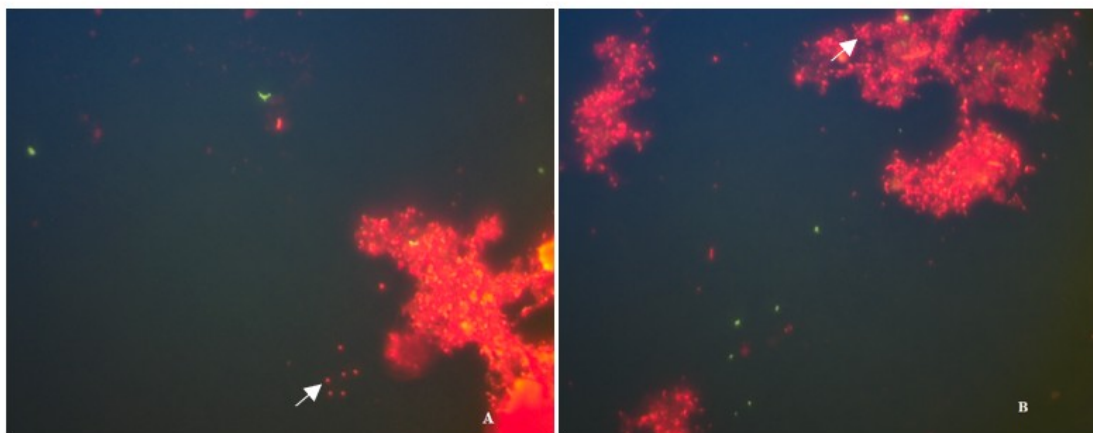


Figura 22: Abundância de bactérias no floco microbiano (A) cocoides livres e (B) cocoides aderidas com aumento de 1000x (Fonte: Arquivo pessoal).

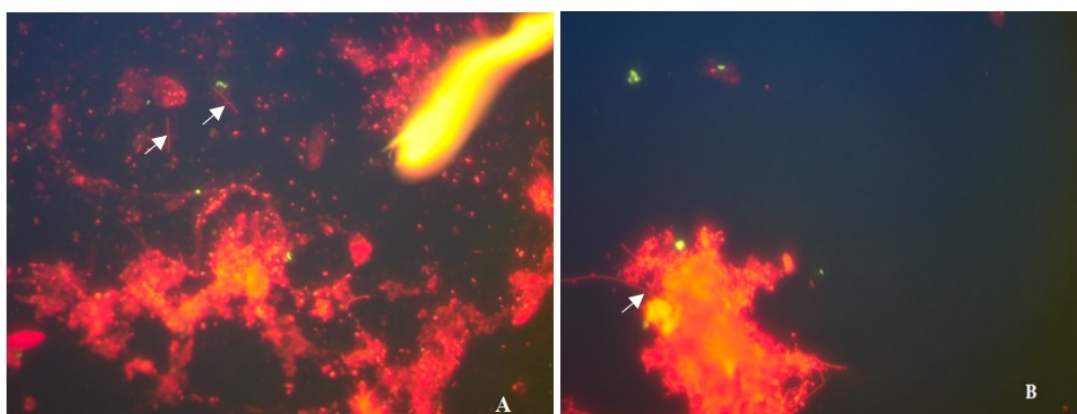


Figura 23: Abundância de bactérias no floco microbiano (A) filamentosas livres e (B) filamentosas aderidas com aumento de 1000x (Fonte: Arquivo pessoal).

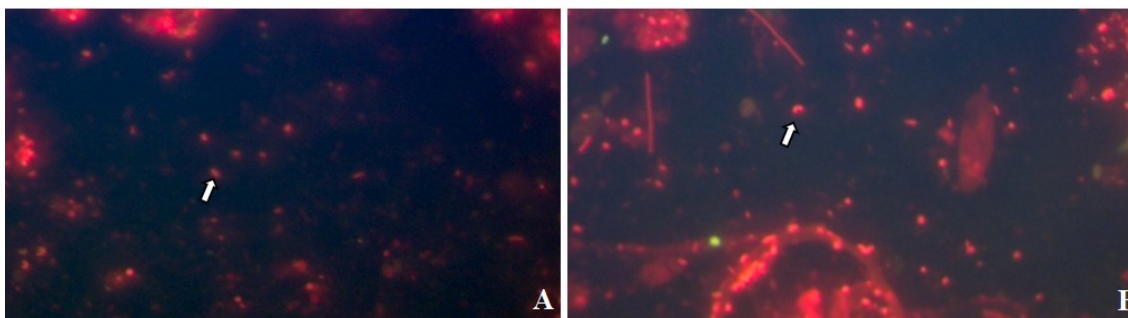


Figura 24: Abundância de bactérias no floco microbiano (A) bacilos e (B) vibrios com aumento de 1000x (Fonte: Arquivo pessoal).

A quantificação dos protozoários, flagelados não apresentou diferenças significativas (Figura 25).

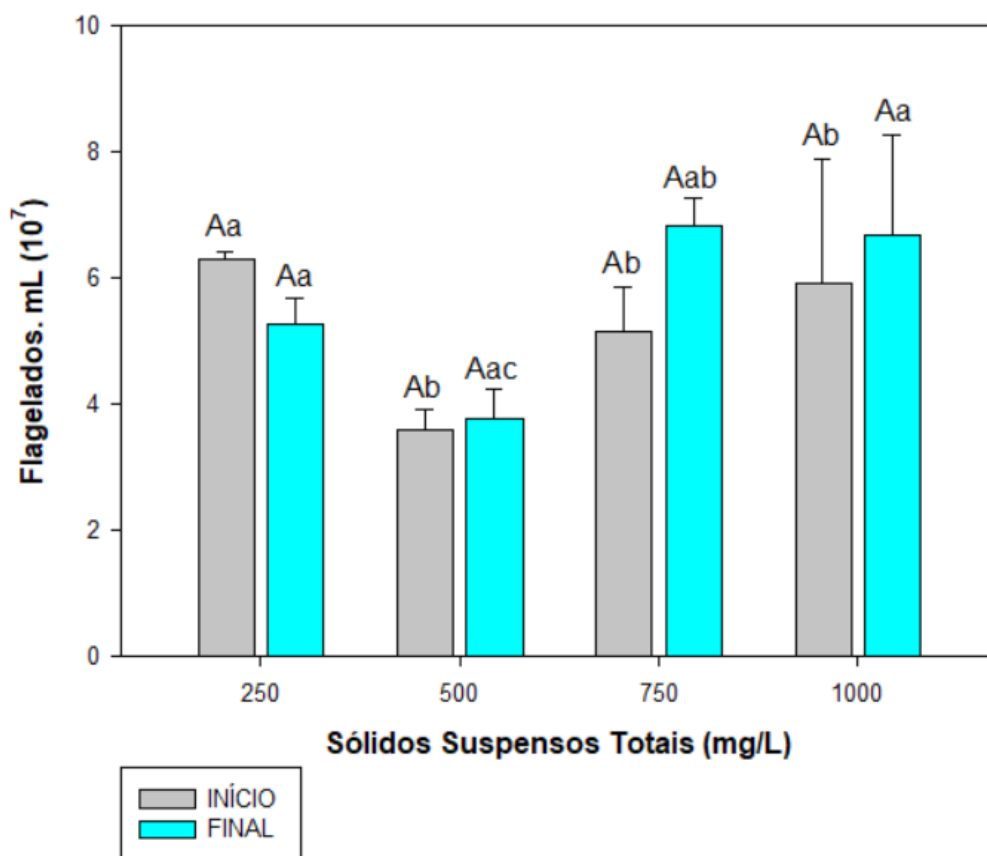


Figura 25: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de flagelados no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

A quantificação dos ciliados apresentou diferença significativa nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, onde houve um aumento destes organismos no período final em relação ao inicial. Nestas mesmas concentrações também houve um aumento significativo dos ciliados, no final do período do experimento, relacionados as demais concentrações no mesmo período (Figura 26).

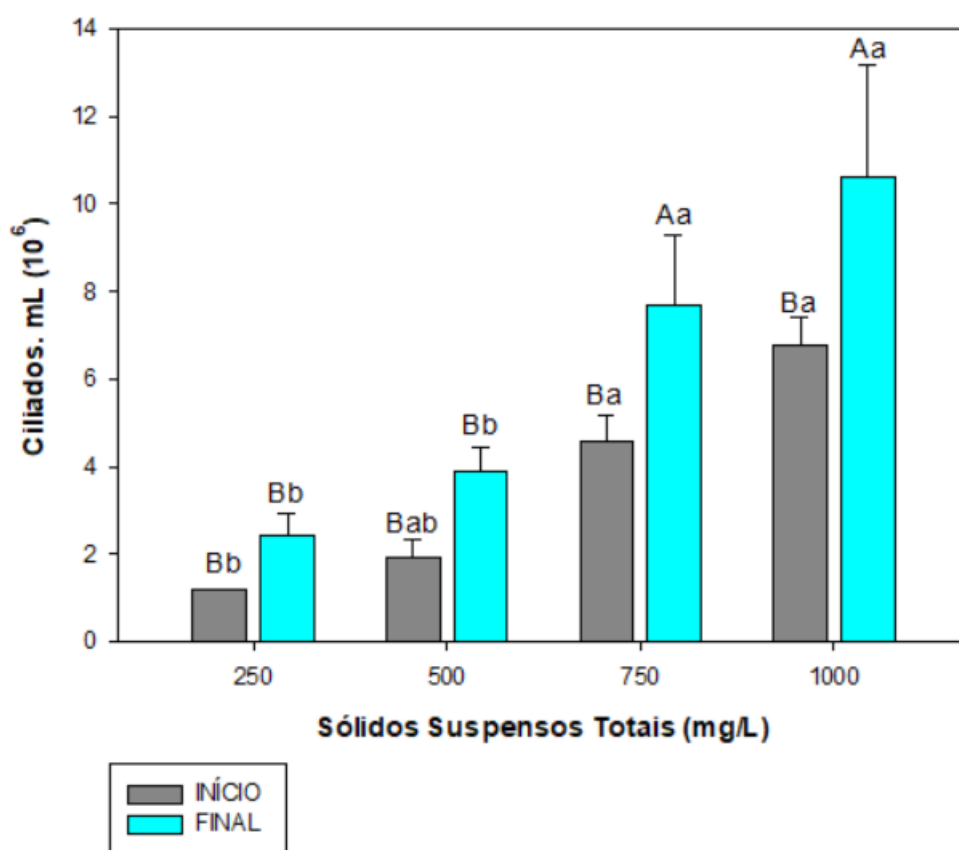


Figura 26: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de ciliados no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

Para os rotíferos, apenas no tratamento de 500 mg SST/L não foi encontrado a presença desses organismos, nos demais tratamentos aconteceu uma diminuição da abundância entre o início e fim do experimento (Figura 27).

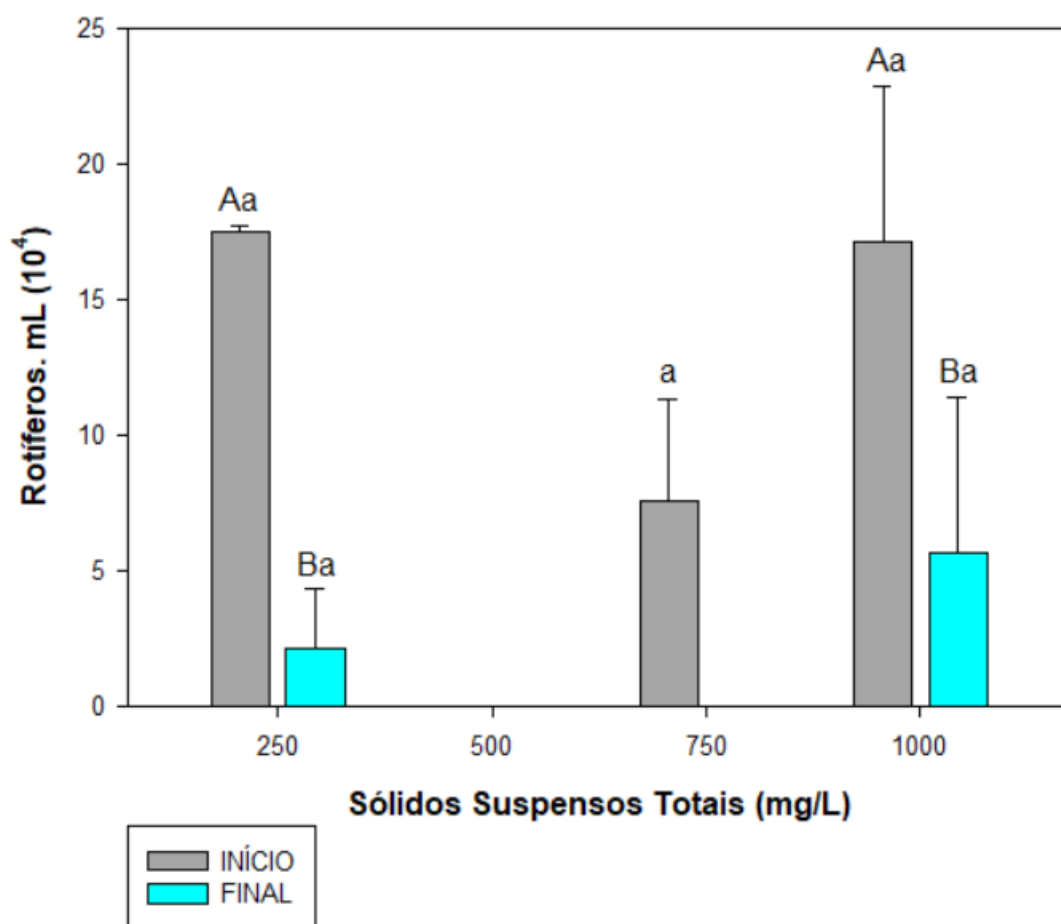


Figura 27: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de rotíferos no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

As microalgas apresentaram uma redução significativa de sua abundância, apenas na concentração de 1000 mg SST/L, entre os diferentes períodos experimentais (Figura 28).

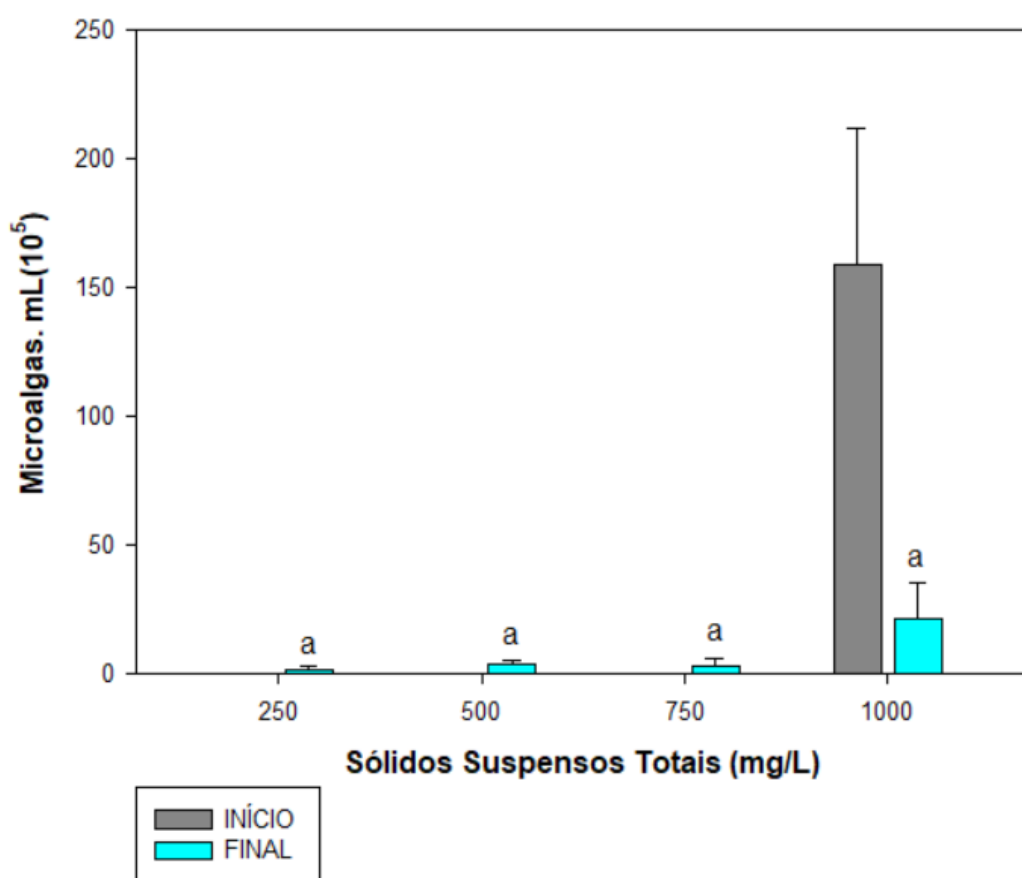


Figura 28: Valores médios ($\pm$ erro padrão) de microalgas no cultivo de pacu mantidos em diferentes concentrações de SST. Diferentes letras maiúsculas diferentes significam diferenças entre o mesmo tratamento e entre os períodos e letras minúsculas diferentes significam diferenças entre diferentes tratamentos no mesmo período ($p < 0,05$).

E por último, não houve diferença significativa para o grupo dos nematóides durante o experimento. É importante salientar que na concentração de 1000 mg SST/L não foi encontrado a presença desses organismos, nos tratamentos de 250 e 750 mg SST/L só ocorreu a presença no início do experimento e no tratamento de 500 mg SST/L apenas no final.

As figuras de 29 a 30 apresentam fotografias dos protozoários e demais grupos observados

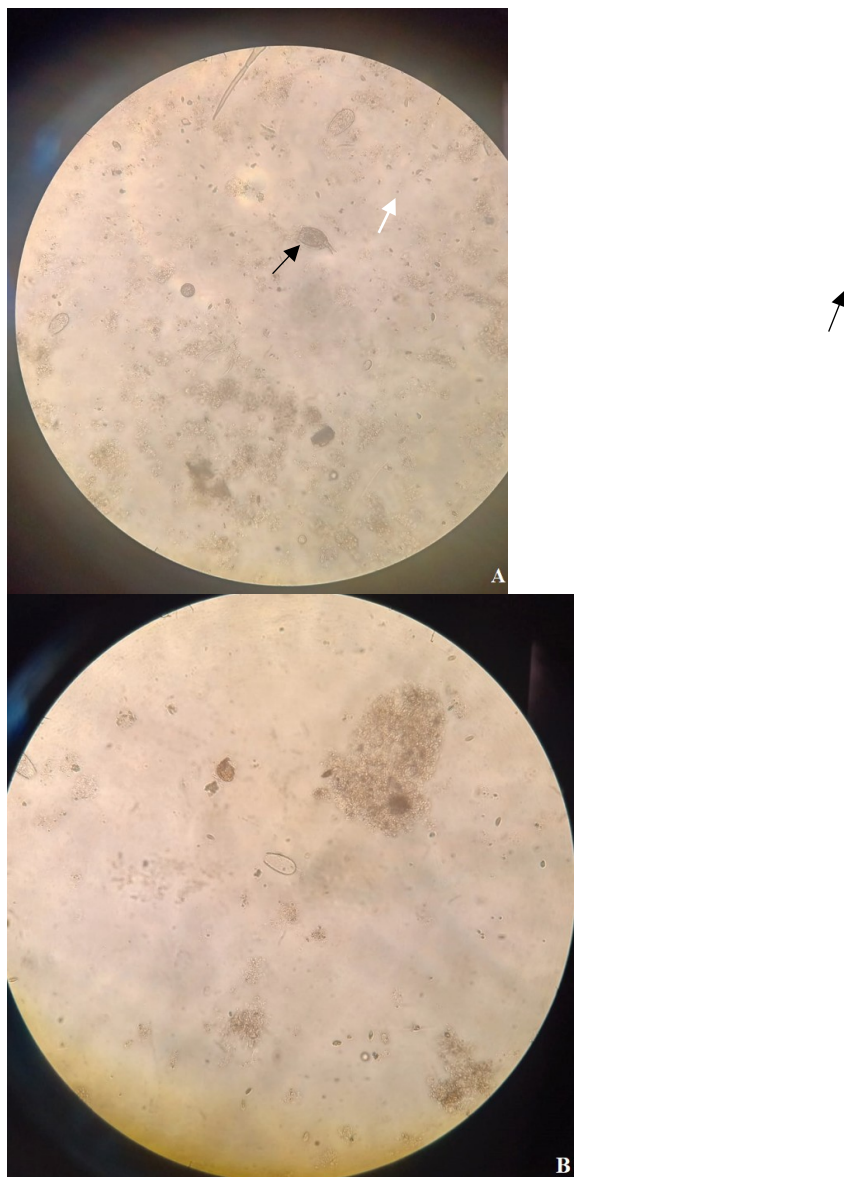


Figura 29: Fotografias de (A) flagelados (seta branca) e rotífero (seta preta) e (B) ciliados presentes no cultivo de pacu em BFT com aumento de 20X (Fonte: Arquivo pessoal).

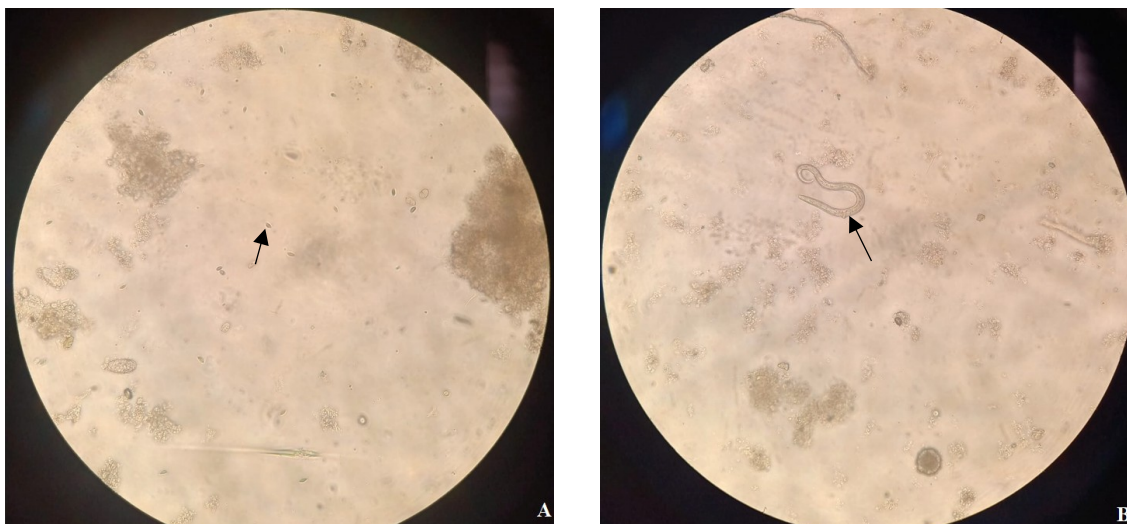


Figura 30: Fotografias de (A) microalgas e (B) nematóides presentes no cultivo de pacu em BFT com aumento de 20X (Fonte: Arquivo pessoal).

Além desses grupos de microrganismos, também foram encontrados exemplares de dáfnias (Figura 31).



Figura 31: Fotografias de dáfnias presentes no cultivo de pacu em BFT com aumento de 20 X (Fonte: Arquivo pessoal).

4. DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade da água permaneceram, ao longo do experimento, dentro dos níveis ideais para o pacu. Entretanto, a dureza teve um aumento com o aumento das concentrações de SST.

Referente aos resultados de alcalinidade, o que pode ter acontecido foi que nos tratamentos com sistema BFT, ocorreu a presença principalmente de bactérias heterotróficas, onde realizam o consumo de carbono orgânico e nitrogênio inorgânico (Avnimelech, 1999). Devido a isso, não foi priorizado o consumo de carbono inorgânico, por outro lado, no sistema de recirculação (controle), houve a presença predominante de bactérias nitrificantes, e essas bactérias consomem carbono inorgânico (Avnimelech, 2015), o que provavelmente explica a menor concentração de alcalinidade no sistema de recirculação e maiores concentrações no sistema BFT. Contudo, a alcalinidade e dureza permaneceram em níveis desejáveis para o pacu.

A atividade da SOD em 1000 mg SST/L (cérebro e brânquias) e da CAT em 750 e 1000 mg SST/L (cérebro e fígado) apresentaram-se elevadas. Contudo, no fígado no controle a atividade da SOD foi menor quando comparado ao sistema BFT. O aumento da atividade da SOD e CAT poderia estar relacionado a um processo de resposta a uma

maior demanda de ERO, que poderia ter ocorrido em razão da exposição a concentrações de SST. Ambas as enzimas são muito importantes, pois são uma das principais enzimas que atuam na defesa antioxidante eliminando as ERO (Kovacik, 2017).

Outra enzima que se destaca é a GST, a qual apresentou maior atividade nos diferentes órgãos nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, exceto nas brânquias onde a maior atividade foi apenas em 750 mg SST/L. A atividade elevada da GST indica que há um alto potencial de detoxificação, especialmente nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, principalmente no fígado. O fígado é um órgão que possui diversas funções, tal como detoxificação, regulação do metabolismo de nutrientes, processos de digestão (Rust, 2003) e, também as células hepáticas possuem maior competência na degradação de ERO e xenobióticos (Ekambaram et al., 2014). Nas brânquias, a maior atividade da GST, na concentração de 750 mg SST/L, seguido da diminuição em 1000 mg SST/L pode ser explicado devido as alterações branquiais que ocorreram, como a diminuição da espessura entre as lamelas, que induziram a uma diminuição na captação de oxigênio dissolvido.

Além disso, a relação entre a atividade da GST com GSH nos demonstrou que a GSH pode ser consumida via ação da GST (Droge, 2002), quando a GST realiza a conjugação da GSH com eletrófilos para diminuir a toxicidade de xenobióticos. E ainda de acordo com isso, a GSH pode ter ação direta interceptando as ERO. Dessa forma, podemos observar que no tratamento controle, no cérebro, a GSH pode ter atuado eliminando as ERO, já que a atividade da GST não se demonstrou elevada. Entretanto no fígado e brânquias, é possível que a GST tenha realizado a conjugação com GSH para continuar atuando nesse ciclo.

A concentração de 250 mg SST/L apresentou uma resposta inversa em relação ao controle. No cérebro, a GSH pode ter sido conjugada pela GST e no fígado e brânquias, é provável que GSH tenha atuado sozinha no combate as ERO. Contudo, em 500 mg SST/L, independente do órgão, a GSH realizou a interceptação das ERO, onde as variações podem ser explicadas também pela síntese da própria GSH. Na concentração de 750 mg SST/L a situação mudou, e o que ocorreu foi que aconteceu a conjugação da GSH pela GST, e na concentração de 1000 mg SST/L cada órgão teve uma resposta diferente, onde no cérebro não ocorreu diferença, a menor concentração no fígado ocorreu em 1000 mg SST/L e nas brânquias em 750 mg SST/L. De acordo com isso, podemos verificar que situações de estresse severas podem levar a baixa concentração

de GSH, indicando que o sistema antioxidante sofreu danos e que altas concentrações de SST junto com o tempo de exposição podem levar ao consumo de estoque de GST, por isso GST vai realizar a conjugação com GSH, para continuar atuando.

Com relação aos danos oxidativos, as diferentes concentrações de SST, não induziram danos às proteínas, entretanto ocorreu alteração na peroxidação lipídica. No fígado, o controle apresentou maiores níveis de LPO e, nesse caso, o sistema de bioflocos proporcionou uma redução da peroxidação lipídica, estimulando o organismo a desenvolver maior capacidade de controlar as ERO, proporcionando uma melhora da saúde e/ou do estado imune dos animais (Mansour & Esteban, 2017; Yu et al., 2019). Além disso, menores danos lipídicos no fígado indicam uma maior detoxificação dos metabólitos resultantes da LPO, como por exemplo, a ação da enzima GST (Da Rocha et al., 2009). O cérebro é considerado um dos órgãos mais susceptíveis ao ataque por um radical livre, devido a sua necessidade elevada de consumo de oxigênio, elevada concentração de PUFA e por possuir um déficit no sistema antioxidante (Sahin & Gumuslu, 2004). Porém nosso estudo evidenciou que no cérebro não ocorreu alteração na lipoperoxidação. Entretanto, as brânquias, apresentaram maior e menor dano lipídico nas concentrações de 750 mg SST/L e 1000 mg SST/L, respectivamente. Estes resultados demonstram que ocorreram danos nas brânquias, prejudicando a captação de oxigênio e a troca gasosa. Dessa forma, os animais poderiam ter apresentado um quadro de hipóxia funcional, incidindo negativamente sobre a formação de ERO, e devido a isso inibiu a lipoperoxidação, já que não haviam radicais livres suficiente para iniciar o processo da LPO.

De uma forma geral, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes nos permite afirmar que o organismo conseguiu manter seu estado de homeostase, diminuindo a formação de ERO e assim minimizar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo (Parrilla-Taylor, 2013). Para que isso ocorresse, podemos considerar que os bioflocos apresentam na sua constituição antioxidantes, como os carotenóides e as vitaminas lipossolúveis. Assim, em nosso estudo, ficou evidente que o sistema BFT auxiliou na capacidade antioxidante dos animais (Ju et al., 2008).

Por outro lado, em dois estudos com tilápia, avaliando diferentes faixas de pH (Martins et al., 2019) e diferentes compostos alcalinizantes (Martins et al., 2016), onde a faixa de SST variou de 485-548 mg/L e 501-707 mg/L, respectivamente, observou-se que não houve diferença em relação a CAT, SOD, ACAP e LPO no fígado e brânquias. Em outro estudo, com tilápia também, onde avaliaram diferentes concentrações da

relação C:N (Dilmi et al., 2022), o SST ficou em uma faixa de 465-750 mg/L, porém não houve diferença no fígado, na CAT e SOD. Já em um trabalho comparando o sistema BFT com o RAS (Martins et al., 2015), em *Litopenaeus vannamei*, não ocorreu diferença nas brânquias em relação a GST, ACAP e TBARS, porém a quantidade de GSH foi maior no RAS.

Na criação em sistema BFT, o constante contato das brânquias com elevadas concentrações de SST, pode levar a alterações na morfologia branquial, e possivelmente a um estresse respiratório e problemas com a excreção da amônia, principalmente, causando ao animal uma intoxicação por esta substância (Randall & Wright, 1987). Sendo assim, devemos considerar que as brânquias estão em contato contínuo com o meio para a realização de processos fisiológicos, por isto são um dos primeiros órgãos a demonstrar se houve alguma alteração no meio de cultivo (Negreiros & Tavares-Dias, 2019). O excesso de SST também pode causar o levantamento do epitélio, o que pode resultar em edema lamelar, ocasionando a diminuição do espaço entre as lamelas, levando a uma situação prejudicial para ocorrência das trocas gasosas (Au et al., 2004). Em nosso estudo, observamos que a espessura entre as lamelas foi menor na concentração de 1000 mg SST/L e no controle, mesmo não tendo a presença de SST.

Os ionócitos (ou comumente conhecidos como células de cloreto e/ou células ricas em mitocôndrias) estão localizados na base das lamelas e no epitélio dos filamentos e atuam no processo de osmorregulação dos peixes (Hirose et al., 2003; Dymowska et al., 2012). De acordo com Perry (1989) a proliferação dos ionócitos é um mecanismo que o animal utiliza para aumentar a capacidade do epitélio branquial no processo de transporte iônico. No nosso estudo, observamos que na concentração de 1000 mg SST/L e no controle, ocorreu maior contagem de ionócitos, sugerindo que altas concentrações de SST prejudiquem o transporte de íons. Além disso, essa proliferação ocorrida pode prejudicar a absorção do O₂ da água e consequente difusão para o sangue, pois o espaço entre a barreira água-sangue pode ser afetado (Perry, 1993).

Hatem et al. (2013) em seu estudo com tilápia no sistema BFT, onde a faixa de SST variou de 220 a 510 mg SST/L, observaram edemas gerados pela presença dos sólidos, levando a uma situação de redução do espaço entre as lamelas, consequentemente levando a um quadro de estresse respiratório (Strzyzewska et al., 2016). De acordo com isso, os mesmos autores destacaram que as concentrações de SST, para esta espécie, devem permanecer na faixa de 220 a 250 mg SST/L, para evitar/reduzir danos nas brânquias. Angeles-Escobar et al. (2021) observou em seu

trabalho com pirapitinga, que no seu controle (sem sólidos) houve hiperplasia do filamento branquial, fusão completa das lamelas, espessamento dos vasos sanguíneos de filamentos e lamelas. Neste mesmo trabalho também ficou evidenciado que as concentrações na faixa de 200-300 mg SST/L e 400-600 mg SST/L apresentaram hiperplasia leve, fusão das lamelas, espessamento dos filamentos e das lamelas. Estas evidências corroboram com nossos resultados pela observação da ocorrência da diminuição da espessura entre as lamelas no controle e em 1000 mg SST/L.

Os microrganismos são de extrema importância nos sistemas utilizados na Aquicultura. Estão ligados a produção primária, fonte de alimento de ótima qualidade para outros organismos, realização de ciclagem de nutrientes e melhora na qualidade da água (Avnimelech, 2012). No sistema BFT, a propagação de microrganismos é dada pela constante aeração e acréscimo de fontes de carbono. Então, juntando os microrganismos com a matéria orgânica em suspensão temos a origem dos bioflocos (Haslun et al., 2012).

Ferreira (2008) observou em seu estudo que bactérias cocoides podem ter uma relação com as bactérias formadoras dos bioflocos, podendo haver uma relação entre a abundância dessas bactérias e a quantidade de agregados no sistema, o que corroboraria com nossos resultados. Em outro estudo, Anesio et al. (2003) destacam que o grupo de bactérias, as livres e aderidas, aparecem no sistema em momentos distintos, onde a quantidade de carbono orgânico disponível no meio interfere na organização desses microrganismos. Assim como as bactérias cocoides, as filamentosas também apresentaram maior abundância nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, visto que esses tratamentos receberam maior quantidade de carbono orgânico (melaço) ao longo do experimento.

Bactérias do gênero *Bacillus* podem ocorrer no sistema BFT através da excreção do trato gastrointestinal dos animais, podendo haver aumento dessas bactérias em contato com a água após excreção (Gutiérrez et al., 2016). Os bacilos tem função probiótica, atuando no sistema imune dos animais (Kuebutornye et al., 2019). Além disso, podem auxiliar no controle de espécies patogênicas de organismos, como o vibrio, sendo as bactérias uma das primeiras a atuarem, pois são consideradas como uma das primeiras a estarem no nível trófico do sistema. Assim o sistema BFT pode atuar, através da colônia destas bactérias com um efeito probiótico (Emerenciano et al., 2013). Isto está de acordo com o que ocorreu em nosso estudo, onde os vibrios

mantiveram-se constantes ao longo do tempo, o que pode significar que os bacilos controlaram seu desenvolvimento.

Outro grupo que apresenta boa presença no sistema BFT são os protozoários. Estes microrganismos são considerados fontes de incremento nutricional, pois possuem uma alta relação entre proteína-energia, sendo competentes ao que se refere a síntese de ácidos graxos poliinsaturados, onde se alimentam de bactérias (Zhukova & Kharlamenko, 1999). Dentro deste grupo, os ciliados podem ser usados como indicadores da qualidade da água (Decamp et al., 1999), participam da alimentação dos organismos cultivados e ainda ajudam no controle de espécies patogênicas (Thompson et al., 1999), podendo também ter atuado com os bacilos no controle do vibrio. O uso de carbono no cultivo propicia um aumento na comunidade de protozoários (Thompson et al., 1999), o que pode ser um dos motivos da maior concentração de ciliados nas concentrações de 750 e 1000 mg SST/L, assim como foi observado para as bactérias.

Em nosso estudo, não ocorreu diferença na abundância dos flagelados. Porém em estudo de Reis et al. (2019) e Ferreira (2008) estes autores observaram uma concentração inversa nas concentrações de flagelados e ciliados, isto é, quando a abundância de flagelados diminuiu, a dos ciliados aumentou.

A presença de rotíferos pode estar ligada aos flocos microbianos (Monroy-Dosta et al., 2013), pois estes microrganismos realizam o consumo de bactérias e algas, secretam muco e ajudam na aglomeração da matéria orgânica, formando novos flocos microbianos (Pérez, 2010). Entretanto, observamos em nosso trabalho, que ocorreu um decréscimo na sua abundância entre o período inicial e final, uma hipótese é que ocorreu disputa de um de seus principais alimentos (microalgas) e com isso seu crescimento foi prejudicado.

Outro grupo de microrganismos observado foram o dos nematóides, os quais no sistema BFT servem de alimento para os ciliados (Ray et al., 2012). Em nosso estudo observamos uma baixa abundância desses microrganismos, já que basicamente nas diferentes concentrações e/ou períodos do experimento não houve a presença dos nematóides, e devido a isso, ocorreu o aumento dos ciliados.

Em geral, as microalgas são as primeiras a se desenvolverem, servindo como alimento para o zooplâncton e contribuindo para o desenvolvimento das bactérias (Wei et al., 2016). Porém sua presença ocorreu praticamente apenas no período final do nosso estudo, o que pode significar que a microalga foi bastante consumida pelos outros microrganismos, como as dáfnias, onde mesmo que a sua abundância não tenha sido

estimada, foi verificada a sua presença. Os protozoários são outro grupo que consomem as microalgas (Nagano & Decamp, 2004).

Ciliados, flagelados e bactérias normalmente se desenvolvem em meios que possuem concentrações elevadas de carbono orgânico (Azam et al., 1983). De acordo com isso, a maior quantidade de matéria orgânica, no sistema BFT, pode aumentar a abundância dos organismos (Milstein, 1992) já que tem mais disponibilidade de nutrientes. De modo geral, observamos que houve uma relação direta entre a abundância dos microrganismos e a concentração de SST, no qual, a mesma observação foi relatada em outros trabalhos (Ferreira, 2008; Silveira, 2017). Podemos definir assim, que no sistema BFT em diferentes estudos, as concentrações das diferentes comunidades de microrganismos apresentam-se variáveis, podendo ocorrer uma maior ou menor abundância devido a composição do floco e suas características.

5. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados, podemos concluir que a criação do pacu em sistema BFT com relação aos parâmetros de estresse oxidativo e análises morfológicas, é indicada a concentração de até 500 mg SST/L, pois a partir de 750 mg SST/L ocorrem alterações nas defesas antioxidantes, danos lipídicos nas brânquias e alterações nas estruturas branquiais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adad, J. M. T. (1982). Controle químico de qualidade da água. Guanabara Press, Rio de Janeiro, 203p.
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro, Meth Enzymol; 105: 121-126.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. R. L., Yunes, J. S., & Monserrat J. M. (2009). A method to measure total antioxidante capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. Sc. Total Environ. 407, 2115-2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Anesio, A. M., Abreu, P. C., & Biddanda, B. A. (2003). The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 56(2), 197-201. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(02\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(02)00152-X).
- Angeles-Escobar, B. E., da Silva, S. M. B. C., & Severi, W. (2021). Growth, red blood cells, and gill alterations of red pacu (*Piaractus brachypomus*) fingerlings by chronic exposure to different total suspended solids in biofloc. Journal of the World Aquaculture Society, 1–17.
- Au, D. W. T., Pollino, C. A., Wu, R. S. S., Shin, P. K. S., Lau, S. T. F., & Tang, J. Y. M. (2004). Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. Marine ecology progress series, 266, 255-264.

- Avnimelech, Y. (1999) Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227–235.
- Avnimelech, Y. (2012). Y. Avnimelech (Ed.), *Biofloc Technology - A Practical Guide Book* (2nd ed.). Baton Rouge, LA: The World Aquaculture Society
- Avnimelech, Y. (2015). *Biofloc technology – A practical guide book*, 3rd ed: The World Aquaculture Society.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. J. M. E. P. S. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 10(3), 257-263.
- Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (2014). *Manual de qualidade da água para aquicultura*.
- Chowdhury, S., & Saikia, S. K. (2020). Oxidative Stress in Fish: A Review. *Journal of Scientific Research*, 12(1).
- Colt, J. (2002). List of spreadsheets prepared as a complement to the book fish hatchery management. In: Wedemeyer, G. A. (ed.). *Am. Fish. Soc. Pub.*, Bethesda, 91-186.
- Da Rocha, A. M., De Freitas, D. S., Burns, M., Vieira, J. P., De La Torre, F. R., & Monserrat, J. M. (2009). Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(4), 512-520.
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4), 125-137.
- Decamp, O., Warren, A., & Sanchez, R. (1999). The role of ciliated protozoa in subsurface flow wetlands and their potential as bioindicators. *Water Science and Technology*, 40(3), 91-98. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00444-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00444-8).
- Dilmi, A., Refes, W., Meknachi, A. (2022). Effects of C/N Ratio on Water Quality, Growth Performance, Digestive Enzyme Activity and Antioxidant Status of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in Biofloc Based Culture System. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1), TRJFAS19754. <http://doi.org/10.4194/TRJFAS19754>
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82 (1),47-95.
- Dutordoir, M.R., & Bates, D. A.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Dymowska, A. K., Hwang, P. P., & Goss, G. G. (2012). Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. *Respiratory physiology & neurobiology*, 184(3), 282-292.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21st edition, Amer. Public. Health Assn., 1325 p.
- Ekambaram, P., Narayanan, M., & Jayachandran, T. (2014). Changes in oxidative stress and antioxidant status in stressed fish brain. *International Journal of Science and Research*, 3(5), 164-170.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., & Cuzon, G. (2013). Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *Biomass now-cultivation and utilization*, 12, 301-328.
- Ferreira, L., M., M., H. **Formação de flocos microbianos em cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e do camarão-branco *Litopenaeus vannamei***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, p.57. 2008.

- Gutiérrez, S. M., Dosta, M. D. C. M., Partida, A. H., Mejía, J. C., Rodríguez, G. A., & de Oca, M. (2016). Effect of two carbon sources in microbial abundance in a Biofloc culture system with *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Int. J. Fish. Aquat. Stud*, 4, 421-427.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139
- Hargreaves, J. A. (2013). Biofloc production systems for aquaculture (Vol. 4503, pp. 1-11). Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center.
- Haslun, J. A., Correia, E., Strychar, K., Morris, T., & Samocha, T. (2012). Characterization of bioflocs in a no water exchange super-intensive system for the production of food size pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Aquaculture*, 2(1), 29-38
- Hatem M. H., Abdelhay Y. B., Alayafi A. H. and Suloma A. (2013). Application of new strategies to reduce suspended solids in zero-exchange system: I. Histological alterations in the gills of *Nile tilapia*. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 9, n. 2, p. 1186-1192.
- Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y. (2003). Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 136, p.593-620.
- Hissin, P.; & Hilf, R. 1972. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, v. 74, n. 1, p. 214-226.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J., & Jasper, S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 33(5), 1225-1228.
- Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., & Dominy, W. (2008). Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. *Aquaculture nutrition*, 14(6), 533-543.
- Kovacik, A. (2017). Oxidative stress in fish induced by environmental pollutants. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 50(1), 121-125.
- Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Lu, Y. (2019). Uma revisão sobre a aplicação de *Bacillus* como probióticos na aquicultura. *Peixe Marisco Immunol.* 87, 820-828.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Mansour, A. T., & Esteban, M. A. (2017). Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.025>
- Martins G. B., da Rosa C. E., Tarouco F. M., Robaldo, R.B. (2019). Growth, water quality and oxidative stress of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in biofloc technology system at different pH. *Aquac Res.*00:1-10. <https://doi.org/10.1111/are.13975>
- Martins, Á. C. S., Flores, J. A., Porto, C., Wasielesky, W., & Monserrat, J. M. (2015). Antioxidant and oxidative damage responses in different organs of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) reared in a biofloc technology system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(4), 279-288.
- Martins, G. B., Tarouco, F., Rosa, C. E., Robaldo, R. B. (2016). The utilization of sodium bicarbonate, calcium carbonate or hydroxide in biofloc system: water quality, growth performance and oxidative stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquac.*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.09.046

- Milstein, A. (1992). Ecological aspects of fish species interactions in polyculture ponds. *Hydrobiologia*, 231(3), 177-186.
- Mirsa H. P., Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase *J.Biol. Chem.*, 247 (10), pp. 3170-3175
- Monroy-Dosta, M. D. C., Lara-Andrade, D., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., & Coelho-Emerenciano, M. G. (2013). Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48(3), 511-520.
- Nagano N, Decamp O (2004) Ingestion of a ciliated protozoa by first-feeding larval stage of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac Res* 35:516–518
- Negreiros, L. P., & Tavares-Dias, M. (2019). Parasites in farmed *Piaractus brachypomus* (Serrasalminae) in the state of acre, western Brazilian Amazonia. *Acta Amazonica*, 49, 294–298. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201900491>
- Oakes, K. D.; Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicol.*, 63, 447-463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)
- Parrilla-Taylor, D. P., Zenteno-Savín, T., & Magallón-Barajas, F. J. (2013). Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 380, 41-46.
- Pellegrin, L., Nitz, L. F., Pinto, D. D. S. B., Copatti, C. E., Wasielesky, W., & Garcia, L. 2022. Effects of suspended solids in the survival and haematological parameters of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) in a biofloc technology culture system. *Aquac. Res.*<https://doi.org/10.1111/are.15575>
- Pérez Aristizábal, J. D. (2010). Aplicación y evaluación de un reactor de contactores biológicos rotativos (RBC o biodiscos) a escala laboratorio como tratamiento de los lixiviados generados en el relleno sanitario de La Pradera (Master's thesis, Universidad de Medellín).
- Perry, S. F., Laurent, P. (1993). Environmental effects on fish gill structure and function: recente advances and future directions. In: Jensen, F., Rankin, C.(Eds.), *Fish Ecophysiology*. London, Chapman & Hall, p.231-264.
- Perry, S. F., Laurent, P. (1989). Adaptational responses of Rainbow trout of lowered external NaCl concentration: contribution of the branchial chloride cell. *Journal Experimental Biology*, v. 147, p.147-168.
- Pullela, S. V., Fernandes, C. F., Flick, G. J., Libey, G. S., Smith, S. A., & Coale, C. W. (2000). Quality comparison of aquacultured pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fillets with other aquacultured fish fillets using subjective and objective sensorial traits. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(1), 65-76. https://doi.org/10.1300/J030v09n01_06
- Randall, D.J. and Wright P.A. (1987). Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiol Biochem.*, 3: 107-120.
- Ray, A. Biofloc technology for super-intensive shrimp culture. In: AVNIMELECH, Y. *Biofloc Technology - a practical guide book*, 2 ed., The World Aquaculture Society, Louisiana: Baton Rouge, p. 167-188, 2012.
- Redding, J. M., Schreck, C. B., & Everest, F. H. (1987). Physiological effects on coho salmon and steelhead of exposure to suspended solids. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116(5), 737-744.
- Reis, W. G., Wasielesky Jr, W., Abreu, P. C., Brandão, H., & Krummenauer, D. (2019). Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT

system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. *Aquaculture*, 508, 19-29.

Ren, W., Li, L., Dong, S., Tian, X., & Xue, Y. (2019). Effects of C/N ratio and light on ammonia nitrogen uptake in *Litopenaeus vannamei* culture tanks. *Aquaculture*, 498, 123-131.

Rust, M.B. (2003). Nutritional Physiology. In: Halver, JE & RW Hardy. (Ed.). *Fish Nutrition*. Academic Press. Chap. 7: 367-452.

Şahin, E., & Gümüslü, S. (2004). Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behavioural brain research*, 155(2), 241-248.

Sedlak, J.; & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in the tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25, 192-8 205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

Silveira, L., G., P. **Utilização de injetores de ar no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos: formação dos bioflocos, qualidade da água e densidade de estocagem.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, p.66. 2017.

Sohal, R. S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 37-44.

Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, A. C., & Ahmad, I. (2013). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2133-2149.

Stoliar, O. B., & Lushchak, V. I. (2012). Environmental pollution and oxidative stress in fish. *Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants*, 131-166.

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*, 2nd ed: Fish. Res. Board Can.

Strzyzewska, E., Szarek, J., & Babinska, I. (2016). Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: A review. *Veterinarni Medicina*, 61(3), 123–132.

Thompson F.L., Abreu P.C., Cavalli R.O. (1999) The use of microorganisms for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 174:139–153

UNESCO. (1983). *Chemical methods for use in marine environmental monitoring*. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, 53p

Urbinati, E. C.; & Gonçalves, F. D. (2013). Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), In: Baldisserotto, B.; Gomes, L. C. (Eds.) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. UFMS, Santa Maria, 2013, Cap.8, p. 225-246.

Urbinati, E.C., Goncalves, F.D., Takahashi, L.S., (2010). Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Baldisserotto, B., Gomes (Eds.), LC. (Orgs.). *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*, second ed. UFSM, Santa Maria, pp. 205–244.

Utermöhl, H., (1958). Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Kom. für Limnol. Methoden* 9, 1– 39

Wei, Y., Liao, S. A., & Wang, A. L. (2016). The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.040>

Yousuf, I. (2013) 38th Annual WIOA Qld Water Industry Operations Conference Parklands, Glod Coast, pp. 95–101.

Yu, Z., Huang, Z. Q., Du, H. L., Li, H. J., & Wu, L. F. (2019). Influence of differential protein levels of feed on growth, copper-induced immune response and oxidative stress of *Rhynchocypris lagowski* in a biofloc-based system. *Aquaculture Nutrition*, 26(6), 2211-2224. <https://doi.org/10.1111/anu.13158>

Yu, Z., Li, L., Zhu, R., Li, M., & Wu, L. F. (2020). Effects of bioflocs with different C/N ratios on growth, immunological parameters, antioxidants and culture water quality in *Opsariichthys kaopingensis* Dybowski. *Aquaculture Research*, 51(2), 805-815.

Zhukova, N. V., & Kharlamenko, V. I. (1999). Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquatic Microbial Ecology*, 17(2), 153-157