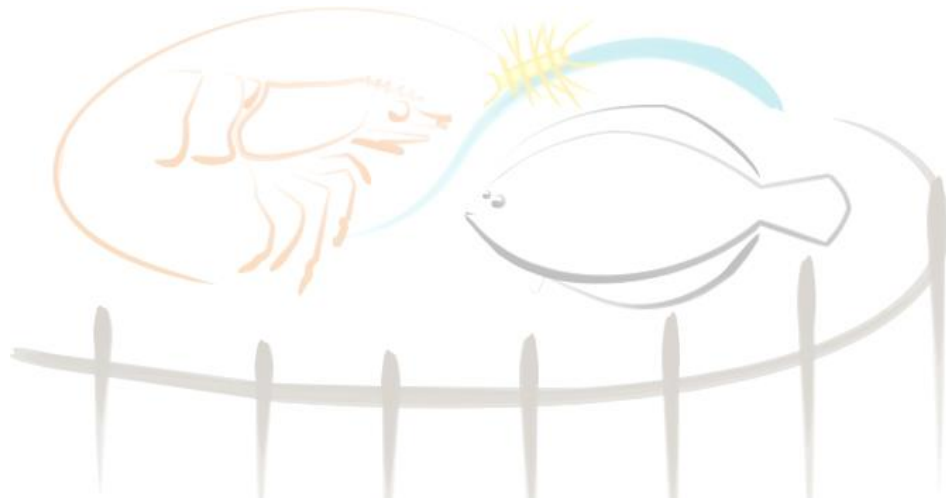


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

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



Análise de diferentes protocolos para multiplicação de probiótico comercial em sistemas aquícolas

Flávia Banderó Hoffling

RIO GRANDE-RS

2021

31 **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**
32 **INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA**
33 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**
34
35
36
37

38 **Análise de diferentes protocolos para multiplicação de probiótico comercial em**
39 **sistemas aquícolas**
40

41 Flávia Banderó Hoffling

42
43 Dissertação apresentada como
44 parte dos requisitos para obtenção do
45 grau de mestre em Aquicultura no
46 Programa de Pós-graduação em
47 Aquicultura da Fundação Universidade
48 Federal do Rio Grande.
49

50 Orientador: Dr. Dariano Krummenauer

51 Co-Orientador: Dr. Paulo Cesar Abreu
52
53
54
55
56
57
58

59 Rio Grande – RS

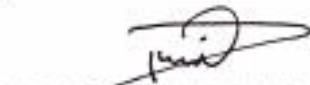
60 2021

ATA DE APROVAÇÃO

ATA 04/2021

DE DEFESA DA 199ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia vinte e quatro de fevereiro de dois mil e vinte e um, às nove horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, da **FLÁVIA BANDERÓ HÖFFLING**, orientada pela Prof. Dr. Dariano Krummenauer composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Dariano Krummenauer (orientador – IO/FURG), Prof. Dr. Paulo Cesar Abreu (Co orientador - IO/FURG), Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior (IO/FURG), Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira (UFSC) e o Prof. Dr. Marcos Santos (INVE - Aquaculture). Título da dissertação: “Análise de diferentes protocolos para multiplicação de probiótico comercial em sistemas aquícolas”. Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Dariano Krummenauer, que na qualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador em Exercício. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **FLÁVIA BANDERÓ HÖFFLING** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador do PPGAq.



PROF. DR. DARIANO KRUMMENAUER (ORIENTADOR – IO/FURG)

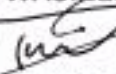


(POR VÍDEO COM PRESENÇA)

PROF. DR. PAULO CESAR ABREU (CO ORIENTADOR - IO/FURG)

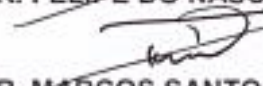


PROF. DR. WILSON WASIELESKY JUNIOR (IO/FURG)



(POR VÍDEO COM PRESENÇA)

PROF. DR. FELIPE DO NASCIMENTO VIEIRA (UFSC)



(POR VÍDEO COM PRESENÇA)

PROF. DR. MARCOS SANTOS (INVE - Aquaculture)



(POR VÍDEO COM PRESENÇA)

FLÁVIA BANDERÓ HÖFFLING



PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador do PPGAq)

Ficha Catalográfica

H698a Hoffling, Flávia Banderó.
Análise de diferentes protocolos para multiplicação de probiótico comercial em sistemas aquícolas / Flávia Banderó Hoffling. – 2021. 43 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2021.
Orientador: Dr. Dariano Krummenauer.
Coorientador: Dr. Paulo Cesar Abreu.

1. Aquicultura 2. *Bacillus* 3. Bactérias 4. Protocolos de Multiplicação I. Krummenauer, Dariano II. Abreu, Paulo Cesar III. Título.

CDU 639.3.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

63	ÍNDICE	
64	LISTA DE TABELAS	v
65	LISTA DE FIGURAS	vi
66	DEDICATÓRIA	viii
67	AGRADECIMENTOS.....	ix
68	RESUMO	x
69	ABSTRACT.....	xi
70	1. INTRODUÇÃO	12
71	2. MATERIAL E MÉTODOS	15
72	2.1. Microrganismos	17
73	2.2. Análise estatística.....	17
74	3. RESULTADOS.....	18
75	3.1 Experimento I:.....	18
76	3.2. Experimento II	21
77	3.3. Experimento III.....	25
78	4. DISCUSSÃO	30
79	4.1. Experimento I.....	30
80	4.2. Experimento II	31
81	4.3. Experimento III.....	33
82	4.4. Geral.....	34
83	5. CONCLUSÕES	39
84	6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
85	7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
86		
87		

88 **LISTA DE TABELAS**

89 **Tabela 1** - Descrição dos produtos utilizados em cada experimento de multiplicação do
90 probiótico comercial Sanolife ProW (INVE Aquaculture).

91 **Tabela 2** - Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos.

92 **Tabela 3** - Valores médios da salinidade da água nos respectivos experimentos.

93 **Tabela 4** - Valores médios de oxigênio dissolvido em mg/L ao longo das 24h no Experimento
94 I. Letras diferentes sobrescritas representam as diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre
95 tratamentos.

96 **Tabela 5** - Valores referentes a abundância de *Bacillus* por mL, e as diferenças estatísticas
97 ($p < 0.05$) detectadas. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas de cada
98 tratamento entre o tempo inicial e final. Letras minúsculas representam as diferenças
99 estatísticas entre os tratamentos – Experimento I.

100 **Tabela 6** - Valores médios de oxigênio dissolvido em mg/L ao longo das 24h no Experimento
101 II. Letras diferentes sobrescritas representam as diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre
102 tratamentos.

103 **Tabela 7** – Valores referentes a abundância de *Bacillus* por mL, e as diferenças estatísticas
104 ($p < 0.05$) detectadas. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas de cada
105 tratamento entre o tempo inicial e final. Letras minúsculas representam as diferenças
106 estatísticas entre os tratamentos – Experimento II.

107 **Tabela 8** - Valores médios de oxigênio dissolvido em mg/L ao longo das 24h no Experimento
108 III. Letras diferentes sobrescritas representam as diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre
109 tratamentos.

110 **Tabela 9** - Valores referentes a abundância de *Bacillus* por mL, e as diferenças estatísticas
111 ($p < 0.05$) detectadas. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas de cada
112 tratamento entre o tempo inicial e final. Letras minúsculas representam as diferenças
113 estatísticas entre os tratamentos – Experimento III.

114

115

116

117 **LISTA DE FIGURAS**

118 **Figura 1** – Quantificação do grupo de bactéria *Bacillus* por mL (médias \pm desvio padrão) no
119 tempo inicial e final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim
120 do experimento.

121 **Figura 2** – Quantificação do grupo de bactérias cocoides por mL (médias \pm desvio padrão)
122 no tempo inicial e final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim
123 do experimento.

124 **Figura 3** – Quantificação do grupo de bactérias filamentosas por mL (médias \pm desvio
125 padrão) no tempo inicial e final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo
126 e o fim do experimento.

127 **Figura 4** – Quantidade de indivíduos por mL (médias \pm desvio padrão) no tempo inicial e
128 final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim do experimento.

129 **Figura 5** – Quantificação do grupo de bactéria *Bacillus* por mL (médias \pm desvio padrão) no
130 tempo inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim
131 do experimento.

132 **Figura 6** – Quantificação do grupo de bactérias cocoides por mL (médias \pm desvio padrão)
133 no tempo inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o começo e o
134 fim do experimento.

135 **Figura 7** – Quantificação do grupo de bactérias filamentosas por mL (médias \pm desvio
136 padrão) no tempo inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o
137 começo e o fim do experimento.

138 **Figura 8** – Quantidade de indivíduos por mL (médias \pm desvio padrão) no tempo inicial e
139 final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim do experimento.

140 **Figura 9** – Quantificação do grupo de bactéria *Bacillus* por mL (médias \pm desvio padrão) no
141 tempo inicial e final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim
142 do experimento.

143 **Figura 10** – Quantificação do grupo de bactérias cocoides por mL (médias \pm desvio padrão)
144 no tempo inicial e final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o começo e o
145 fim do experimento.

146 **Figura 11** – Quantificação do grupo de bactérias filamentosas por mL (médias \pm desvio
147 padrão) no tempo inicial e final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o
148 começo e o fim do experimento.

149 **Figura 12** –. Quantidade de indivíduos por mL (médias \pm desvio padrão) no tempo inicial e
150 final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim do experimento.

151

152

153

154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha Mãe Zuleika e minha Avó Nilva, exemplos de sabedoria e trabalho; dedico também aos pesquisadores da minha família, dindo Jefferson, tio Vilmar e Cristiani, minhas referências de dedicação à ciência.

185 **AGRADECIMENTOS**

186 Meus agradecimentos serão muitos, pois sozinhos não somos ninguém e não
187 chegamos a lugar nenhum. Agradeço ao meu orientador Dr. Dariano Krummenauer pelas
188 oportunidades de ouro ao longo do meu período de mestrado, pelos conselhos, aulas,
189 ensinamentos, puxões de orelha e por acreditar no meu trabalho.

190 Agradeço ao meu co-orientador Dr. Paulo Abreu que esteve sempre disposto a me
191 auxiliar com sua visão única sobre a ciência e todo universo dos microrganismos, dividindo
192 seus conhecimentos. Sem seus ensinamentos e orientação este trabalho não seria o mesmo.

193 Ao Dr. Wilson (Mano) e ao Dr. Geraldo por todas as trocas, ensinamentos e
194 principalmente pelo acolhimento, muito obrigada. Agradeço a todos os professores, alunos e
195 funcionários da EMA e do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, especialmente ao
196 Projeto Camarão, tão importantes para o meu crescimento profissional, proporcionando
197 verdadeiras oportunidades de trabalho e aprendizado. Foi uma alegria imensa integrar esse
198 grupo cheio de pessoas batalhadoras.

199 Não menos importante, agradeço imensamente a minha mãe Zuleika e minhas irmãs
200 Fabi, Nanda e Biba, pelo suporte emocional e financeiro, pelo amor incondicional e por
201 acreditarem em mim. À toda família Banderó, por compreenderem minha dedicação ao
202 estudo e a ausência em eventos familiares ao longo desses anos. Ao Yuri, pelo incansável
203 incentivo, cuidado e amor. Vocês são verdadeiros raios de sol na minha vida.

204 A todos os amigos que me acompanharam nesse período, em especial: Wellica e
205 Missileny, parceiras de LAB e de longas conversas e cafés, vocês têm toda minha admiração
206 e amizade. Ao meu amigo e por muitas vezes professor, Hellyjúnyor. Ao meu fiel grupo de
207 trabalho e de vida, Jéssica, Elisa, Inácio e Ednara, na boa e na ruim, sempre comigo, tornando
208 a vida mais leve.

209 Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAURG pela concessão de bolsas de
210 pesquisa e por oportunizarem o desenvolvimento da ciência no nosso país.

211

RESUMO

212 O uso de probióticos comerciais em cultivos aquícolas como alternativa aos antibióticos, tem
213 demonstrado viabilidade e resultados positivos. Os probióticos podem ser definidos como
214 organismos vivos não patogênicos, utilizados com o objetivo de melhorar a saúde do
215 hospedeiro, como bactérias e leveduras que são capazes de colonizar o trato gastrointestinal
216 dos animais cultivados, bem como atuar no ambiente de cultivo contra o desenvolvimento de
217 patógenos. Algumas estratégias empíricas são utilizadas nas fazendas de Carcinicultura como
218 tentativa de multiplicar as bactérias de probióticos comerciais de maneira artesanal, visando
219 a diminuição dos custos com a compra do produto comercial. A hipótese de que probióticos
220 comerciais podem ser multiplicados foi testada nesta Dissertação. O presente estudo foi
221 realizado na Estação Marinha de Aquicultura, IO - FURG e contou com três experimentos,
222 realizando a execução de protocolos caseiros de multiplicação de um probiótico comercial
223 utilizados em fazendas no Brasil, Peru e Equador. Cada experimento teve a duração de 24h.
224 Parâmetros de qualidade de água foram monitorados e coletas de água foram realizadas no
225 tempo 00h e 24h para quantificação de bactérias e protozoários. Experimento I: 25g de
226 probiótico Pro-W, 25g de leite em pó, 50mL de melão e 25g de carbonato de cálcio;
227 Experimento II: 25g de probiótico Pro-W, 50g de farelo de arroz, 33,33g de açúcar cristal e
228 12,5g de bicarbonato de sódio. Experimento III: 25g de probiótico Pro-W, 25g de Farelo
229 Bokashi, 50mL de melão e 12,5g de bicarbonato de sódio. Foram utilizadas unidades
230 experimentais com 25L de volume útil e os protocolos utilizados foram baseados na prática
231 de fazendas do Brasil, Peru e Equador. Cada experimento contou com 6 tratamentos e 3
232 repetições cada. Os tratamentos foram realizados em água doce ($0,31 \pm 0,06 \text{ g/L}^{-1}$) e em água
233 marinha ($25,06 \pm 0,44 \text{ g/L}^{-1}$). T1: Controle em água doce; T2: Controle em água marinha;
234 T3: Controle negativo em água doce; T4: Controle negativo em água marinha; T5: Protocolo
235 em água doce; T6: Protocolo em água marinha. Os três experimentos apresentaram
236 crescimento de bactérias do morfotipo *Bacillus*, cocoides e filamentosas em todos os
237 tratamentos. Não se observou efeito dos tratamentos no crescimento final de bactérias e
238 protozoários. Estes resultados indicam que os protocolos utilizados não contribuem para o
239 crescimento específico de bactérias do tipo *Bacillus*, similar aos do probiótico comercial.
240 Palavras-chave: Aquicultura; *Bacillus*; Bactérias; Protocolos de multiplicação.

241 **ABSTRACT**

242 The use of commercial probiotics in aquaculture crops as an alternative to antibiotics,
243 has demonstrated viability and positive results. Probiotics can be defined as non-pathogenic
244 living organisms, used to improve the health of the host, as bacteria and yeasts that are able
245 to colonize the gastrointestinal tract of cultivated animals, as well as act in the culture
246 environment. against the development of pathogens. Some empirical strategies are used in
247 Shrimp Farms to multiply the bacteria of commercial probiotics in an artisanal way, aiming
248 to decrease the costs with the purchase of the commercial product. The present study was
249 carried out at the Marine Station of Aquaculture, IO - FURG and included three experiments,
250 carrying out the execution of homemade protocols for the multiplication of a commercial
251 probiotic used in farms in Brazil, Peru and Ecuador. Each experiment lasted 24 hours. Water
252 quality parameters were monitored, and water collections were performed at 00h and 24h to
253 quantify bacteria and protozoa. Each experiment lasted 24 hours. Water quality parameters
254 were monitored, and water collections were performed at 00h and 24h to quantify bacteria
255 and protozoa. Experiment I: 25g of Pro-W probiotic, 25g of powdered milk, 50mL of
256 molasses and 25g of calcium carbonate; Experiment II: 25g of Pro-W probiotic, 50g of rice
257 bran, 33.33g of crystal sugar and 12.5g of sodium bicarbonate. Experiment III: 25g of Pro-
258 W probiotic, 25g of Bokashi Bran, 50mL of molasses and 12.5g of sodium bicarbonate.
259 Experimental units with 25L of useful volume were used and the protocols used were inspired
260 by the practice of farms in Brazil, Peru, and Ecuador. Each experiment had 6 treatments and
261 3 repetitions each. The treatments were carried out both in fresh water ($0.31 \pm 0.06 \text{ g/L}^{-1}$) and
262 in marine water ($25.06 \pm 0.44 \text{ g/L}^{-1}$). T1: Control in fresh water; T2: Control in marine water;
263 T3: Negative control in fresh water; T4: Negative control in seawater; T5: Protocol in fresh
264 water; T6: Protocol in marine water. The three experiments showed growth of *Bacillus*,
265 cocoid and filamentous bacteria in all treatments. There was also no effect of treatments on
266 the final growth of bacteria and protozoa. These results indicate that the protocols used do
267 not contribute to the specific growth of *Bacillus*-type bacteria, like those of the commercial
268 probiotic.

269 Keywords: Aquaculture; *Bacillus*; Bacteria; Multiplication protocols.

270 1. INTRODUÇÃO

271 A intensificação dos sistemas de cultivo de camarões marinhos, sem o uso de
272 tecnologias, apesar de promover vantagens como a melhoria da produtividade resultou
273 também na maior ocorrência de diferentes doenças. Para contornar esse problema, a busca
274 por tecnologias e manejos de controle e prevenção aos patógenos se tornou fundamental para
275 o sucesso nas produções. Comumente, produtores utilizam antibióticos nos sistemas de
276 cultivo para tratamento de doenças bacterianas (Gao *et al.*, 2012), entretanto seu uso tem se
277 tornado obsoleto por diversos aspectos práticos, como os genes resistentes a antibióticos (Gao
278 *et al.*, 2012), possibilitando a seleção de patógenos resistentes à esses produtos (Han *et al.*,
279 2015), bem como a visão negativa do consumidor final (Zhang *et al.*, 2011; Zokaeifar *et al.*,
280 2012). Através da seleção e mutação genética, bactérias patogênicas apresentam resistência
281 aos antibióticos, tornando-os ineficientes. Além disto, estas apresentam capacidade de
282 contaminação do solo, do efluente e do próprio meio ambiente. (Han *et al.*, 2015; Jantarathin
283 *et al.*, 2017). Como alternativa, algumas ferramentas ecologicamente viáveis surgem,
284 contribuindo com a produção aquícola, reduzindo a produção de resíduos e contaminações,
285 tais como nos sistemas intensivos e superintensivos de produção com o uso de tecnologias e
286 a aplicação de microrganismos probióticos.

287 Os sistemas mais intensificados de produção, que se valem do uso de aeração, ração,
288 produtos para a sanidade animal e da água, se contrapõem a sistemas abertos de cultivo,
289 visando aumentar a produtividade, melhorar o controle ambiental, restringir a disseminação
290 de doenças, pelo aumento da biossegurança através da redução da troca de água, diminuição
291 dos efluentes e redução das áreas de cultivo (Krummenauer *et al.*, 2014b; Avnimelech., 2015;
292 Samocha *et al.*, 2017). Quanto mais intensificada é a produção, maior a necessidade de
293 controle de doenças, de acúmulo de matéria orgânica no meio, bem como gestão de
294 nutrientes. Dessa forma, o uso de produtos como os probióticos passaram a ser amplamente
295 empregados como alternativa aos antibióticos (Gareau *et al.*, 2010) e com várias vantagens
296 em seu uso, como os seus mecanismos de ação e os possíveis benefícios práticos nos sistemas
297 de cultivo (Zhou *et al.*, 2009).

298 Por definição, probióticos são organismos vivos não patogênicos, utilizados com o
299 objetivo de melhorar a saúde do hospedeiro (Moriarty, 1998). São cepas específicas de

300 bactérias e leveduras benéficas, que possuem mecanismos de atuação na colonização do trato
301 gastrointestinal dos animais cultivados, bem como ação no ambiente de cultivo, atuando
302 contra o desenvolvimento de patógenos (Decamp *et al.*, 2008; Gatesoupe, 1999). Além disso,
303 as bactérias probióticas têm a capacidade de competir e eliminar microrganismos
304 patogênicos, podendo se sobrepor aos grupos, ou eliminá-los através da exclusão
305 competitiva, evitando seu desenvolvimento no meio aquático ou no sedimento (Balcázar *et*
306 *al.*, 2006; Lazado *et al.*, 2011).

307 Os probióticos podem evitar a proliferação de bactérias patogênicas como as do
308 gênero *Vibrio*, bactérias gram-negativa que são responsáveis por doenças severas nos
309 camarões (Chatterjee e Haldar, 2012) bem como melhorar a qualidade de água e controlar o
310 aparecimento de outras doenças (Ringø, 2020). Nesse sentido, diversos autores já
311 encontraram resultados que corroboram a eficiência do uso de probióticos para a diminuição
312 de *Vibrio* sp. nos sistemas. Aguilera-Rivera *et al.* (2014) evidenciaram melhores
313 sobrevivências e menor número de lesões graves por *Vibrio* sp. nos tecidos dos camarões em
314 tratamentos usando probiótico. Krummenauer *et al.* (2014a) observaram maior sobrevivência
315 e eficácia do probiótico na proteção do camarão contra o *Vibrio parahaemolyticus*. Vieira *et*
316 *al.* (2016) identificaram menor quantidade de *Vibrio* spp. na microbiota intestinal de *L.*
317 *vannamei* alimentado com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* além de
318 aumentar a sobrevivência dos animais. Vidal *et al.* (2018) evidenciaram que camarões
319 alimentados sem a inclusão de probiótico e desafiados com a presença de *V.*
320 *parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, obtiveram menor crescimento significativo que aqueles
321 alimentados com *Bacillus cereus* na ração. É importante ressaltar que o probiótico também é
322 eficiente como efeito complementar aos bioflocos como, por exemplo, verificado para a
323 resistência de *L. vannamei* ao *Vibrio parahaemolyticus* (Balcázar *et al.*, 2006; Hostins *et al.*,
324 2019).

325 Além do grupo *Vibrio*, outros grupos de bactérias podem ocasionar problemas aos
326 animais cultivados. Doenças em camarões ocasionadas por bactérias filamentosas são
327 mundialmente conhecidas (Lightner, 1993). Mourino *et al.* (2008) evidenciaram que
328 bactérias filamentosas *Flexibacter maritimus* possuem potencial patogênico aos camarões,
329 percebendo sinais clínicos em larvas de *L. vannamei*, como necrose nos tecidos e alterações

330 nas brânquias, prejudicando a respiração dos animais e ocasionando mortalidade maciça aos
331 animais. Outros grupos de bactérias podem crescer em ambientes de cultivo, bem como os
332 protozoários.

333 Porém, apesar de todo conhecimento científico sobre a aplicação dos probióticos
334 comerciais e seu uso atrelado à prevenção e/ou tratamento de enfermidades, bem evidenciado
335 nos cultivos de camarões (Moriarty, 1998; Zhou *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018), existem
336 alguns produtores que buscam as benesses do uso dessa tecnologia com baixo investimento
337 econômico, realizando práticas de multiplicação caseira de probióticos comerciais em
338 protocolos empíricos, aumentando o volume do produto e diminuindo custos, ao invés de
339 utilizá-los como indicado pelos fabricantes. Esses protocolos caseiros se valem dos mais
340 variados ingredientes e métodos, que podem implicar em grandes riscos aos cultivos
341 aquícolas. As possibilidades de contaminações são inúmeras, uma vez que os ingredientes
342 utilizados para a execução dos protocolos, tais como farelos vegetais e de origem animal,
343 podem conter microrganismos patogênicos ou favorecer seu crescimento (Roever, 1998). A
344 água utilizada nas fazendas também é potencial transmissora de diversas bactérias
345 patogênicas, protozoários e vírus (Toze, 1999) e alguns microrganismos são capazes de
346 resistir às diferentes técnicas de desinfecções (Russell, 2000).

347 Atualmente, existe uma lacuna a ser preenchida com informações científicas que
348 comprovem quais microrganismos realmente se desenvolvem em cultivos utilizando esses
349 protocolos. Essa técnica, que é amplamente utilizada nas fazendas de Carcinicultura, tanto
350 no Brasil como em outros países da América Latina, pode ser responsável pela disseminação
351 de patógenos, o que acarreta riscos com a possibilidade de desenvolvimento de doenças e por
352 consequência, perdas econômicas. Tendo em vista a possibilidade que os protocolos
353 realizados nas fazendas não reproduzam apenas bactérias probióticas e, além disso, sirvam
354 como vetores de patógenos, o presente estudo realizou a multiplicação de um probiótico
355 comercial através de três protocolos provenientes de diferentes países (Brasil, Peru e
356 Equador), com a quantificação das comunidades microbianas que se desenvolveram nesses
357 processos, a dinâmica entre as bactérias, especialmente as bactérias do grupo *Bacillus* e
358 protozoários.

359

360 Objetivo Geral:

361 O objetivo desta Dissertação é contribuir com informações sobre a ação de protocolos
362 caseiros sobre a multiplicação de um probiótico comercial bem como o potencial de
363 desenvolvimento de bactérias probióticas e bactérias possivelmente patogênicas nestes meios
364 de cultura;

365 Objetivos Específicos:

- 366 a) Caracterizar a comunidade microbiana, resultante da execução de diferentes
367 protocolos caseiros de multiplicação de probiótico comercial, especialmente as do
368 grupo *Bacillus*, utilizadas como probiótico comercial;
- 369 b) Avaliar a ação de cada protocolo sobre a multiplicação das bactérias probióticas
370 presentes no produto comercial;
- 371 c) Quantificar os possíveis microrganismos patogênicos, como espécies de *Vibrio*,
372 provenientes da execução dos protocolos caseiros;
- 373 d) Quantificar e identificar o desenvolvimento de protozoários desenvolvido em
374 cada experimento;
- 375 e) Observar os possíveis efeitos dos diferentes protocolos sobre o consumo de
376 oxigênio dissolvido;

377

378 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

379 O estudo foi desenvolvido na Estação Marinha de Aquacultura da Universidade
380 Federal do Rio Grande (EMA - FURG), em julho de 2019 na cidade de Rio Grande, Rio
381 Grande do Sul, Brasil. Os experimentos foram realizados em sala experimental com
382 temperatura do ar controlada. Foram realizados três experimentos, testando três diferentes
383 protocolos de multiplicação de um probiótico comercial.

384 Os protocolos estão descritos na Tabela 1. O probiótico comercial utilizado foi o
385 Sanolife ProW® (INVE Aquaculture), composto por *Bacillus subtilis* ($2,75 \times 10^{10}$ UFC/g) e
386 *Bacillus licheniformis* ($2,25 \times 10^{10}$ UFC/g) na dosagem de 1g/L. Os experimentos foram
387 realizados em unidades experimentais de vidro com 25L de volume útil, com água doce e
388 com água marinha clorada (40 ppm de cloro) e declorada após 6 horas (1 ppm de vit. C), com
389 seis tratamentos (Tabela 2) e três repetições cada, distribuídos aleatoriamente.

390 **Tabela 1** – Descrição dos produtos utilizados em cada experimento de multiplicação
 391 do probiótico comercial Sanolife ProW® (INVE Aquaculture).

	Experimento I	Experimento II	Experimento III
Probiótico	25 g ProW®	25 g ProW®	25 g ProW®
Fertilizantes	25g de leite em pó (Elegê, 36,46% de carboidrato)	50g de farelo de arroz (49,7% de carboidrato)	25g de farelo bokashi (DRTL distribuidora)
	50mL de melação (Melaços Brasileiros/SP, 37,2% de C)	33,33g açúcar cristal (União, 99,5% de sacarose)	50mL de melação (Melaços Brasileiros/SP, 37,2% de C)
	25g carbonato de cálcio	12,5g bicarbonato de sódio	12,5g bicarbonato de sódio

392

393 Cada unidade foi equipada com aquecedores (Roxin, 300W) para manter a
 394 temperatura entre 28-30°C e houve o fornecimento de ar soprado constante através de um
 395 soprador central (IBRAM, 2HP) acoplado a pedras porosas. O monitoramento do oxigênio
 396 dissolvido (OD) e da temperatura foi realizado com sonda multiparamétrica YSI 556 MPS
 397 (YSI® Inc., Yellow Springs, EUA) no tempo 00h, 12h e 24h, previamente desinfetado. O
 398 pH foi mensurado com pHmetro de bancada (Mettler Toledo, FEP20, Brasil) na hora 00h,
 399 sendo de $7,41 \pm 0,04$ para água doce e $7,73 \pm 0,13$ para água marinha.

400 **Tabela 2** - Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos I, II e III.

T1	T2	T3	T4	T5	T6
Controle em água doce	Controle em água marinha	Controle negativo em água doce	Controle negativo em água marinha	Protocolo em água doce	Protocolo em água marinha
Com inclusão do probiótico	Com inclusão do probiótico	Com inclusão dos Fertilizantes	Com inclusão dos Fertilizantes	Probiótico + Fertilizantes	Probiótico + Fertilizantes

401

402 A duração de cada experimento foi de 24 horas. Foram realizadas coletas de 20mL de
 403 água no tempo 00h (após inclusão dos produtos na água) e 24h fixados com formalina 4% e
 404 posterior contagem de bactérias por microscopia de epifluorescência (HOBBIE *et al.* 1977)
 405 bem como quantificação de protozoários em microscopia ótica (UTERMÖHL, 1958), como
 406 descrito abaixo. A salinidade utilizada em cada experimento está descrita na Tabela 3.

407

408 **Tabela 3** - Valores médios da salinidade da água (mg/L^{-1}) nos respectivos
409 experimentos.

	Experimento I	Experimento II	Experimento III
Água Doce	0,30	0,40	0,25
Água Marinha	24,8	25,7	24,7

410

411 **2.1. Microrganismos**

412 Amostras de 20mL foram coletadas no tempo 00h (após inclusão dos produtos na
413 água) e 24h, com pipeta previamente desinfetada, processadas no Laboratório de Ecologia
414 do Fitoplâncton e de Microrganismos Marinhos e no Laboratório de Ecologia de
415 Microrganismos Aplicada à Aquicultura – IO/FURG. Previamente ao preparo das lâminas,
416 cada amostra foi submetida à sonicação (Qsonica Sonicators) com amplitude de onda de
417 60Hz por 40 segundos, para desagregar os microrganismos e matéria orgânica. Para
418 determinação da abundância de bactérias, as amostras coletadas foram filtradas através de
419 filtros de membrana de policarbonato (nucleopore, $0,2\mu\text{m}$ de poro e 2,5mm de diâmetro)
420 previamente escurecidas com Irgalan Black e posteriormente coradas com Laranja de
421 Acridina 1% na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ (HOBBIE *et al.*, 1977). As bactérias foram
422 fotografadas com uso de câmera fotográfica acoplada a microscópio de epifluorescência, com
423 magnificação de 1000X, e a contagem foi realizada através da seleção de 30 campos
424 aleatórios por fotografia. As bactérias foram classificadas a partir do seu morfotipo, como
425 *Bacillus* (bastonetes), cocoides, filamentosas e víbrios. Para a determinação da abundância
426 de protozoários, amostras de 2mL foram depositadas em câmara de sedimentação e a
427 contagem foi realizada através de 30 campos selecionados aleatoriamente, em microscópio
428 invertido, com magnificação final de 200x. A contagem de microrganismos seguiu
429 metodologia descrita por UTERMÖHL, (1958). A quantificação de protozoários ocorreu com
430 a classificação em quatro grupos, sendo eles ciliados, flagelados, diatomáceas e clorofíceas.

431 **2.2. Análise estatística**

432 Os dados foram submetidos à análise de normalidade da distribuição dos dados (teste
433 de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (teste de Levene). Quando os
434 pressupostos não foram atendidos, foram realizadas transformações estatísticas. Quando

435 diferenças estatísticas foram detectadas ($p < 0.05$), os dados foram submetidos a análise de
436 variância de uma via (ANOVA) ($\alpha = 0.05$) e teste de Post-hoc Tukey com nível de segurança
437 em 95% (Zar, 2010).

438

439 3. RESULTADOS

440 Ao longo dos experimentos, verificamos o crescimento de bactérias do morfotipo
441 *Bacillus*, cocoides e filamentosas. Nenhuma bactéria do grupo *Vibrio* foi observada no
442 começo, ou no fim dos experimentos realizados. Os protozoários identificados foram
443 ciliados, flagelados, diatomáceas e clorofíceas.

444 3.1 Experimento I:

445 Houve diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os tratamentos no tempo 00h e 24h
446 para os valores de oxigênio dissolvido. Os tratamentos T1 e T2 mantiveram OD acima de
447 0,5mg/L às 24h, com valores estatisticamente diferentes dos demais tratamentos os quais
448 obtiveram níveis próximos a zero ao final do experimento. A temperatura média inicial foi
449 aferida em $27,6 \pm 0,58$ °C e a final em $30,1 \pm 0,87$ °C.

450 **Tabela 4** – Valores médios de oxigênio dissolvido em mg/L ao longo das 24h no
451 Experimento I. Letras diferentes sobrescritas representam as diferenças estatísticas ($p < 0.05$)
452 entre tratamentos.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
00h	8.88±0,4 ^a	6.93±0,3 ^b	8.44±0,2 ^a	6.71±0,1 ^b	8.24±0,1 ^a	7.04±0,2 ^b
12h	2.92±2,3 ^a	0.67±0,7 ^a	0.12±0,05 ^a	0.08±0,01 ^a	1.04±1,1 ^a	0.08±0,01 ^a
24h	4.91±1,4 ^a	4.69±0,8 ^a	0.11±0,02 ^b	0.10±0,04 ^b	0.08±0,01 ^b	0.06±0,02 ^b

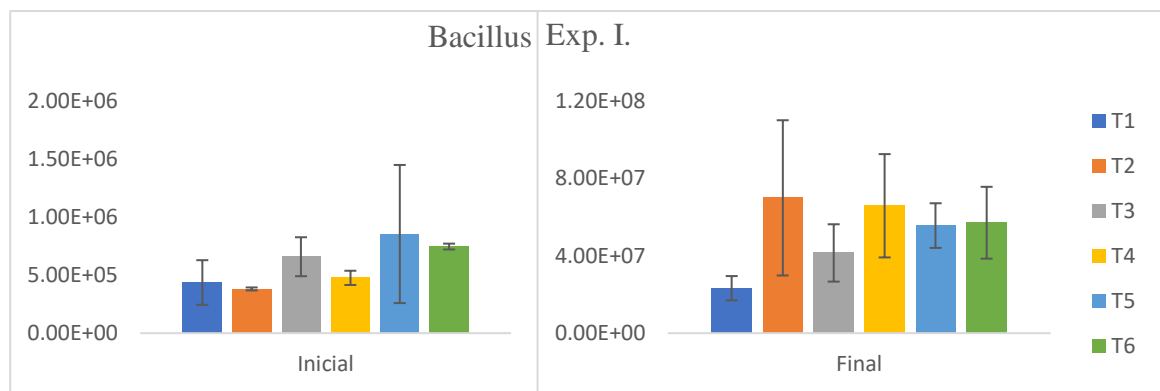
453

454 Bactérias do grupo *Bacillus* (Tabela 5) apresentaram crescimento em todos os
455 tratamentos do tempo inicial para o tempo final, diferindo estatisticamente. Quando
456 comparados os valores entre tratamentos para o tempo 24h, não foram identificadas
457 diferenças estatísticas entre a abundância de bactérias, devido as taxas de crescimento
458 semelhantes das bactérias nos diferentes tratamentos. O crescimento das bactérias pode ser
459 visualizado na Figura 1, bem como os desvios. Nos tratamentos T3 e T4, onde não houve a
460 adição de probiótico comercial, o crescimento alcançou o mesmo crescimento dos demais
461 tratamentos.

462 **Tabela 5** – Valores referentes a abundância de *Bacillus* por mL, e as diferenças
 463 estatísticas ($p < 0.05$) detectadas. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas de
 464 cada tratamento entre o tempo inicial e final. Letras minúsculas representam as diferenças
 465 estatísticas entre os tratamentos – Experimento I.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
00h	$4,37 \times 10^{5Aa}$	$3,81 \times 10^{5Aa}$	$6,59 \times 10^{5Aa}$	$4,77 \times 10^{5Aa}$	$8,55 \times 10^{5Aa}$	$7,47 \times 10^{5Aa}$
24h	$2,33 \times 10^{7Ba}$	$7,0 \times 10^{7Ba}$	$4,15 \times 10^{7Ba}$	$6,59 \times 10^{7Ba}$	$5,57 \times 10^{7Ba}$	$5,71 \times 10^{7Ba}$

466

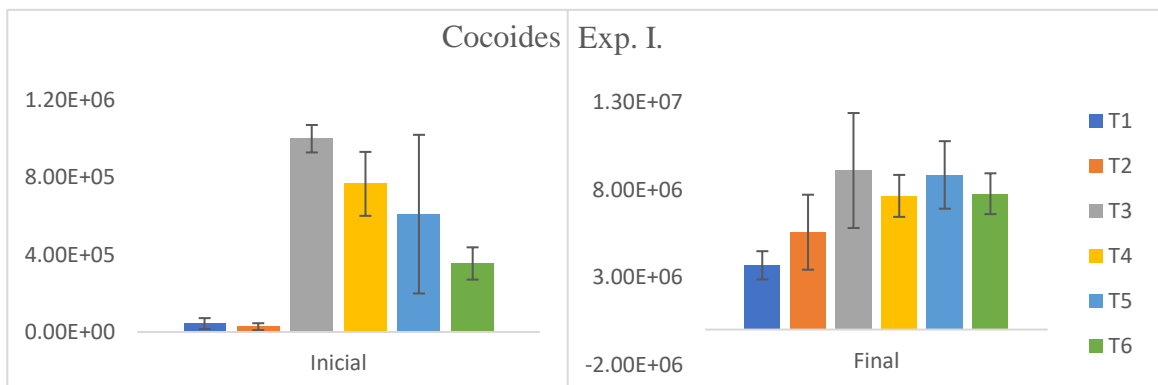


467

468 **Figura 1** – Quantificação do grupo de bactéria *Bacillus* por mL (médias \pm desvio
 469 padrão) no tempo inicial e final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo
 470 e o fim do experimento.

471

472 Também houve o crescimento de bactérias cocoides (Figura 2), as quais apresentaram
 473 diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre o tempo inicial e final, exceto para o T3, que não
 474 apresentou diferenças significativas (inicial $1,0 \times 10^6$ e final $9,11 \times 10^6$). Os tratamentos T1
 (inicial $4,37 \times 10^4$ e final $3,68 \times 10^6$) e o T2 (inicial $2,75 \times 10^4$ e final $5,57 \times 10^6$), iniciaram o

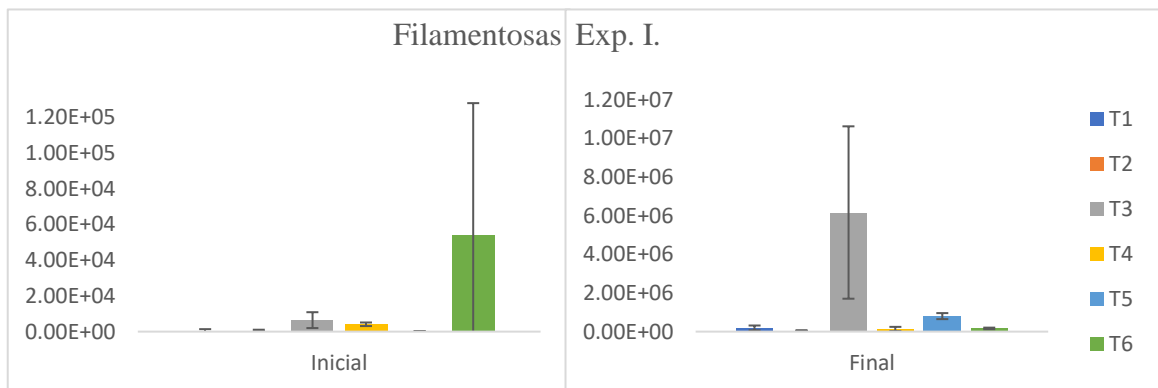


475 cultivo com os valores mais baixos de cocoides, porém ao final do experimento seu
476 crescimento foi igual estatisticamente aos outros tratamentos.

477 **Figura 2** – Quantificação do grupo de bactérias cocoides por mL (médias \pm desvio
478 padrão) no tempo inicial e final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo
479 e o fim do experimento.

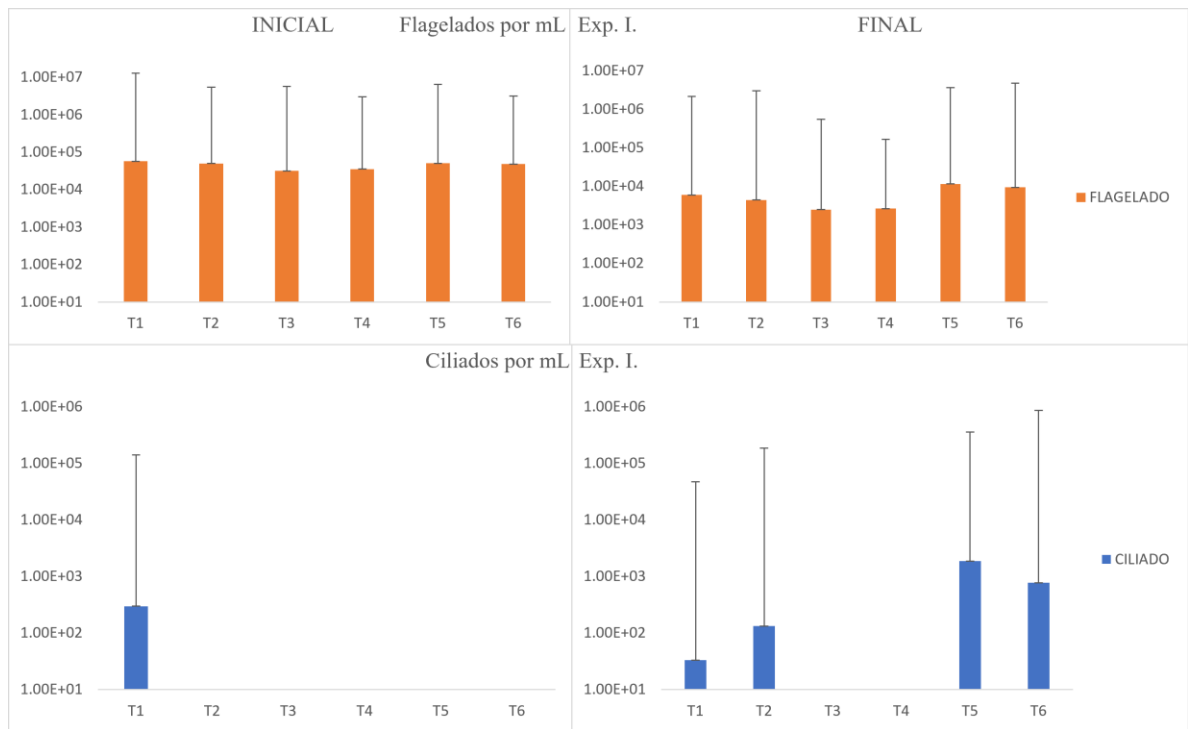
480 Os tratamentos que obtiveram o maior crescimento final foram o tratamento T4
481 ($7,65 \times 10^6$), T5 ($8,84 \times 10^6$) e T6 ($7,77 \times 10^6$).

482 Ainda, podemos observar na Figura 3, o crescimento de bactérias do grupo de
483 filamentosas. Houve o aumento na quantidade de filamentosas em todos os tratamentos,
484 diferindo estatisticamente quando comparados ao tempo inicial, exceto no T6 (inicial
485 $5,40 \times 10^4$ e final $1,59 \times 10^5$). O crescimento foi semelhante entre os tratamentos controle T1
486 (inicial $4,1 \times 10^2$ e final $1,91 \times 10^5$) e T2 (inicial $5,47 \times 10^2$ e final $4,51 \times 10^4$). Para a quantificação
487 das 24h, houve o maior crescimento de bactérias filamentosas no tratamento T3 ($6,16 \times 10^6$)
488 seguido do tratamento T5 ($8,01 \times 10^5$), ambos em água doce. Para água marinha, o crescimento
489 visualizado no T4 foi de $1,35 \times 10^5$ e no T6, $1,59 \times 10^5$.



490 **Figura 3** – Quantificação do grupo de bactérias filamentosas por mL (médias \pm desvio
491 padrão) no tempo inicial e final do Experimento I. Note diferenças nas escalas entre o começo
492 e o fim do experimento.

493 A quantificação dos protozoários presentes pode ser observada na Figura 4. O
494 aparecimento de ciliados no tempo inicial ocorreu apenas no T1 ($2,97 \times 10^2$). Os flagelados
495 cresceram de maneira semelhante em todos os tratamentos, obtendo maior crescimento no
496 T1 ($5,7 \times 10^4$). Houve o crescimento de ciliados no tempo final nos tratamentos T1 ($3,3 \times 10^1$),
497 T2 ($1,32 \times 10^2$), T5 ($1,87 \times 10^3$) e T6 ($7,77 \times 10^2$).



498

499

Figura 4 – Quantificação de indivíduos por mL (médias \pm desvio padrão) no tempo inicial e final do Experimento I.

500

501

502 3.2. Experimento II

503

O comportamento do OD não apresentou diferenças significativas ($p < 0.05$) entre todos os tratamentos no período inicial. Ao final do período experimental, T6 foi significativamente diferente dos demais tratamentos, obtendo o menor valor de OD do experimento, enquanto o T1 e T2 mantiveram os níveis mais altos deste parâmetro às 24h. A temperatura média inicial foi de $30,5 \pm 0,8$ °C e a final foi de $30,4 \pm 0,8$.

504

505

506

507

508

Tabela 6 - Valores médios de oxigênio dissolvido em mg/L ao longo das 24h no Experimento II. Letras diferentes sobrescritas representam as diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre tratamentos.

509

510

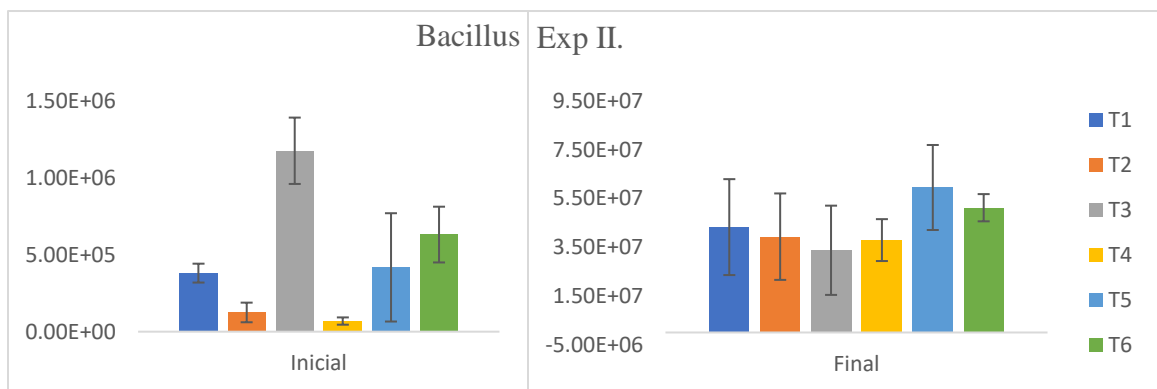
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
00h	8,9 \pm 0,8 ^a	6,33 \pm 0,6 ^a	8,07 \pm 0,1 ^a	6,99 \pm 0,5 ^a	8,55 \pm 0,5 ^a	6,46 \pm 0,1 ^a
12h	2,02 \pm 1,6 ^a	3,93 \pm 0,7 ^a	1,05 \pm 0,6 ^a	1,74 \pm 1,2 ^a	0,1 \pm 0,02 ^a	0,37 \pm 0,4 ^a
24h	5,18 \pm 0,1 ^a	4,54 \pm 0,4 ^a	2,89 \pm 0,7 ^a	1,34 \pm 0,9 ^a	0,1 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^b

511

512 No Experimento II, para o crescimento do morfotipo *Bacillus*, podemos perceber
 513 diferenças significativas ($p < 0.05$) para todos os tratamentos entre tempo inicial e o tempo
 514 final (Tabela 7), onde todos os tratamentos apresentaram crescimento significativo de
 515 bactérias. O T5 e T6 tiveram maiores valores para contagem inicial e final. Na Figura 5
 516 podemos observar o crescimento e os desvios de cada tratamento. Para o tempo inicial, o T3
 517 foi o único a apresentar diferenças quando comparado aos demais. Não houve diferença
 518 significativa entre tratamentos para o tempo final, ou seja, apesar de todos os tratamentos
 519 apresentarem crescimento significativo quando comparados ao tempo inicial, ao tempo final,
 520 todos tiveram valores semelhantes.

521 **Tabela 7** - Valores referentes a abundância de *Bacillus* por mL, e as diferenças
 522 estatísticas ($p < 0.05$) detectadas. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas de
 523 cada tratamento entre o tempo inicial e final. Letras minúsculas representam as diferenças
 524 estatísticas entre os tratamentos – Experimento II.

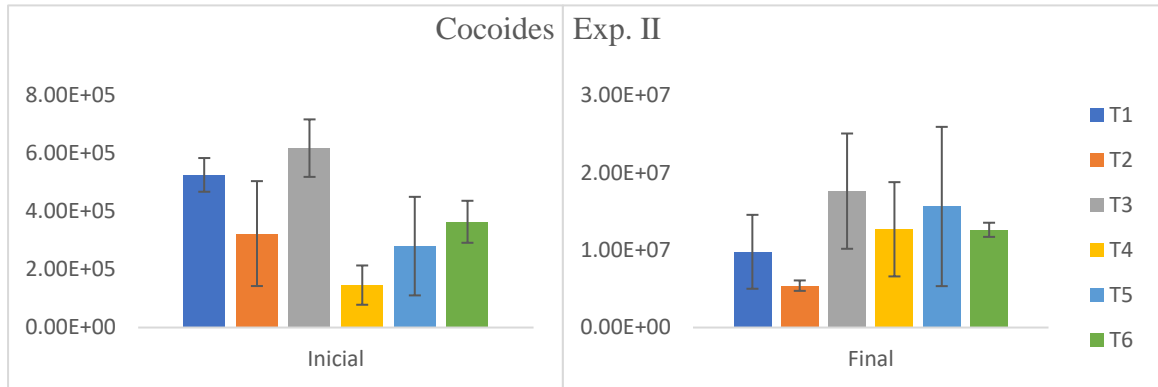
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
00h	3.8×10^{5Aab}	$1,25 \times 10^{5Ab}$	$1,18 \times 10^{6Aa}$	$6,91 \times 10^{4Ac}$	$4,18 \times 10^{5Aab}$	$6,32 \times 10^{5Aab}$
24h	$4,33 \times 10^{7Ba}$	$3,93 \times 10^{7Ba}$	$3,38 \times 10^{7Ba}$	$3,79 \times 10^{7Ba}$	$5,95 \times 10^{7Ba}$	$5,12 \times 10^{7Ba}$



525 **Figura 5** – Quantificação do grupo de bactérias *Bacillus* por mL (médias \pm desvio
 526 padrão) no tempo inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o
 527 começo e o fim do experimento.

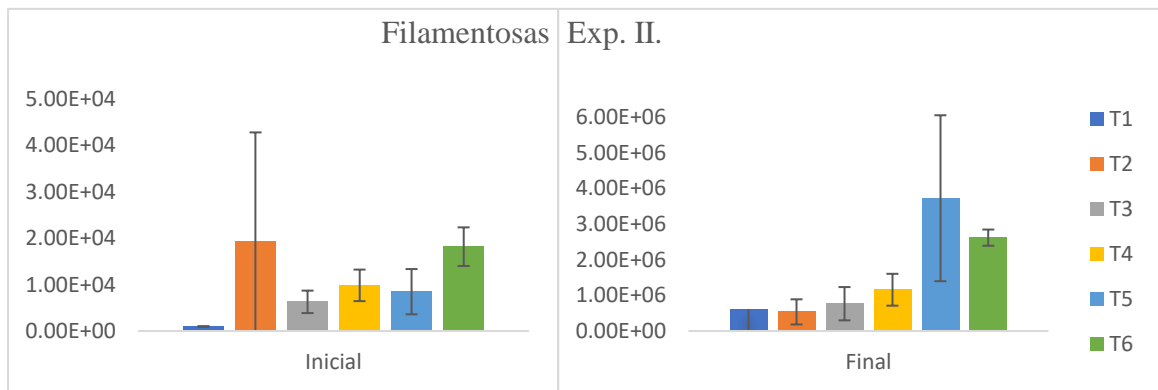
528 Houve o desenvolvimento de bactérias com o morfotipo de cocoides, com a
 529 observação de diferenças estatísticas para o crescimento final quando comparado ao inicial

530 (Fig. 6). Ao tempo final, a maior contagem final foi observada no T3, com $1,76 \times 10^7$. A menor
 531 contagem de cocoides foi observada nos tratamentos T1 ($9,79 \times 10^6$) e T2 ($5,42 \times 10^6$).
 532



533 **Figura 6** – Quantificação do grupo de bactérias cocoides por mL (médias ± desvio
 534 padrão) no tempo inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o
 535 começo e o fim do experimento.

536 As bactérias filamentosas também cresceram durante o Experimento II (Fig. 7),
 537 demonstrando menor crescimento total para o T1 (inicial $9,57 \times 10^2$ e final $6,10 \times 10^5$) e T2
 538 (inicial $1,93 \times 10^4$ e final $5,36 \times 10^5$). O maior crescimento de filamentosas foi observado nos
 539 tratamentos T5 ($3,72 \times 10^6$) e T6 ($2,62 \times 10^6$) no tempo final, ambos tratamentos com inclusão
 540 do protocolo.



541 **Figura 7** – Quantificação do grupo de bactérias filamentosas por mL (médias ± desvio
 542 padrão) no tempo inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o
 543 começo e o fim do experimento.

544 Os grupos de protozoários que foram observados e quantificados podem ser divididos
 545 em flagelados, ciliados, clorofíceas e diatomáceas (Fig. 8). O crescimento de flagelados foi

546 muito semelhante em todos os tratamentos do tempo inicial e no tempo final, obtendo
 547 pequeno decréscimo final quando comparado ao inicial. O T4 foi o único tratamento a
 548 apresentar a presença de ciliados ($6,61 \times 10^1$) para o tempo inicial, porém houve o crescimento
 549 de ciliados em todos os tratamentos no tempo final, com exceção do T1.



550

551 **Figura 8** – Quantidade de indivíduos por mL (médias \pm desvio padrão) no tempo
 552 inicial e final do Experimento II. Note diferenças nas escalas entre o começo e o fim do
 553 experimento.

554 O T3 é o único tratamento a não apresentar crescimento de diatomáceas para o tempo
 555 final, havendo maior crescimento deste grupo no T1 ($1,64 \times 10^3$) e T2 ($7,77 \times 10^2$). As
 556 clorofíceas cresceram no T2 ($9,91 \times 10^1$), T3 ($4,96 \times 10^1$), T4 ($1,65 \times 10^1$) e T6 ($9,91 \times 10^1$). Os
 557 tratamentos que apresentaram a maior quantidade total de protozoários foram T2 ($7,66 \times 10^4$),
 558 T4 ($6,54 \times 10^3$) e T5 ($6,44 \times 10^3$).

559 3.3. Experimento III

560 Os valores de OD diferiram significativamente no tempo 00h e no tempo 24h (Tabela
 561 8). O menor valor de oxigênio do tempo final foi observado no T5. Todos os tratamentos
 562 obtiveram diminuição da disponibilidade de oxigênio na água, quando comparados ao
 563 período inicial. A temperatura média inicial foi de $30,3 \pm 1,2$ °C e a temperatura média final
 564 foi de $31,8 \pm 1,8$ °C.

565 **Tabela 8** - Valores médios de oxigênio dissolvido em mg/L ao longo das 24h no
 566 Experimento III. Letras diferentes sobrescritas representam as diferenças estatísticas
 567 ($p < 0.05$) entre tratamentos.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
00h	8,6 \pm 0,3 ^a	5,2 \pm 0,1 ^b	8,1 \pm 0,2 ^a	5,7 \pm 0,4 ^b	7,9 \pm 0,4 ^a	5,48 \pm 0,3 ^b
12h	0,48 \pm 0,3 ^a	1,1 \pm 0,8 ^a	2,3 \pm 1,3 ^a	1,1 \pm 0,8 ^a	0,04 \pm 0,03 ^a	0,06 \pm 0,01 ^a
24h	2,8 \pm 1,7 ^a	1,0 \pm 1,2 ^{ab}	0,2 \pm 0,05 ^{ab}	0,49 \pm 0,3 ^a	0,1 \pm 0,02 ^b	0,22 \pm 0,1 ^{ab}

568
 569 Podemos observar diferenças significativas ($p < 0.05$) na quantificação do morfotipo
 570 *Bacillus* entre o tempo inicial e o tempo final. (Tabela 9). Todos os tratamentos obtiveram
 571 crescimento significativo deste tipo de bactéria ao longo das 24h de experimento. O T3 e o
 572 T4 possuem a menor contagem para essa bactéria no tempo inicial, ambos tratamentos
 573 negativos, porém a contagem no tempo final foi estatisticamente igual para todos os
 574 tratamentos.

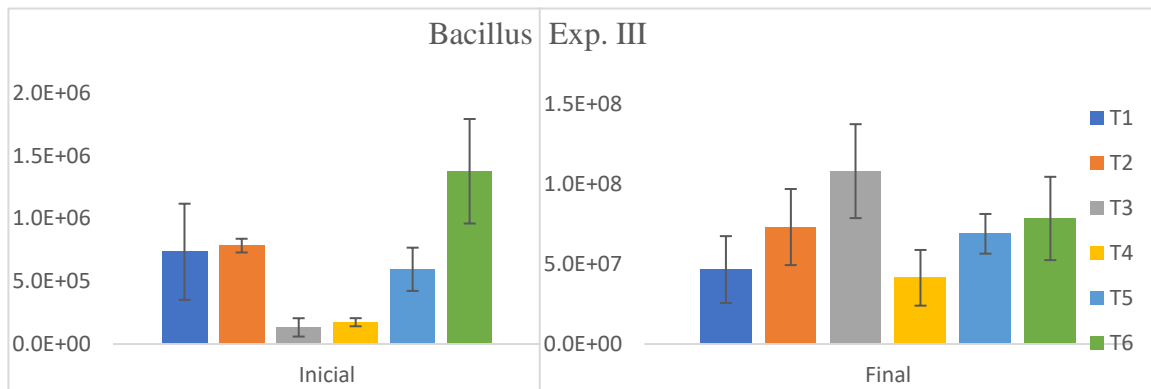
575 **Tabela 9** – Valores referentes a abundância de *Bacillus* por mL, e as diferenças
 576 estatísticas ($p < 0.05$) detectadas. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas de

577 cada tratamento entre o tempo inicial e final. Letras minúsculas representam as diferenças
 578 estatísticas entre os tratamentos – Experimento III.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
00h	7,34x10 ⁵ Aa	7,84x10 ⁵ Aa	1,32x10 ⁵ Ab	1,74x10 ⁵ Ab	5,95x10 ⁵ Aab	1,38x10 ⁶ Aa
24h	4,66x10 ⁷ Ba	7,32x10 ⁷ Ba	1,08x10 ⁸ Ba	4,14x10 ⁷ Ba	6,89x10 ⁷ Ba	7,86x10 ⁷ Ba

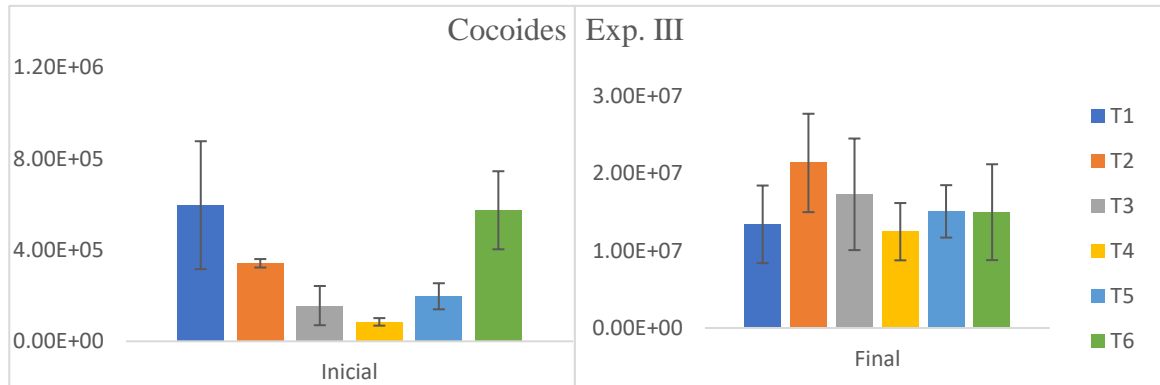
579

580 Na Figura 9, podemos observar os desvios e quantificação das bactérias por
 581 tratamento. Os tratamentos T1 e T2 obtiveram o crescimento inicial de *Bacillus* muito
 582 semelhante, apesar das salinidades distintas (0,25 e 24,7). O T3 apresentou o maior
 583 crescimento de *Bacillus* para o tempo final, apesar de não ser diferente estatisticamente que
 584 os outros tratamentos. Os tratamentos T5 e T6 obtiveram crescimento significativo quando
 585 comparados ao tempo inicial.



586 **Figura 9** – Quantificação do grupo de bactérias *Bacillus* por mL (médias ± desvio
 587 padrão) no tempo inicial e final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o
 588 começo e o fim do experimento.

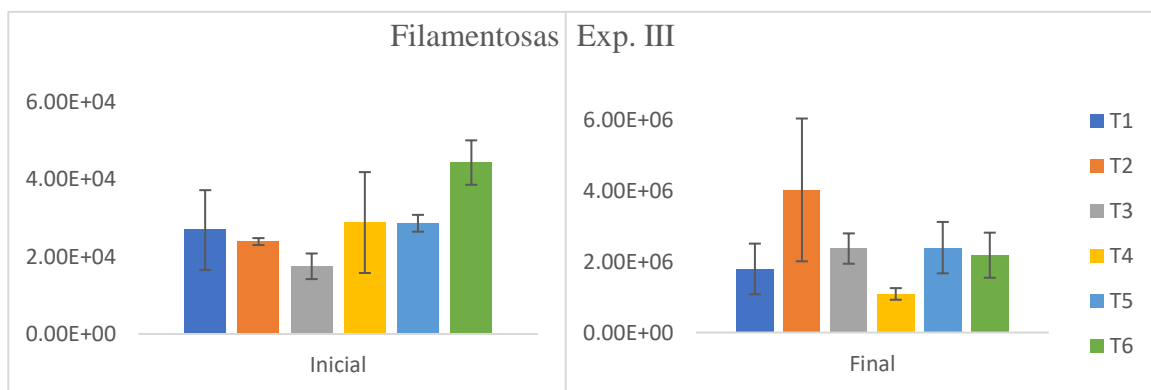
589 O desenvolvimento das cocoides pode ser observado na Figura 10. Houve diferenças
 590 significativas ($p < 0.05$) do tempo inicial para o tempo final no crescimento das bactérias, onde
 591 é possível detectar a menor contagem inicial de cocoides nos tratamentos T3 ($1,56 \times 10^5$) e T4
 592 ($8,53 \times 10^4$).



593 **Figura 10** – Quantificação do grupo de bactérias cocoides por mL (médias ± desvio
 594 padrão) no tempo inicial e final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o
 595 começo e o fim do experimento.

596 Para a quantificação das bactérias filamentosas na Figura 11, observamos diferenças
 597 estatísticas ($p < 0.05$) no tempo inicial e no tempo final para cada tratamentos. O
 598 desenvolvimento desta bactéria foi muito semelhante, embora a maior presença tenha
 599 ocorrido no tempo final, no tratamento T2 ($4,02 \times 10^6$).

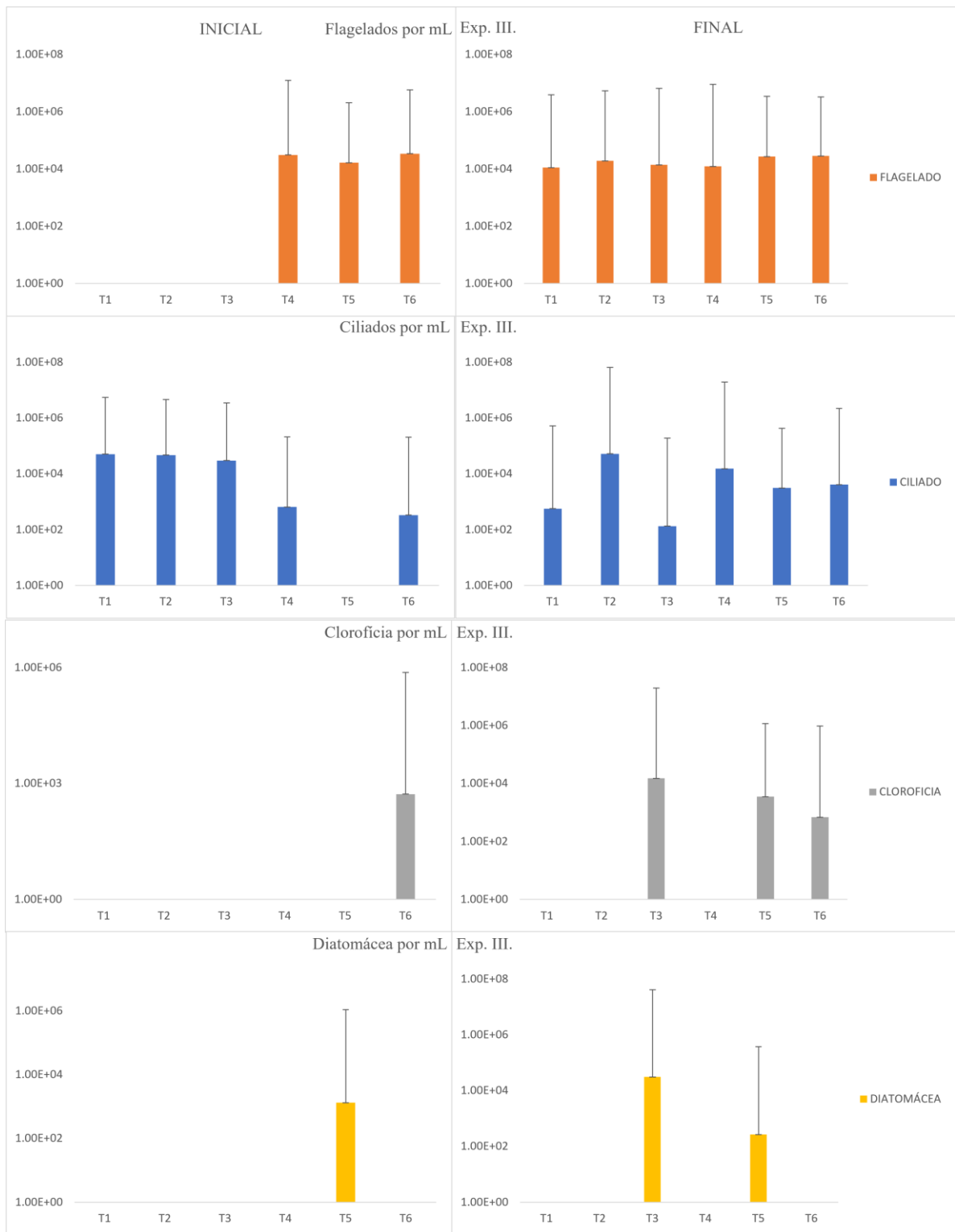
600



601 **Figura 11** – Quantificação do grupo de bactérias filamentosas por mL (médias ±
 602 desvio padrão) inicial e final do Experimento III. Note diferenças nas escalas entre o começo
 603 e o fim do experimento.

604 O crescimento de protozoários foi abundante ao longo das 24h de experimento, como
605 podemos observar na Figura 12. Houve o crescimento de flagelados apenas no T4, T5 e T6
606 para o tempo inicial, porém ao final do experimento, todos os tratamentos apresentaram a
607 presença deste protozoário. Os ciliados não cresceram no T5 no início do experimento, porém
608 de forma geral, é o grupo mais abundante de protozoários no experimento, para o tempo 00h
609 e podemos observar o maior crescimento de ciliados em todos os tratamentos, independente
610 da salinidade, para o tempo 24h.

611 As clorofíceas estão presentes apenas no T6 ($7,48 \times 10^5$) para o tempo inicial e
612 apresentam crescimento no tempo final para os tratamentos T3 ($1,97 \times 10^7$), T5 ($1,16 \times 10^6$) e
613 T6 ($9,58 \times 10^5$). Para o tempo inicial, há o crescimento de diatomáceas apenas no T5
614 ($1,09 \times 10^6$). Para o tempo final, há o crescimento de diatomáceas apenas nos tratamentos T3
615 ($4,08 \times 10^7$) e T5 ($3,74 \times 10^5$), ambos de água doce.



616 **Figura 12** – Quantidade de indivíduos por mL (médias \pm desvio padrão) no tempo
 617 inicial e final do Experimento III.

618 4. DISCUSSÃO

619 4.1. Experimento I

620 As diferenças significativas ($p < 0.05$) no OD inicial podem estar relacionadas às
621 fontes de água, onde a água doce (T1, T3 e T5) contém maior concentração de OD em relação
622 a água marinha por conta da quantidade de sais dissolvidos (salinidade). Para o OD final, os
623 valores do T1 e T2 são estatisticamente superiores aos demais tratamentos. Podemos associar
624 o maior consumo de OD nos tratamentos T3, T4, T5 e T6, com a inclusão do leite em pó e
625 do melão. Estes produtos nada mais são do que fontes de carbono orgânico, as quais os
626 microrganismos utilizam para se alimentar, crescer e se multiplicar. Desta forma, o
627 desenvolvimento rápido das bactérias utilizando as fontes de carbono disponíveis, pode ter
628 afetado a disponibilidade de OD.

629 Foram observadas diferenças significativas ($p < 0.05$) para o crescimento de *Bacillus*
630 entre o início e o final do período experimental, quando comparado ao tempo inicial. Dentro
631 das condições testadas, todos os tratamentos apresentaram a mesma tendência de
632 crescimento, independente da salinidade da água. Os tratamentos negativos (T3 e T4), os
633 quais não utilizam o probiótico comercial, foram igualmente eficientes no desenvolvimento
634 de bactérias *Bacillus* quanto os tratamentos que contemplam a aplicação apenas do probiótico
635 (T1 e T2) e dos tratamentos que contam com a aplicação completa do protocolo (T5 e T6).
636 As 24h, o crescimento de *Bacillus* foi estatisticamente igual entre os tratamentos, fato que
637 pode ser relacionado ao ambiente totalmente isolado e controlado, onde o experimento foi
638 realizado. O tempo de duração do experimento também pode ter afetado o aparecimento de
639 possíveis diferenças estatísticas.

640 O crescimento do grupo de bactérias cocoides obteve diferenças significativas
641 ($p < 0.05$) durante o experimento. Podemos perceber valores menores no T1 e T2 no tempo
642 inicial. Esse comportamento pode estar relacionado a falta de nutrientes disponíveis, uma vez
643 que nos referidos tratamentos só houve a inclusão do probiótico comercial. Porém, ao final
644 do período experimental, o crescimento de cocoides se igualou em todos os tratamentos, sem
645 apresentar diferenças significativas.

646 As bactérias filamentosas cresceram em menor número quando comparadas aos
647 *Bacillus* e cocoides, porém em alguns casos, elas podem possuir potencial patogênico para

648 as espécies cultivadas. Podemos observar diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre o tempo
649 inicial e final para cada tratamento, evidenciando o menor crescimento deste grupo nos
650 tratamentos T1 e T2, que pode estar relacionado com a supressão feita pelas bactérias
651 advindas do probiótico comercial sobre os demais microrganismos. Dessa forma, também é
652 interessante observar que seu crescimento foi maior nos tratamentos de água doce. Todos os
653 tratamentos apresentaram crescimento significativamente superior no tempo final quando
654 comparado ao tempo inicial. Apesar deste comportamento, ao final do experimento, entre
655 tratamentos, não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0.05$), ou seja, o crescimento de
656 filamentosas foi igual em todos os tratamentos, independente dos produtos utilizados.

657 A quantificação dos protozoários identificou apenas flagelados e ciliados. O
658 crescimento de flagelados inicial ocorreu em todos os tratamentos, sendo o crescimento de
659 ciliados apenas no T1. No tempo final, houve o crescimento de ciliados no T1, T2, T5 e T6.
660 Onde há a ausência do probiótico (T3 e T4), não cresceram ciliados ao longo das 24h do
661 experimento. A sucessão microbiana pode ser explicada pelos conceitos de alça microbiana,
662 onde ocorre um ciclo de produção, crescimento e consumo entre os microrganismos. A
663 matéria orgânica dissolvida é consumida pelas bactérias, que são consumidas pelo
664 nanozooplâncton (flagelados), que por sua vez, são consumidos pelo microzooplâncton
665 (ciliados) e assim sucessivamente. Dessa forma, podemos explicar o surgimento dos ciliados
666 no tempo final do experimento. Os ciliados são fundamentais na base da teia trófica do
667 ecossistema aquático, atuando como pastadores de flagelados e microalgas e servindo como
668 alimento para metazoários (Nagano & Decamp, 2004).

669 **4.2. Experimento II**

670 Para o tempo 00h e 24h, não houve diferenças estatísticas para a presença de OD.
671 Porém, houve diferenças significativas ($p < 0.05$) no tempo final para o consumo no T6, que
672 diferiu dos demais tratamentos, registrando a menor concentração média ($0,06 \pm 0,01^b$).
673 Apesar de não identificarmos diferenças estatísticas entre os demais tratamentos, o T5
674 ($0,1 \pm 0,01^a$) apresentou a concentração final de OD mais baixa. Os níveis de oxigênio
675 dissolvido exercem papel importante durante os processos bacterianos (Van Wyk & Scarpa,
676 1999) e o fato dos tratamentos T5 e T6 apresentarem os menores níveis pode estar relacionado
677 com a maior quantidade de matéria orgânica desenvolvida no meio, pois ambos contaram

678 com a adição do protocolo completo. A temperatura registrada esteve em torno de 30 °C,
679 semelhante as condições de temperatura encontradas em fazendas de cultivo.

680 O crescimento do grupo de *Bacillus* diferiu estatisticamente do tempo inicial para o
681 tempo final, demonstrando que houve crescimento em todos os tratamentos. Nos tratamentos
682 T2 e T4, ambos de água marinha, a contagem foi menor que nos demais tratamentos para o
683 tempo inicial. Porém essas diferenças não foram percebidas no tempo final, onde o
684 crescimento médio foi estatisticamente igual para todos os tratamentos. Apesar da ausência
685 do probiótico no tratamento negativo, há o crescimento de bactérias *Bacillus*. O protocolo
686 contempla o uso de farelo de arroz, o qual pode estimular o aparecimento de diversos grupos
687 de microrganismos que compõe a produtividade primária no meio aquático (Deepak, et. al.,
688 2020), por conta da quantidade de carbono orgânico que é liberada no meio.

689 Bactérias do morfotipo cocoides também cresceram nesse experimento, obtendo
690 crescimento semelhante tanto no tempo inicial quanto no tempo final entre todos os
691 tratamentos. Dessa forma, nos tratamentos controle T1 e T2, onde a dosagem de probiótico
692 comercial foi alta, seu crescimento pode ter sido prejudicado pela rápida dominação do meio
693 pelos *Bacillus* advindos do produto comercial. As bactérias probióticas do gênero *Bacillus*
694 *spp.* produzem bacteriocinas, capazes de suprimir e matar uma variedade de microrganismos
695 (Madigan, et al., 2010). Da mesma maneira, bactérias vibriónicas não foram identificadas
696 ao longo do experimento.

697 Com temperatura média de 30 °C e fonte de carbono disponível, as filamentosas
698 também ocuparam e colonizaram o meio. No tempo final, não houve diferença significativa
699 embora o T5 e T6 demonstraram maior crescimento e o OD chegou em níveis próximos a
700 zero. Podemos perceber a rapidez com que a água pode ser colonizada, o que está diretamente
701 relacionado aos produtos do protocolo, como o açúcar, que é rapidamente degradado,
702 disponibilizando carbono aos microrganismos.

703 Os protozoários cresceram de forma abundantes no Experimento II, demonstrando
704 diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o tempo inicial e o tempo final. Em 24h, a água rica
705 em nutrientes pode ser rapidamente colonizada por uma boa diversidade de microrganismos,
706 mesmo com os cuidados de desinfecção prévia com cloro e com a ausência de animais vivos,
707 que em cultivos tradicionais podem ser fontes de bactérias advindas do seu intestino. No

708 tempo final os tratamentos de água marinha, principalmente o T2, apresentaram a maior
709 diversidade de protozoários. A presença do farelo de arroz, amplamente utilizado como
710 fertilizante em cultivos de camarão marinho na Ásia (Deepak, et. al., 2020) demonstraram a
711 capacidade de iniciar o enriquecimento da água com diferentes protozoários, o que torna o
712 ambiente de cultivo mais interessante nutricionalmente para o cultivo de camarões, por
713 exemplo. Conforme estudo realizado por Ballester et al., (2010) a fertilização de um Sistema
714 Bioflocos com o uso de farelo de trigo e melão em proporção C:N de 20:1 foi capaz de
715 estimular o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, filamentosas, flagelados,
716 dinoflagelados, ciliados e rotíferos, além de um pequeno número de diatomáceas penadas.
717 Esse estudo corrobora para demonstrar a capacidade das fontes de carbono em estimular o
718 desenvolvimento abundante de produtividade natural, que em segundo momento, integram a
719 alimentação suplementar dos organismos cultivados.

720 Houve a quantificação de clorofíceas e diatomáceas penadas durante as 24 horas de
721 experimento. Clorofíceas também foram identificadas em estudo conduzido por Wasielesky
722 et al., (2020) no cultivo de *L. vannamei* em Sistema BFT, logo no tempo inicial,
723 demonstrando o seu desenvolvimento natural em ambientes de cultivo com a presença de
724 carbono orgânico.

725 **4.3. Experimento III**

726 As diferenças significativas ($p < 0.05$) de OD para o tempo 00h podem estar
727 relacionadas ao tipo da água, tendo maior presença de oxigênio nos tratamentos com água
728 doce (T1, T3 e T5) e menores taxas iniciais nos tratamentos com água marinha (T2, T4 e T6).
729 O consumo do oxigênio foi significativamente maior no tratamento T5 ($0,1 \pm 0,02$) no tempo
730 final seguido do T6 ($0,22 \pm 0,1$). Ambos os tratamentos também são os que possuem a maior
731 contagem total de bactérias T5 ($7,89 \times 10^7$) e T6 ($6,65 \times 10^7$), o que pode explicar esse maior
732 consumo geral de OD pela maior presença de microrganismos.

733 É possível perceber a menor contagem inicial de *Bacillus* nos tratamentos T3 e T4, o
734 que pode ser explicado pelo fato de que nesses tratamentos não há a inclusão de probiótico
735 comercial. Através da quantificação de *Bacillus*, podemos observar que a utilização do
736 probiótico nos tratamentos T1 e T2 se equiparou com os tratamentos onde o produto não foi
737 incluído, que é o caso dos tratamentos negativos T3 e T4. Ou seja, percebemos que o

738 protocolo não incrementa o desenvolvimento de *Bacillus* nos tratamentos com o produto
739 comercial.

740 O Farelo Bokashi é um composto misto, que pode ser feito através de uma mistura de
741 farelos de origem vegetal (farelo de arroz, trigo etc.), farelos de origem animal (farinha de
742 ossos, carne), fonte energética (açúcar, bagaço de cana etc.) e presença de oleaginosas
743 (Carvalho & Rodrigues, 2007). Comumente utilizado como fertilizante para a fruticultura,
744 passou a ser empregado como efetivo fertilizante na aquicultura, embora ainda não conte com
745 uma fórmula comercial padronizada. O presente experimento demonstra a capacidade da
746 fertilização orgânica com o Farelo Bokashi em favorecer o aparecimento de bactérias
747 *Bacillus*, embora sua contagem final seja estatisticamente igual entre os tratamentos.

748 As bactérias de morfotipo cocoides e filamentosas demonstraram diferenças
749 estatísticas ($p < 0.05$) ao final das 24h obtendo crescimento semelhante entre todos os
750 tratamentos. O oxigênio chegou a taxas próximas a zero durante a execução do experimento,
751 em torno das 12h, não havendo recuperação das taxas de OD, mesmo com o fornecimento
752 mecânico de oxigênio de forma constante. A presença dos microrganismos de forma
753 abundante pode colaborar com o consumo excessivo de OD, pois além de haver o aumento
754 da quantidade de matéria orgânica no meio, eles necessitam do oxigênio para crescer e se
755 multiplicar.

756 Apesar do T3 apresentar a maior diversidade de protozoários no tempo final, sua
757 somatória foi inferior ao T2 que apresentou apenas o crescimento de ciliados e flagelados,
758 somando o maior número total. A maior variedade de protozoários pode estar ligada ao fato
759 do tratamento T3 não contar com a inclusão de probiótico comercial, o qual é composto por
760 bactérias do gênero *Bacillus spp.*, produtoras de bacteriocinas. (Madigan, *et al.*, 2010). Pode
761 existir uma relação direta sobre a menor variedade de protozoários nos tratamentos onde
762 houve a inclusão do probiótico comercial.

763 **4.4. Geral**

764 O desenvolvimento de microrganismos na água depende de diversos fatores como
765 nutrientes disponíveis, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e tempo de cultivo. Cada grupo
766 de bactéria possui suas preferências, como por exemplo os *Bacillus spp.* são mesófilas, tendo
767 seu desenvolvimento entre temperaturas de 10-48 °C. Já as bactérias com morfotipo de

768 cocoides e filamentosas, podem se desenvolver nas mais variadas faixas de temperatura. A
769 temperatura é considerada o fator ambiental mais importante para o crescimento
770 microbiológico. (Madigan, *et al.*, 2010).

771 As bactérias presentes no probiótico comercial são do gênero *Bacillus spp.*, (*B.*
772 *subtilis* e *B. licheniformis*), classificadas como gram-positivas e capazes de esporular, são
773 aeróbicas obrigatórias ou facultativas (Madigan, *et al.*, 2010). De forma geral, dentro das
774 técnicas utilizadas no presente estudo, não há como afirmar que os *Bacillus* que se
775 desenvolveram e cresceram nos tratamentos com a inclusão dos protocolos caseiros, sejam
776 das espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Para que essa identificação seja realizada, a técnica
777 de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) deve ser empregada, pois a mesma possibilita a
778 identificação precisa do gênero/espécie de bactérias através de sondas específicas que se
779 ligam ao material genético da bactéria alvo e que podem também ser visualizadas em
780 microscopia de epifluorescência (Del’Ducca et al., 2013). Durante os experimentos, amostras
781 foram coletadas para análise através do método de FISH, porém o processamento das mesmas
782 ainda não foi realizado.

783 Durante o crescimento e multiplicação de microrganismos aeróbios, é usual a
784 introdução de ar soprado de forma mecânica, pois há o consumo do OD de forma tão rápida
785 que a difusão do oxigênio atmosférico não é capaz de suprir a demanda respiratória dos
786 microrganismos. Os experimentos realizados contaram com fornecimento de ar soprado de
787 forma constante, e apesar deste fornecimento os microrganismos que se desenvolveram
788 foram capazes de consumir oxigênio a ponto de levar os níveis de OD próximos de 0,00mg/L
789 em torno de 12h a 24h. Podemos considerar que o consumo de OD foi devido a rápida
790 proliferação de diferentes grupos bacterianos e de protozoários, os quais dependem de
791 oxigênio para crescer e se multiplicar (Madigan, *et al.*, 2010). Estes resultados indicam que
792 a adição dos produtos fertilizantes dos protocolos pode levar a uma baixa significativa no OD
793 dos sistemas de produção de camarões, podendo afetar seu crescimento ou causar sua morte,
794 a depender da quantidade adicionada.

795 O pH da cultura também pode ser alterado ao longo do crescimento celular, devido
796 às reações metabólicas dos microrganismos que podem consumir ou produzir substâncias
797 ácidas ou básicas. O *B. subtilis* pode produzir, por exemplo, ácido acético (Mazza *et al.*

798 1994). A adição de substâncias tampão é necessária para a manutenção do pH, tais como
799 carbonato de cálcio e bicarbonato de sódio, ambos adicionados nos protocolos testados.

800 Os protocolos testados apresentaram diferenças na composição de seus ingredientes,
801 ocasionando dessa forma, o desenvolvimento de bactérias e protozoários em quantidades
802 distintas em cada experimento. Apesar das diferenças dos produtos, o comportamento de
803 crescimento de grupos de bactérias foi muito semelhante entre os experimentos I, II e III.
804 Todos os experimentos apresentaram crescimento de *Bacillus* significativamente superior no
805 tempo final, quando comparado ao tempo inicial. Também foram quantificadas bactérias
806 cocoides e filamentosas, com crescimento significativamente superior ao final das 24h.

807 Não houve a identificação e quantificação de bactérias do grupo *Vibrio* no começo,
808 ou final dos experimentos realizados. A dosagem do probiótico comercial utilizada nesse
809 estudo (1g/L) foi pelo menos 1000x superior as dosagens recomendadas para fases de
810 berçários (1mg/L) em cultivos de camarões, resultando em 50 milhões de *Bacillus* por mL.
811 Como hipótese, a pressão da abundância de *Bacillus* pode ter excluído totalmente o
812 surgimento de *Vibrios*, ou os valores podem ter ficado abaixo do limite de detecção. Essa
813 ausência também pode ser explicada pelo tempo total do período experimental, que pode ter
814 sido insuficiente para possibilitar o aparecimento de bactérias desse gênero. Santos (2020)
815 quantificou o aparecimento de *Vibrios* ao quinto dia experimental, em um cultivo de *L.*
816 *vannamei* em Sistema Aquamimicry, enquanto o presente estudo teve duração de apenas 1
817 dia.

818 Podemos observar a quantificação do protozooplâncton (flagelados e ciliados),
819 presentes na base da alça microbiana, em todos os experimentos. O ambiente dos cultivos
820 também foi propício para o desenvolvimento de clorofíceas e de diatomáceas penadas, fato
821 que supõe a possibilidade de haver o desenvolvimento de maior diversidade de protozoários
822 em caso de aumento do tempo experimental para além das 24 horas. Santos (2020) ainda
823 quantificou a presença de flagelados, ciliados, amebas, rotíferos e copépodes, com apenas
824 cinco dias de cultivo.

825 Em todos os experimentos (I, II e III) a temperatura da água se mantiveram dentro da
826 faixa ideal de 28-30 °C para o crescimento de *L. vannamei*. O objetivo neste estudo foi manter
827 as temperaturas em níveis semelhantes aos encontrados em fazendas de produção, das quais

828 os protocolos caseiros foram retirados. Em virtude do crescimento rápido dos
829 microrganismos, os níveis de OD sofreram quedas ao longo das 24h, porém esse
830 comportamento já era previsto. O uso de diferentes salinidades, sendo a “água doce” próxima
831 a 0 mg/L e a “água marinha” em torno de 25 mg/L, também teve como objetivo simular as
832 práticas visualizadas nas fazendas. Em algumas localidades, o uso da água doce para a
833 execução da multiplicação de probióticos é mais usual, em contrapartida, a água marinha é
834 muitas vezes utilizada diretamente dos próprios viveiros de cultivo, sem desinfecção prévia.

835 Quando comparamos todos os experimentos entre si, podemos perceber que o
836 experimento que apresentou o tratamento com o maior crescimento total de *Bacillus* foi o
837 Experimento III (tratamento T3), onde a base do protocolo foi o Farelo Bokashi, chegando
838 ao valor de $1,08 \times 10^8$. Mesmo com as diferenças entre os produtos utilizados, o
839 comportamento para o desenvolvimento de *Bacillus* foi muito semelhante em todos os
840 tratamentos controle, independente da salinidade da água, da temperatura e do OD.

841 O ambiente fechado e controlado pode ter tido influência sobre a dinâmica de
842 crescimento das bactérias e de protozoários. Reis et al., (2019) quantificou maior presença de
843 bactérias *Bacillus*, cocoides e filamentosas bem como flagelados, ciliados, amebas e rotíferos
844 em tratamentos expostos à luz quando comparado ao tratamento com restrição luminosa.
845 Pode-se entender que a falta de exposição luminosa nos experimentos deste estudo pode ter
846 prejudicado o desenvolvimento de microrganismos. Não houve trocas entre ambiente interno
847 e externo e não houve interações com animais de cultivo. Durante todo período experimental,
848 houve o cuidado com a desinfecção prévia da sonda multiparamétrica antes de cada medição
849 e antes de cada coleta de água foi realizada a desinfecção da pipeta.

850 O crescimento também pode ter sido limitado pelo tempo total de multiplicação dos
851 protocolos. Com a duração total de 24 horas, a diversidade de microrganismos que se
852 desenvolveram não foi expressiva quando comparamos com cultivos mais longos. Estima-se
853 que realizando o presente estudo com duração superior a 24 horas, algumas diferenças
854 estatísticas podem ser evidenciadas na quantificação de microrganismos entre tratamentos,
855 tanto por conta da possibilidade de maiores interações entre microrganismos como predação
856 e pastagem, como também pela evolução natural da comunidade. Porém, o fato de os
857 experimentos durarem 24 horas se baseia nas práticas das fazendas de cultivo das quais os

858 protocolos foram retirados. A prática contempla a realização dos protocolos de multiplicação
859 de probiótico comercial, diariamente. Ao final de 24 horas, o produto da multiplicação é
860 dividido entre as unidades de cultivo e incluído diretamente na água ou misturado à ração
861 fornecida aos animais.

862 O desenvolvimento de *Bacillus* em todos os tratamentos pode demonstrar a
863 capacidade dos protocolos caseiros em colaborar com o crescimento de *Bacillus* na água de
864 cultivo, em 24h. Porém, esses produtos não são capazes de incrementar a quantificação de
865 *Bacillus* quando agindo em conjunto com o probiótico comercial. Esse fato pode confirmar
866 que o desenvolvimento das bactérias *Bacillus* independe dos produtos adicionados à água,
867 pois não houve diferenças estatísticas no tempo final entre tratamentos.

868 A estrutura de microrganismos foi similar em todos os experimentos realizados,
869 demonstrando que o desenvolvimento da alça microbiana obteve o comportamento
870 semelhante independente da salinidade e dos produtos adicionados à água. A abundância
871 inicial de microrganismos, já no tempo 00h logo após a inclusão dos produtos na água, pode
872 estar ligada a possibilidade da técnica de desinfecção usada não ter sido eficiente para
873 eliminar a totalidade dos microrganismos presentes na água natural.

874 As faixas ótimas de salinidade utilizadas pela maioria das bactérias e protozoários
875 pode ser bem ampla, sendo o uso de águas naturais um importante inóculo (Loureiro et al.,
876 2012) que auxilia na formação de uma comunidade microbiana diversa, capaz de assimilar
877 os nutrientes disponíveis. O crescimento de protozoários pode ser observado em baixas
878 salinidades, com contagem significativa de células por mL (Maicá, et al., 2012).

879 É importante perceber o aparecimento de flagelados em todos os experimentos, uma
880 vez que estes protozoários são consumidores de bactérias e fitoplâncton, posteriormente
881 servindo também como fonte alimentar para organismos maiores (Sherr e Sherr, 2002). Os
882 ciliados não apareceram em todos os tratamentos, mas também perfazem um grupo
883 importante de protozoários para a sequência da alça microbiana (Nagano e Decamp, 2004).
884 Como houve pouca quantificação de ciliados, a ausência de nematoides pode ser explicada,
885 uma vez que a abundância desses protozoários é dependente da presença de ciliados (Ray et
886 al., 2010).

887 A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos observar que os referidos
888 protocolos que visualizamos em fazendas de cultivo, realizados de forma empírica, não
889 demonstraram eficácia científica. As contagens realizadas demonstraram que a intenção de
890 aumentar o volume das bactérias probióticas presentes no produto comercial Sanolife Pro-
891 W®, (INVE Aquaculture) valendo-se do uso de produtos variados, (leite em pó, melaço,
892 farelo de arroz, farelo bokashi, açúcar) a fim de disponibilizar fonte de alimento para as
893 bactérias presentes no produto comercial, não foi eficaz. Por esse motivo, é válido ressaltar a
894 importância de entender os mecanismos de ação dos probióticos comerciais e investigar a
895 eficácia de práticas empíricas, para que o produtor não desperdice recursos financeiros com
896 técnicas que não funcionam.

897 Validar de forma científica e séria as práticas utilizadas em diferentes fases da
898 produção animal, traz maior segurança no momento de decisão do produtor, bem como a
899 certeza do que se está praticando. Como última análise, outros protocolos caseiros são
900 realizados em fazendas de cultivo de camarões, porém a eficácia de suas aplicações será
901 indefinida até que se teste cientificamente.

902

903 **5. CONCLUSÕES**

904 Ao final dos experimentos realizados, concluímos que os protocolos utilizados não
905 foram capazes de reproduzir as bactérias presentes no probiótico comercial Sanolife Pro-W®
906 (INVE Aquaculture), pois não houve o incremento estatisticamente superior de bactérias
907 *Bacillus* no tempo final, tanto para a água doce quanto para a água marinha, em nenhum
908 tratamento. Porém, não podemos afirmar que o aparecimento de *Bacillus* nos experimentos
909 é proveniente exclusivamente do produto comercial. Também é possível concluir que os
910 protocolos em questão não foram capazes de favorecer o aparecimento de bactérias do gênero
911 *Vibrio*. A quantificação de protozoários demonstrou a capacidade de cada protocolo em
912 enriquecer o meio em apenas 24 horas.

913

914 **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

915 Para completar as informações aqui apresentadas, a técnica de FISH deve ser
916 realizada para elucidar de forma concreta a origem das bactérias do gênero *Bacillus* em cada

917 tratamento. Outros estudos devem ser realizados para elucidar a ação de protocolos caseiros
918 de multiplicação de probióticos comerciais com mais tempo experimental como também seus
919 possíveis efeitos sobre animais de cultivo.

920 **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 921 AGUILERA-RIVERA, D. *et al.* Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white
922 shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 424–425, 215–219. 2014.
923 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.008>
- 924 AVNIMELECH, Y. Biofloc technology – A practical guide book. The World Aquaculture.
925 2015. <https://doi.org/10.13140/2.1.4575.0402>
- 926 BALCÁZAR, J.L. *et al.* The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol. 114, 173–186.
927 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- 928 CARVALHO, J. O. M.; RODRIGUES, C. D. S. Bokashi: composto fermentado para a
929 melhoria da qualidade do solo. Cartilha. EMBRAPA. Porto Velho, Rondônia, 2007.
- 930 CHATTERJEE, S., HALDAR, S. *Vibrio* Related Diseases in Aquaculture and Development
931 of Rapid and Accurate Identification Methods. J Marine Sci Res Dev S1:002. 2012.
932 <https://doi.org/10.4172/2155-9910.s1-002>
- 933 DECAMP, O., MORIARTY, D.J.W., LAVENS, P. Probiotics for shrimp larviculture:
934 Review of field data from Asia and Latin America. Aquac. Res. 39, 334–338. 2008.
935 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x>
- 936 DEEPAK, A.P., *et al.* Aquamimicry: New an innovative approach for sustainable
937 development of aquaculture. Journal of Entomology and Zoology Studies, E-ISSN:
938 2320-7078. 8(2): 1029-1031. 2020.
- 939 GAO, P., *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance
940 genes in aquaculture environment. Water research, v. 46, n. 7, p. 2355-2364, 2012.
941 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.004>
- 942 GAREAU, M.G., SHERMAN, P.M., WALKER, W.A. Probiotics and the gut microbiota in
943 intestinal health and disease. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 7, 503–514. 2010.
944 <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>
- 945 GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180, 147–165. 1999.
946 [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)
- 947 HAN, J.E. *et al.* Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus*
948 associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. Aquac.
949 Reports 2, 17–21. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.04.003>
- 950 HOBBIIE, J.E., DALEY, R.J., JASPER, S., Use of nuclepore filters for counting bacteria by
951 fluorescence microscopy. Applied and environmental microbiology. 1977.
- 952 HOSTINS, B. *et al.* Managing input C/N ratio to reduce the risk of Acute Hepatopancreatic
953 Necrosis Disease (AHPND) outbreaks in biofloc systems – A laboratory study.
954 Aquaculture 508, 60–65. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.055>
- 955 JANTARATHIN, S., BOROMPICHAICHARTKUL, C., SANGUANDEEKUL, R.

- 956 Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its
 957 effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Mater. Today Proc.* 4, 6166–
 958 6172. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.111>
- 959 KRUMMENAUER, D. *et al.* The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc
 960 Culture System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Aquac.* 26, 370–379.
 961 2014a. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.965575>
- 962 KRUMMENAUER, D. *et al.* The reuse of water on the culture of pacific white shrimp,
 963 *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. *J. World Aquac. Soc.* 45, 3–14. 2014b.
 964 <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- 965 LAZADO, C.C. *et al.* In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and
 966 their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Vet. Microbiol.* 148,
 967 252–259. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.024>
- 968 LIGHTNER, D. V. Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC handbook of mariculture*, v.
 969 1, p. 393-486. 1993.
- 970 LOUREIRO, K.C., WASIELESKY, W.J., ABREU, P.C. The use of Protozoan, Rotifers and
 971 Nematodes as live food for shrimp raised in BFT System. *Atlântica*, 34: 5-12. 2012.
 972 <https://doi.org/10.5088/atlantica.v34i1.2698>
- 973 MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK,
 974 D.P. *Microbiologia de Brock*. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 1160 p. 2010.
- 975 MAICÁ, P.F., BORBA, M.R., WASIELESKY, W. Effect of low salinity on microbial floc
 976 composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a
 977 zero-water exchange super-intensive system. *Aquaculture research*. 30(43): 361-370.
 978 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02838.x>
- 979 MAZZA, Piergiorgio. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal
 980 microorganism. *Bollettino chimico farmaceutico*, v. 133, n. 1, p. 3-18, 1994.
- 981 MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds.
 982 *Aquaculture* 164, 351–358. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
- 983 MOURINO, JLP. *et al.* Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus*
 984 (Wakabayashi *et al.* 1986) in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone,
 985 1931. *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 68, n. 1, p. 173-177, Feb. 2008.
 986 <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100025>
- 987 NAGANO, N., DECAMP, O. Ingestion of a ciliated protozoa by first-feeding larval stage of
 988 pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 35: 516-
 989 518. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01043.x>
- 990 RAY, A.J., LEWIS, B.L., BROWDY, C.L., LEFFLER, J.W. 2010. Suspended solids removal
 991 to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-
 992 based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299(1-
 993 4): 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>

- 994 REIS, W.G., *et al.* Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)
 995 in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water
 996 quality and zootechnical performance. *Aquaculture*, 508: 19-29. 2019.
 997 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.067>
- 998 RINGØ, E. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*. v. 5, p. 1-27, 2020.
 999 <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001>
- 1000 ROEVER, C.D. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce.
 1001 *Food Control*, 10-2, 117-143. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00026-2)
- 1002 RUSSELL, A.D. Do Biocides Select for Antibiotic Resistance? *J. Pharm. Pharmacol.* 52,
 1003 227–233. 2000. <https://doi.org/10.1211/0022357001773742>
- 1004 SAMOCHA, T. M. *et al.* Design and Operation of Super Intensive, Biofloc-Dominated
 1005 Systems for Indoor Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The
 1006 Texas A&M AgriLife Research Experience. The World Aquaculture Society, Baton
 1007 Rouge, Louisiana, EUA. 368p. 2017.
- 1008 SANTOS, S. Sistema Aquamimicry: Cultivo de *Litopenaeus vannamei* em diferentes
 1009 densidades de estocagem. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade
 1010 Federal do Rio Grande (FURG). Rio Grande, RS. p. 58. 2020.
- 1011 TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water*
 1012 *Research*, v. 33, n. 17, p. 3545-3556, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0043-](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00071-8)
 1013 [1354\(99\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00071-8)
- 1014 UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Int.*
 1015 *Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Kom. für Limnol. Methoden* 9, 1–39. 1958.
- 1016 VAN WYK, P., SCARPA J. 1999. Water quality requirements and management. In: *Farming*
 1017 *Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems* (Ed. by P. Van Wyk). Florida
 1018 Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL, 128-138.
- 1019 VIDAL, J. M. A., *et al.* Probiotic potential of *bacillus cereus* against *vibrio spp.* in post larvae
 1020 shrimps. *Rev. Caatinga, Mossoró*, v. 31, n. 2, p. 495 - 503. 2018.
- 1021 VIEIRA, F. N. *et al.* 2016. Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp
 1022 farm. *R. Bras. Zootec.*, 45-5, 203-207. [https://doi.org/10.1590/S1806-](https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000500001)
 1023 [92902016000500001](https://doi.org/10.1590/S1806-92902016000500001).
- 1024 WANG, H. *et al.* Pseudoalteromonas probiotics as potential biocontrol agents improve the
 1025 survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease
 1026 (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, v. 494, p. 30-36, 2018.
 1027 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.020>
- 1028 WASIELESKY, W., *et al.* Effect of feeding frequency on the white shrimp *Litopenaeus*
 1029 *vannamei* during the pilot-scale nursery phase of a superintensive culture in a biofloc
 1030 system. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 51. p. 1175-1191. 2020.
 1031 <https://doi.org/10.1111/jwas.12694>

- 1032 ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 5.ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice-Hall, 944
1033 p. 2010.
- 1034 ZHANG, Y. BIN, LI, Y., SUN, X.L. Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp
1035 hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. Mar. Pollut. Bull. 62, 2299–
1036 2307. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.048>
- 1037 ZHOU, X., WANG, Y., LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*)
1038 based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287,
1039 349–353. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.046>
- 1040 ZOKAEIFAR, H. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive
1041 enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus*
1042 *vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 33, 683–689. 2012.
1043 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>
- 1044