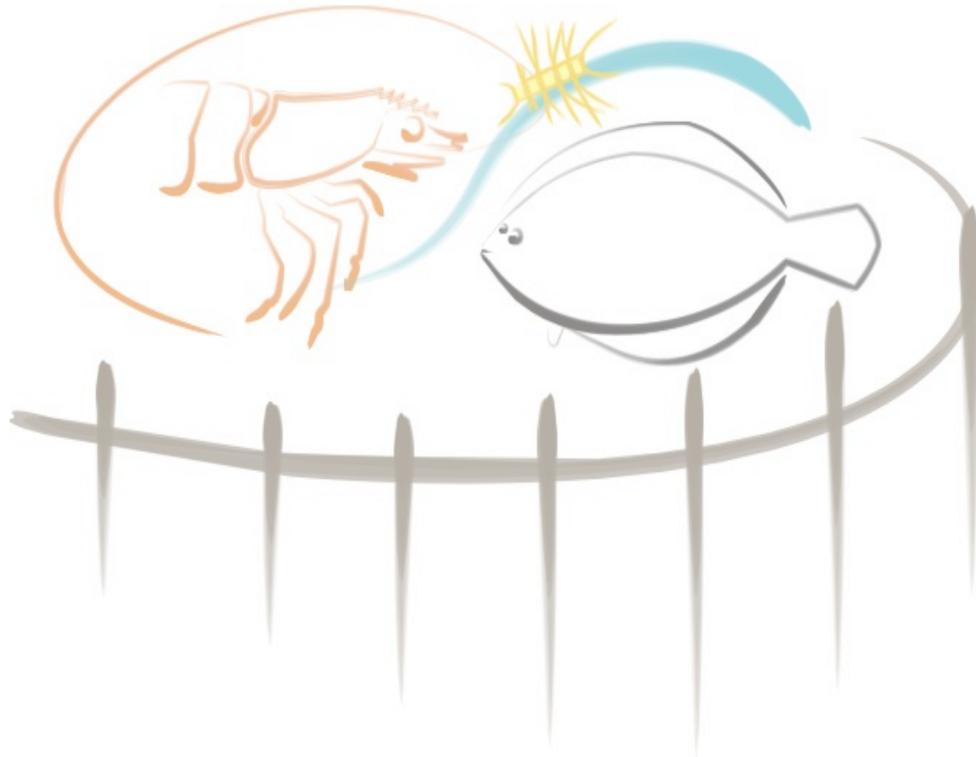




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**USO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NAS FASES DE BERÇÁRIO E
ENGORDA DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Penaeus vannamei* EM
SISTEMA BFT E EM ÁGUA CLARA**

Aline da Costa Bezerra

Rio Grande, 2025

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**Uso de bactérias probióticas nas fases de berçário e engorda do camarão branco do
Pacífico *Penaeus vannamei* em sistema BFT e em água clara**

Discente: Aline da Costa Bezerra
Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Jr
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Dionéia Cesar

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutora em Aquicultura no Programa
de Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande/RS
Abril de 2025

Ficha Catalográfica

B574u Bezerra, Aline da Costa.
Uso de bactérias probióticas nas fases de berçário e engorda do camarão branco do Pacífico *Penaeus vannamei* em sistema BFT e em água clara / Aline da Costa Bezerra. – 2025.
130 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2025.

Orientador: Dr. Wilson Wasielesky Jr.

Coorientadora: Dra. Dionéia Cesar.

1. *Bacillus subtilis* 2. *Lactobacillus plantarum* 3. *Pediococcus acidilactici* 4. Hibridização 5. Microbiota 6. Intestino 7. Colonização 8. Bioflocos 9. Produtividade I. Wasielesky Jr, Wilson II. Cesar, Dionéia III. Título.

CDU 639.512

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

ATA 10/2025

ATA DE DEFESA DA 93^a TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA

No dia vinte e nove de abril de dois mil e vinte e cinco, às quatorze horas e trinta minutos, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, de **ALINE DA COSTA BEZERRA**, orientada pelo Prof. Dr. Wilson Wasielesky (IO/FURG), composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Wilson Wasielesky (Orientador – IO/FURG), Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar (Coorientadora – UFJF), Profa. Dra. Gabriele Rodrigues de Lara (PUCV/CHILE), Prof. Dr. Luciano Vaz Jensen (UFOPA) e Prof. Dr. Geraldo Kipper Fôes (IO/FURG). Título da Tese: **“USO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA FASE DE BERÇÁRIO E ENGORDA NO CULTIVO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Penaeus vannamei* EM SISTEMA BFT E EM ÁGUA CLARA”**. Dando início à defesa, o vice-coordenador do PPGAq Prof. Dr. Ronaldo Cavalli, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Wilson Wasielesky, que na qualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Tese. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da Tese, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **ALINE DA COSTA BEZERRA** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva da Tese 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, pela candidata e pelo Coordenador do PPGAq.



Documento assinado digitalmente
WILSON FRANCISCO BRITTO WASIELESKY JUNI
Data: 08/05/2025 15:55:39-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

PROF. DR. WILSON WASIELESKY (ORIENTADOR – IO/FURG)

PROF^a. DR^a. DIONÉIA EVANGELISTA CESAR (COORIENTADORA – UFJF)



Documento assinado digitalmente
DIONEIA EVANGELISTA CESAR
Data: 09/05/2025 09:08:50-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>



Firma eletrônica avançada
GABRIELE RODRIGUES
DE LARA
2025.05.12 11:02:18 -0400

PROF^a. DR^a. GABRIELE RODRIGUES DE LARA (PUCV/CHILE)



Documento assinado digitalmente
LUCIANO JENSEN VAZ
Data: 09/05/2025 08:39:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

PROF. DR. LUCIANO VAZ JENSEN (UFOPA)

ALINE DA COSTA BEZERRA

Documento assinado digitalmente
ALINE DA COSTA BEZERRA
Data: 09/05/2025 10:19:40-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>



Documento assinado digitalmente
RONALDO OLIVEIRA CAVALLI
Data: 05/05/2025 10:19:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

PROF. DR. RONALDO CAVALLI (VICE-COORDENADOR DO PPGAq)

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	14
Objetivo Geral.....	14
Objetivos Específicos.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO I: USO DE DIFERENTES BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA ENGORDA DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO <i>Penaeus vannamei</i> EM SISTEMA SUPERINTENSIVO	19
Resumo	19
Abstract.....	20
Introdução	21
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos.....	23
Material e Métodos	23
<i>Condições experimentais</i>	23

<i>Delineamento experimental</i>	24
<i>Aplicação dos probióticos e alimentação</i>	25
<i>Qualidade da água</i>	25
<i>Desempenho Zootécnico</i>	25
<i>Identificação das bactérias probióticas</i>	26
<i>Curvas de crescimento bacteriano</i>	26
<i>Testes de sensibilidade antimicrobiana (antagonismo)</i>	27
<i>Contagem diferencial de hemócitos (CDH)</i>	27
<i>Análise estatística</i>	27
Resultados	28
<i>Qualidade da água</i>	28
<i>Desempenho Zootécnico</i>	30
<i>Identificação das bactérias</i>	32
<i>Curvas de crescimento bacteriano</i>	33
<i>Teste de sensibilidade antimicrobiana (antagonismo)</i>	36
<i>Contagem diferencial de hemócitos (CDH)</i>	37
Discussão	38
Conclusões	43
Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO II: UTILIZAÇÃO DE MIX PROBIÓTICO E MANEJO DE APLICAÇÃO NO CULTIVO SUPERINTENSIVO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO <i>Penaeus vannamei</i> NA FASE DE BERÇÁRIO	51

Resumo	51
Abstract	52
Introdução	53
Objetivo Geral.....	56
Objetivos Específicos.....	56
Material e Métodos	56
<i>Condições experimentais</i>	56
<i>Sistema em água clara (AC) e Sistema de Bioflocos (BFT)</i>	57
<i>Delineamento experimental</i>	57
<i>Aplicação dos probióticos e alimentação</i>	58
<i>Qualidade da água</i>	58
<i>Desempenho Zootécnico</i>	58
<i>Avaliação da comunidade microbiana</i>	59
<i>Análise de Hibridização in situ Fluorescente (FISH)</i>	59
<i>Análise Estatística</i>	60
Resultados	61
<i>Qualidade da água</i>	61
<i>Desempenho Zootécnico</i>	65
<i>Avaliação da comunidade microbiana</i>	67
<i>Análise de Hibridização in situ Fluorescente (FISH)</i>	68
Discussão	72

Conclusões	76
------------------	----

Referências Bibliográficas	77
----------------------------------	----

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO ENTRE ENGORDA SEMI-INTENSIVA E SUPERINTENSIVA DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Penaeus vannamei*: AVALIAÇÃO DO USO DE MIX PROBIÓTICO NOS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO..... 87

Resumo	87
--------------	----

Abstract	88
----------------	----

Introdução	89
------------------	----

Objetivo Geral.....	91
---------------------	----

Objetivos Específicos.....	91
----------------------------	----

Material e Métodos	92
--------------------------	----

<i>Condições experimentais</i>	92
--------------------------------------	----

<i>Delineamento experimental 1 (Engorda Semi-intensiva)</i>	92
---	----

<i>Delineamento experimental 2 (Engorda Superintensiva)</i>	93
---	----

<i>Aplicação do mix probiótico e alimentação</i>	94
--	----

<i>Qualidade da água</i>	94
--------------------------------	----

<i>Desempenho Zootécnico</i>	94
------------------------------------	----

<i>Análise da comunidade microbiana</i>	94
---	----

<i>Análise de Hibridização in situ Fluorescente (FISH)</i>	95
--	----

<i>Análise estatística</i>	96
----------------------------------	----

Resultados Engorda 1 Semi-intensiva	97
---	----

<i>Qualidade da água</i>	97
<i>Desempenho Zootécnico</i>	99
<i>Composição da comunidade microbiana</i>	100
<i>Abundância bacteriana</i>	101
Resultados Engorda 2 Superintensiva.....	101
<i>Qualidade da água</i>	101
<i>Desempenho Zootécnico</i>	105
<i>Composição da comunidade microbiana</i>	105
<i>Abundância bacteriana</i>	107
Discussão	110
Conclusões	112
Referências Bibliográficas	112
Conclusões gerais	118
Perspectivas futuras	119

1 LISTA DE TABELAS

2 CAPÍTULO I

3

4 Tabela 1 - Médias (\pm desvio padrão) dos parâmetros físico e químicos da água na engorda
5 de *P. vannamei* em sistema de água clara com aplicação de diferentes espécies de
6 bactérias probióticas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus*
7 *acidilactici*) em diferentes vias de aplicação (apenas na ração, apenas na água e em ambos
8 - na ração e água), durante 49 dias de experimento.....28

9

10 Tabela 2 – Médias (\pm desvio padrão) dos parâmetros zootécnicos durante 49 dias de
11 experimento de engorda em água clara com diferentes bactérias probióticas e diferentes
12 vias de aplicação. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas
13 ($p < 0,05$).....31

14

15 Tabela 3 – Características das colônias, morfologia celular e comparação com dados
16 disponíveis no GenBank das bactérias probióticas isoladas do mix comercial e usadas no
17 presente experimento.....33

18

19 Tabela 4 – Teste de antagonismo in vitro das bactérias probióticas isoladas e do mix
20 probiótico contra bactérias patogênicas. EC=*Escherichia coli*; AS=*Staphylococcus*
21 *aureus*; SS=*Salmonella* sp; VP=*Vibrio parahaemolyticus*; PF=*Pseudomonas fluorescens*
22 e AH=*Aeromonas hydrophila*.....37

23

24 Tabela 5 – Contagem diferencial de hemócitos, dividido em contagem total de hemócitos,
25 hemócitos hialinos (%) e hemócitos granulares (%) ao final do período experimental nos
26 diferentes tratamentos.....38

27

28 CAPÍTULO II

29

30 Tabela 1 - Sondas de oligonucleotídeos para identificação de diferentes grupos
31 bacterianos usados neste estudo. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo
32 Cy3.....60

33

34 Tabela 2 – Média (\pm desvio padrão) dos valores médios encontrados para parâmetros
35 físico e químicos da qualidade da água monitorados durante 35 dias de berçário de *P.*
36 *vannamei* em sistema superintensivo em água clara e sistema de bioflocos nos diferentes
37 tratamentos.....61

38

39 Tabela 1 – Média (\pm desvio padrão) dos valores médios dos parâmetros de desempenho
40 zootécnico ao final de 35 dias de berçário de *P. vannamei* em sistema superintensivo em
41 água clara e sistema de bioflocos entre os diferentes tratamentos.....66

42

43 Tabela 4 – Médias (\pm desvio padrão) dos microrganismos encontrados ao final dos 35 dias
44 de berçário de *P. vannamei* em sistema superintensivo em água clara e bioflocos nos
45 diferentes tratamentos.....68

46

47 Tabela 5 – Média (\pm desvio padrão) da abundância bacteriana total (Dapi), de *Bacillus*
48 *subtilis* e bactérias ácido lácticas na água e no intestino de *P. vannamei* ao final dos 35

49	dias de berçário em sistemas superintensivo em água clara e bioflocos nos diferentes	
50	tratamentos.....	70

51

CAPÍTULO III

52

54	Tabela 1 - Sondas de oligonucleotídeos para identificação de diferentes grupos	
55	bacterianos usados neste estudo. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo	
56	Cy3.....	97

57

58	Tabela 2 – Parâmetros de qualidade da água (média±desvio padrão) nos tratamentos:	
59	Probióticos (PROB) e Controle (CTL) ao longo dos 63 dias de experimento em engorda	
60	semi-intensiva.....	98

61

62	Tabela 3 – Desempenho zootécnico (média±desvio padrão) do <i>P. vannamei</i> ao final do	
63	período experimental de 63 dias na engorda semi-intensiva nos tratamentos Probióticos	
64	(PROB) e Controle (CTL).....	101

65

66	Tabela 4 – Parâmetros de qualidade da água (média±desvio padrão) nos diferentes	
67	tratamentos, ao longo dos 63 dias de experimento em engorda superintensiva.....	103

68

69	Tabela 5 - Desempenho zootécnico (média±desvio padrão) do <i>P. vannamei</i> ao final do	
70	período experimental de 63 dias na engorda superintensiva nos diferentes	
71	tratamentos.....	106

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

73

74

75	Figura 1 – Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (a) e nitrito (b) durante 49	
76	dias de experimento de engorda em água clara com diferentes bactérias probióticas e	
77	diferentes vias de aplicação. Médias e desvios padrão são mostrados nos gráficos.....	29

78

79	Figura 2 – Concentração de sólidos suspensos totais (a) (mg/L) e concentrações de fosfato	
80	(b) ($P-PO_4^{3-}$ mg/L) ao final do período experimental de engorda em água clara com	
81	diferentes bactérias probióticas e diferentes vias de aplicação. Médias e desvios padrão	
82	são mostrados no gráfico. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).....	30

83

84	Figura 3 – Peso médio final (g) ao final de 49 dias de engorda em água clara, tratamentos:	
85	CTL=Controle, BS PA= <i>Bacillus subtilis</i> na água, BS PR= <i>Bacillus subtilis</i> na ração, BS	
86	PRA= <i>Bacillus subtilis</i> na ração e água, LP PA= <i>Lactobacillus plantarum</i> na água, LP	
87	PR= <i>Lactobacillus plantarum</i> na ração, LP PRA= <i>Lactobacillus plantarum</i> na ração e	
88	água, PED PA= <i>Pediococcus acidilactici</i> na água, PED PR= <i>Pediococcus acidilactici</i> na	
89	ração, PED PRA= <i>Pediococcus acidilactici</i> na ração e água.....	32

90

91	Figura 4 – Densidade óptica medida em absorbância (a) e contagem de organismos/mL	
92	(106) (b), usando os diferentes isolados em meio Todd específico para crescimento	
93	bacteriano em forma líquida, ao longo de 48h em temperatura de 30°C constante.....	34

94

95	Figura 5 - Densidade óptica medida em absorbância (a) e contagem de organismos/mL	
96	(106) (b), usando os diferentes isolados em água marinha filtrada (30 g/L), ao longo de	
97	48h em temperatura de 30°C constante.....	35
98		
99	Figura 6 - Densidade óptica medida em absorbância de ambos isolados probióticos e do	
100	mix em água clara (marinha) e água clara sem adição de probióticos (a). Densidade óptica	
101	medida em absorbância do mix probiótico em água clara (marinha) e em água contendo	
102	nutrientes dos bioflocos (BFT) (b), ao longo de 48h em temperatura de 30°C constante..	36
103		
104	CAPÍTULO II	
105		
106	Figura 1 – Variação temporal do pH durante os 35 dias de berçário no sistema em água	
107	clara (AC) e sistema de bioflocos (BFT) nos diferentes tratamentos.....	62
108		
109	Figura 2 – Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (NA-T) (a) e nitrito (N-NO ₂)	
110	(b) durante os 35 dias de berçário nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são	
111	mostrados nos gráficos.....	63
112		
113	Figura 3 – Variação temporal do nitrato (N-NO ₃) (a), fosfato (PO ₄ -3) (b), alcalinidade	
114	(CaCo ₃) (c) e sólidos suspensos totais (mg/L) (d) ao longo das 5 semanas de berçário nos	
115	diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.....	64
116		
117	Figura 4 – Valores médios e desvio padrão do peso final (g) dos camarões ao fim dos 35	
118	dias de berçário nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças	
119	significativas (p<0,05) entre os tratamentos.....	67
120		
121	Figura 5 – Abundância de microrganismos (média±desvio padrão) presentes no sistema	
122	em água clara e sistema de bioflocos ao final do berçário de 35 dias. Divididos em	
123	flagelados (a), ciliados (b), rotíferos (c), nematoides (d) e microalgas (e). Letras diferentes	
124	expressam diferença significativa (p<0,05).....	69
125		
126	Figura 6 – Abundância bacteriana total (a), <i>Bacillus subtilis</i> (b) e bactérias ácido lácticas	
127	(c), presentes na água de cultivo e no intestino dos camarões ao final do berçário de 35	
128	dias.....	71
129		
130	Figura 7 – Médias (±desvio padrão) da abundância bacteriana total na água (a),	
131	abundância bacteriana total no intestino (b), <i>Bacillus subtilis</i> na água (c), <i>Bacillus subtilis</i>	
132	no intestino (d), bactérias ácido lácticas na água (e) e bactérias ácido lácticas no intestino	
133	(f) ao final dos 35 dias de berçário.....	72
134		
135	CAPÍTULO III	
136		
137	Figura 1 – Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (N-AT) (a), nitrito (N-NO ₂)	
138	(b) e nitrato (N-NO ₃) (c) ao longo de nove semanas durante a fase de engorda semi-	
139	intensiva do <i>P. vannamei</i> , nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são	
140	mostrados nos gráficos.....	99
141		
142	Figura 2 – Variação temporal de sólidos suspensos totais (SST) (a) e turbidez (NTU) (b)	
143	ao longo de nove semanas durante a fase de engorda semi-intensiva do <i>P. vannamei</i> , nos	
144	diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.....	100

145	
146	Figura 3 – Composição da comunidade de microrganismos (média±desvio padrão)
147	encontrados ao final do experimento da fase de engorda semi-intensiva do <i>P. vannamei</i> ,
148	em todos os tratamentos.....101
149	
150	Figura 4 – Abundância total das bactérias probióticas (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i>
151	<i>plantarum</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i>) ao final do experimento da fase de engorda semi-
152	intensiva do <i>P. vannamei</i> nos diferentes tratamentos nas condições de presença na água
153	de cultivo e no intestino dos camarões.....102
154	
155	Figura 5 - Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (N-AT) (a), nitrito (N-NO ₂)
156	(b) e nitrato (N-NO ₃) (c) ao longo de nove semanas durante a fase de engorda
157	superintensiva do <i>P. vannamei</i> , nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são
158	mostrados nos gráficos.....104
159	
160	Figura 6 - Variação temporal de sólidos suspensos totais (SST) (a) e turbidez (NTU) (b)
161	ao longo de nove semanas durante a fase de engorda superintensiva do <i>P. vannamei</i> , nos
162	diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.....105
163	
164	Figura 7 - Composição da comunidade de microrganismos (média±desvio padrão)
165	encontrados ao final do experimento da fase de engorda superintensiva do <i>P. vannamei</i> ,
166	em todos os tratamentos.....108
167	
168	Figura 8 - Abundância total das bactérias em Dapi (a), <i>Bacillus subtilis</i> (b) e bactérias
169	ácido lácticas (c) na água e no intestino ao final do experimento da fase de engorda
170	superintensiva do <i>P. vannamei</i> nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são
171	mostrados nos gráficos.....110
172	
173	
174	
175	
176	
177	
178	
179	
180	
181	
182	
183	
184	
185	
186	
187	
188	
189	
190	
191	
192	
193	
194	

195 **DEDICATÓRIA**

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220 Dedico esta tese a minha mãe Rosangela, meu pai Lucas e
221 toda minha família por sempre me apoiarem ao longo da minha
222 caminhada e que nunca deixaram de me incentivar. Gratidão
223 eterna.

224

225

226 **AGRADECIMENTOS**

227 A Deus e todos os Orixás.

228

229 Ao meu orientador Wilson Wasielesky, se essa tese existe e está se tornando realidade
230 definitivamente é por ele, pessoa incansável que mesmo quando eu não acreditava mais
231 em mim, me apoiava e mostrava a luz no fim do túnel. Além de professor e orientador,
232 foi psicólogo, analista, consultor de carreira e um grande amigo. Sua paixão pela pesquisa
233 e pela EMA inspira a todos nós que convivemos com esse grande pesquisador e professor.
234 Nunca existirão palavras para expressar minha gratidão.

235

236 À minha co-orientadora Dionéia Cesar, que é uma mulher tão forte e gentil, sempre me
237 apoiando e incentivando com sua compreensão e muitas vezes mostrando a realidade que
238 estava bem na minha frente.

239

240 À banca examinadora por aceitar o convite e desafio.

241

242 Ao professor Dariano Krummenauer, além de ser meu primeiro orientador foi a pessoa
243 que me chamou e disse que nada estava acabado, me ajudou com conselhos,
244 oportunidades e muitas análises no Lemaqui. Tivemos nossas diferenças no início e
245 acredito que elas nos tornaram pessoas melhores ao longo dos anos.

246

247 Ao professor Luis Poersch sempre com sua paciência e compreensão que muitas vezes
248 tinha sempre uma frase de apoio e que muito me ajudou. Ao professor Geraldo Fôes, por
249 sua amizade e discussões acadêmicas. Ao técnico Alessandro Cardozo, desde a
250 larvicultura a despesca sempre ajudando e apoiando. Muito obrigada a todos!!

251

252 À minha família que foi meu pilar durante esses longos anos, minha mãe Rosângela, meu
253 pai Lucas, minha avó Helena, minha prima Alessandra, minha tia Dulce, meu tio Edir,
254 todos familiares próximos, compadres e afilhados. À minha família espiritual e ao Pai
255 Pedro. As minhas amigas Camila e Mariana por nossa eterna amizade e apoio
256 incondicional em cada uma de nossas escolhas nessa vida.

257

258 À toda equipe do Projeto Camarão que são minha segunda família e amigos para o resto
259 da vida, com eles aprendi que nada se faz sozinho e sempre contar com apoio de alguém
260 nos faz crescer. A todos professores e técnicos do PPGAqui, seus ensinamentos são para
261 sempre, a importância de cada um de vocês segue com cada profissional formado pela
262 FURG. Ao atendimento médico e apoio psicológico da FURG.

263

264 Aos meus amigos, se tem uma coisa que eu conquistei nesses anos de FURG foram meus
265 amigos e amigas. A velha guarda Gabi, Babu, Júlio, Joca, Dedé, Gabriel, João, Sabrina,
266 Manuel, Mari e Lucélia. E a nova geração Helly, Marília, Inácio, Cynthia, Bianca, Rayssa,
267 Andrezza e todo pessoal. Cada um tem um espaço importante na minha vida. Valeu cada
268 despesca, estocagem, biometria, coleta, curso, congresso e cada churrasco do PC.

269

270 Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq, FAPERGS, FINEP e Projeto Astral pela
271 concessão de bolsa e recursos concedidos que tornaram essa pesquisa realidade.

272

273 Minha Praia do Cassino, minha casa e meu lar. Muito obrigada. Odoyá. Axé.

274 RESUMO GERAL

275 Com a intensificação da produção na aquicultura, o sucesso da produtividade está
276 relacionado com as condições do cultivo, manejo e ambiente de produção. Nesse cenário,
277 as bactérias probióticas surgem como uma alternativa sustentável, são definidas como
278 microrganismos vivos que promovem benefícios ao hospedeiro por meio da modulação
279 da microbiota intestinal e ambiental, resultando em melhor desempenho zootécnico,
280 resposta imunológica e qualidade da água. Essa tese teve o objetivo de avaliar diferentes
281 bactérias probióticas comerciais em diferentes fases de produção, berçário e engorda, em
282 diferentes cultivos, água clara e sistema de bioflocos e diferentes sistemas,
283 superintensivos e intensivos de produção. Foram utilizadas cepas de *Bacillus subtilis*,
284 *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* isoladas e em mix comercial. Foram
285 desenvolvidos três capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar o efeito de
286 diferentes bactérias probióticas isoladas e estratégias de aplicação na qualidade da água,
287 desempenho zootécnico do *Penaeus vannamei*, na fase de engorda em sistema
288 superintensivo, avaliando individualmente o comportamento dos probióticos em
289 diferentes condições de cultivo, seus efeitos de antagonismo com bactérias patogênicas e
290 efeito sobre o sistema imune dos camarões. O experimento teve duração de 49 dias. Não
291 foram observadas diferenças na qualidade da água. Para dados de desempenho zootécnico
292 (peso final e produtividade) foram observadas diferenças significativas, onde os
293 tratamentos com *B. subtilis* adicionado na ração e na água demonstraram maiores valores
294 (8,75g e 0,81kg/m²), enquanto *L. plantarum* e *P. acidilactici* obtiveram resultados de
295 peso final e produtividade satisfatórios, porém inferiores aos bacilos. Ambos os bacilos e
296 as bactérias ácido lácticas foram capazes de crescer em salinidade 30 e temperatura de
297 30°C. O uso do probiótico com a mistura de diferentes bactérias mostrou-se eficaz contra
298 diversos patógenos comuns de sistemas de aquicultura. O segundo capítulo teve como
299 objetivo avaliar a eficácia do uso do mix probiótico em berçário de camarões marinhos
300 em sistemas de bioflocos e diferentes vias de aplicação e sua relação com a comunidade
301 microbiana, qualidade da água e desempenho zootécnico. A Hibridização *in situ*
302 fluorescente foi utilizada para análise da abundância bacteriana presente na água de
303 cultivo e no intestino dos camarões. Os tratamentos foram divididos em dois sistemas,
304 água clara (AC) e bioflocos (BFT), onde os probióticos eram adicionados somente na
305 ração (PR), somente na água (PA) e em duas vias de aplicação, sendo ração e água (PRA).
306 O berçário teve duração de 35 dias. A diversidade e abundância de microrganismos foi
307 superior nos tratamentos com bioflocos e duas vias de aplicação dos probióticos. A

308 colonização do intestino dos camarões foi evidenciada no presente estudo pela presença
309 das bactérias probióticas hibridizadas, quantificadas e classificadas, onde apresentaram
310 relação direta com a água de cultivo. O desempenho zootécnico foi significativamente
311 ($p < 0,05$) maior no tratamento com adição de probióticos na ração e na água em sistema
312 de bioflocos (BFT-PRA), onde todos os índices foram superiores aos demais tratamentos.
313 Sobrevivências foram superiores a 89%, com exceção do tratamento controle (79%).
314 Demais tratamentos com pelo menos uma via de aplicação mostrou desempenho
315 zootécnico satisfatório em relação ao controle, incluindo o sistema de água clara que se
316 aproximou do sistema de bioflocos sem adição de probióticos (BFT-CTL). O terceiro
317 capítulo teve como objetivo avaliar eficiência do uso do probiótico mix comercial no
318 cultivo superintensivo e semi-intensivo no cultivo do *Penaeus vannamei* na fase de
319 engorda em diferentes sistemas e as interações com a qualidade da água, desempenho
320 zootécnico, comunidade microbiana e abundância bacteriana. Foram realizados
321 experimentos em duas fases de engorda, semi-intensiva (20 cam m^{-2}) e superintensiva
322 (300 cam m^{-2}), ambas com duração de 63 dias. Os tratamentos foram divididos em Engorda
323 1 e Engorda 2 são diferentes vias de aplicação dos probióticos em sistema de água clara.
324 Houve diferença significativa para todos os parâmetros zootécnicos quando adicionados
325 probióticos em comparação com grupo controle. Foram encontrados maior diversidade
326 de microrganismos com a adição de probióticos e colonização do trato intestinal pelas
327 bactérias probióticas. Na engorda superintensiva foram encontradas diferenças para dados
328 avaliados na qualidade de água. Valores encontrados para o desempenho zootécnico são
329 superiores quando os probióticos são adicionados na água e na ração em sistema de
330 bioflocos, foram encontrados maior diversidade de microrganismos e abundância
331 bacteriana no sistema de bioflocos quando comparado ao sistema de água clara, porém
332 no tratamento com adição dos probióticos em duas vias em água clara houve
333 comportamento similar ao tratamento controle em sistema BFT. As principais conclusões
334 são a capacidade de melhora no desempenho zootécnico, aumento da diversidade de
335 microrganismos e a colonização de bactérias na água e no intestino dos camarões, assim
336 como a viabilidade dos probióticos em diferentes condições e desafios.

337

338 Palavras-chave: bacillus subtilis; lactobacillus plantarum; pediococcus acidilactici; hibridização;
339 microbiota; intestino; colonização; bioflocos; produtividade.

340 GENERAL ABSTRACT

341

342 With the intensification of aquaculture production, the success of productivity is
343 closely linked to farming conditions, management practices, and environmental quality.
344 In this context, probiotic bacteria have emerged as a sustainable alternative. These are
345 defined as live microorganisms that confer benefits to the host by modulating the
346 intestinal and environmental microbiota, resulting in improved zootechnical performance,
347 immune response, and water quality. This thesis aimed to evaluate the effects of different
348 commercial probiotic bacteria at various production stages (nursery and grow-out) across
349 different farming systems, including clear water and biofloc system (BFT), and under
350 both intensive and super-intensive conditions. The bacterial strains used were *Bacillus*
351 *subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici*, applied either
352 individually or in a commercial mix. The study was divided into three chapters. The first
353 chapter focused on assessing the effects of isolated probiotic bacteria and different
354 application strategies on water quality, zootechnical performance of *Penaeus vannamei*,
355 and immune responses during the grow-out phase under super-intensive culture.
356 Evaluated the individual behavior of probiotics under different rearing conditions, their
357 antagonistic effects against pathogenic bacteria, and their influence on shrimp immune
358 systems over a 49-day trial. No significant differences were observed in water quality
359 parameters. However, significant differences in zootechnical performance (final weight
360 and productivity) were detected. Treatments involving *B. subtilis* applied both in feed and
361 water yielded the highest values (8.75 g and 0.81 kg m⁻²). While *L. plantarum* and *P.*
362 *acidilactici* also produced satisfactory results, they were less effective than *B. subtilis*. All
363 strains demonstrated viability at 30 ppt salinity and 30°C. The mixed probiotic
364 formulation was effective against common aquaculture pathogens. The second chapter
365 investigated the efficacy of the probiotic mix in shrimp nursery systems using biofloc and
366 various application methods, and its relationship with microbial community composition,
367 water quality, and zootechnical performance. Fluorescence in situ hybridization (FISH)
368 was used to quantify bacterial abundance in the water and shrimp intestines. Treatments
369 were conducted under two systems: clear water (CW) and biofloc (BFT), with probiotics
370 applied via feed (PR), water (PA), or both (PRA). The 35-day nursery trial showed that
371 microbial diversity and abundance were higher in BFT systems and treatments using dual
372 application routes. Bacterial colonization of the shrimp gut was confirmed through
373 hybridization, with a clear association between the intestinal microbiota and the water.

374 Zootechnical performance was significantly higher ($p < 0.05$) in the BFT-PRA treatment,
375 with all performance indices outperforming the other treatments. Survival rates exceeded
376 89% in all treatments except the control (79%). All probiotic treatments, including those
377 in clear water, yielded better performance than the control and approached the results of
378 untreated biofloc systems (BFT-CTL). The third chapter evaluated the efficiency of the
379 commercial probiotic mix in *P. vannamei* grow-out under semi-intensive (20 shrimp/m²)
380 and super-intensive (300 shrimp/m²) systems over 63 days, focusing on water quality,
381 zootechnical performance, microbial community dynamics, and bacterial abundance.
382 Treatments were divided into two phases (Grow-out 1 and 2) with different probiotic
383 application routes in clear water systems. Significant improvements were observed across
384 all zootechnical parameters when probiotics were applied, compared to control groups.
385 Greater microbial diversity and gut colonization by probiotics were noted. In the super-
386 intensive system, water quality parameters were also significantly affected by probiotic
387 addition. The improvement in zootechnical performance occurred when probiotics were
388 applied both in water and feed in biofloc systems, which also showed higher microbial
389 diversity and bacterial abundance compared to clear water. Interestingly, the dual-
390 application treatment in clear water showed results comparable to the control in the
391 biofloc system. Probiotic bacteria were confirmed to colonize the shrimp intestinal tract
392 effectively. In conclusion, the findings highlight the potential of probiotics to improve
393 zootechnical performance, increase microbial diversity, and promote bacterial
394 colonization in both the aquatic environment and shrimp gut, demonstrating their viability
395 under different culture conditions and production challenges.

396
397
398
399
400
401
402
403
404

405 INTRODUÇÃO GERAL

406 A aquicultura é um dos setores de produção de proteína animal que mais cresce
407 globalmente, com destaque para a carcinocultura do camarão branco do Pacífico
408 (*Penaeus vannamei*), que tem se consolidado com expressiva participação na produção
409 global de camarões, com ampla distribuição geográfica e significativo impacto
410 econômico (FAO, 2022). A busca pela consolidação dos sistemas de cultivos intensivos
411 e superintensivos, procura solucionar demandas antigas do setor como controle de
412 doenças, uso reduzido de água, necessidade de otimização de uso de terras e aumento
413 da produtividade (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2017; Gainza et al., 2018).
414 Durante muitas décadas o uso indiscriminado de antibióticos e descontrole da geração de
415 efluentes em recursos hídricos, causou surgimento de doenças bacterianas resistentes e
416 diversos problemas ambientais, que afetaram negativamente a produção mundial de
417 camarões marinhos (Souza et al., 2012; Pereira et al., 2022; Lubis et al., 2024).

418 Em um contexto de resistência a antibióticos crescente, os probióticos oferecem
419 uma alternativa ao uso de antimicrobianos, promovendo uma aquicultura mais ecológica
420 e sustentável (Sumon et al., 2022). Os probióticos também desempenham um papel na
421 biorremediação e na reciclagem de nutrientes, ajudando a manter a qualidade da água e a
422 reduzir a carga de poluentes, contribuindo assim para práticas de cultivo mais sustentáveis
423 (Soltani et al., 2019). Os principais efeitos positivos do uso dos probióticos são
424 demonstrados através da melhora significativa dos índices zootécnicos avaliados, como
425 maior crescimento, melhora na taxa de conversão alimentar, redução de mortalidade e
426 melhores condições de saúde animal (Pandiyan et al., 2013, Krummenauer et al., 2014).
427 Ao passar dos anos a aplicação de bactérias probióticas evoluiu de pesquisas microbianas
428 iniciais para uma consolidada prática de manejo, com efeitos comprovados na promoção
429 de uma microbiota intestinal controlada, funções imunológicas e absorção de nutrientes
430 (Holmström et al., 2003; Pimentel et al., 2024).

431 O uso de probióticos em conjunto com boas práticas de manejo como uso de
432 substratos artificiais, eficientes sistemas de aeração, controle densidades de estocagem,
433 diferentes métodos de aplicação e fontes probióticas focam na inovação e na capacidade
434 de maximizar o desenvolvimento e potencial da produção sustentável de camarões
435 (Hostins et al., 2017; Lara et al., 2017; Da Silveira et al., 2022; Ramiro et al., 2024). Entre
436 as inovações do setor, o sistema de bioflocos (BFT System) é aplicado como uma
437 ferramenta que utiliza a comunidade microbiana como pilar de transformação de
438 compostos nitrogenados em proteína suplementar fornecida aos organismos cultivados,

439 necessita de um alto controle dos parâmetros físico-químicos da água, proporcionando
440 efeitos positivos nos índices de desempenho zootécnico, controle de patógenos,
441 resistência a doenças e medidas eficientes de controle ambiental (Avnimelech et al., 2001;
442 Samocha, 2004; Wasielesky et al., 2020).

443 As definições de probióticos variam ligeiramente entre diferentes autores que
444 iniciaram as pesquisas sobre seus efeitos benéficos, são definidos como organismos vivos
445 que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do
446 hospedeiro por meio da modulação da microbiota intestinal e controlam qualidade da
447 água (Gatesoupe, 2016). As bactérias probióticas são frequentemente descritas como
448 bactérias benéficas, que ajudam a prevenir a colonização de patógenos através da
449 competição por espaço e nutrientes, além de contribuírem para a saúde intestinal,
450 suplementos alimentares microbianos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro
451 (Fuller, 1992; Rengpipat et al., 1998). As fontes mais conhecidas e utilizadas na
452 aquicultura são cepas de bacilos e bactérias ácido lácticas, dentre elas *Bacillus subtilis*,
453 *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* que são tipicamente isoladas de
454 ambientes aquáticos naturais ou organismos hospedeiros específicos (Yeh et al., 2014).

455 Espécies de bacilos, como *Bacillus subtilis*, são notáveis por sua eficácia como
456 probióticos na aquicultura, são bactérias gram-positivas, formadoras de esporos
457 resistentes que permitem sua sobrevivência em condições adversas e sua eficácia em
458 ambientes aquáticos que não apenas melhoram a qualidade da água ao converter matéria
459 orgânica, mas também ajudam a equilibrar a comunidade microbiana (Rajasulochana e
460 Gummadi, 2022; He et al., 2023). Possuem a capacidade de sintetizar enzimas digestivas,
461 tais como amilases e proteases, promovendo maior eficiência na digestão e absorção de
462 nutrientes pelos organismos aquáticos, o que resulta em melhor desempenho zootécnico
463 (Ziaei-Nejad et al., 2006; Liu et al., 2009). Além disso, essas bactérias podem atuar na
464 supressão do crescimento de microrganismos patogênicos por meio de mecanismos
465 competitivos pela disponibilidade de nutrientes e pela secreção de compostos
466 antimicrobianos, beneficiando a saúde dos organismos cultivados (Knipe et al., 2021;
467 Sam-On et al., 2022). Adicionalmente, bactérias do gênero bacilos têm sido associadas
468 ao fortalecimento do sistema imunológico, contribuindo para maior resistência às doenças
469 e redução das taxas de mortalidade (Li et al., 2009).

470 As bactérias ácido lácticas (BAL) abrangem espécies como *Lactobacillus* e
471 *Pediococcus*, são conhecidas por sua capacidade de produzir ácido láctico durante a
472 fermentação, o que pode inibir bactérias patogênicas, reduzir pH intestinal e promover

473 um ambiente intestinal mais saudável, são amplamente estudadas por seus benefícios no
474 desempenho do crescimento, resposta imunológica e resistência a doenças (Chiu et al.,
475 2007; Klare et al., 2007; Kongnum e Hongpattarakere, 2012). São eficazes na colonização
476 da mucosa intestinal, o que os ajuda a competir com patógenos e melhorar a saúde
477 intestinal dos organismos aquáticos, produzem bacteriocinas e outras substâncias com
478 propriedades antibacterianas, que ajudam a controlar a microbiota patogênica (Sahoo et
479 al., 2016; Wu et al., 2022).

480 As bactérias probióticas competem por sítios de ligação nas superfícies epiteliais,
481 competindo por nutrientes, inibindo formação de biofilmes e assim, impedindo a
482 colonização por patógenos (Amiin et al., 2023). Produzem ácido lático e bacteriocinas
483 que reduzem o pH intestinal, criando ambiente hostil para patógenos e possuem
484 capacidade de estimular respostas imunes ao hospedeiro (Tamilselvan e Raja, 2024). A
485 capacidade de eficiência do uso de probióticos está relacionado a diferentes fatores e
486 condições, como temperatura, salinidade, métodos de aplicação, dosagem e origem das
487 cepas e manejo aplicado (Bezerra et al., 2024; Mathan Muthu et al., 2024). A otimização
488 da dosagem é crítica, pois dosagens inadequadas podem levar a resultados ineficazes, a
489 administração combinada de probióticos específicos pode ser mais eficaz do que
490 aplicações singulares, destacando a necessidade de abordagens personalizadas para
491 estratégias de dosagem e combinação, chamados de probióticos multi-espécies
492 (Kesselring et al., 2019; Zan et al., 2023).

493 Em conjunto com o uso de probióticos, o sistema de bioflocos promove condições
494 ambientais sustentáveis e fisiológicas favoráveis aos cultivos intensivos (Hostins et al.,
495 2017). Os bioflocos são agregados microbianos compostos por bactérias, protozoários,
496 microalgas, excreta dos animais cultivados, alimento não consumido e são fontes de
497 nutrientes como carbono e nitrogênio, fornecem nutrientes essenciais para crescimento e
498 atividade das bactérias de um modo geral (Khanjani et al., 2024). Os bioflocos contribuem
499 significativamente para a qualidade da água ao estimular a atividade bacteriana envolvida
500 na degradação e conversão de compostos nitrogenados tóxicos, como amônia e nitrito,
501 em formas menos prejudiciais (Brandão et al., 2024). As bactérias probióticas integradas
502 aos bioflocos competem diretamente com patógenos por nutrientes e espaço, reduzindo a
503 carga patogênica no ambiente aquático e fortalecendo o sistema imunológico dos animais
504 cultivados (Arias-Moscoso et al., 2018; Waiho et al., 2023).

505 A variabilidade de eficácia entre diferentes espécies de bactérias probióticas e
506 sistemas de cultivo são desafios significativos na consolidação da utilização de

507 probióticos em sistemas de produção intensivos, mesmo com tantos avanços nas
508 metodologias aplicadas atualmente (Ninawe e Selvin, 2009; Wang et al., 2023). Diante
509 desses desafios, a presente tese busca desenvolver e investigar estratégias eficientes
510 utilizando probióticos específicos isolados e misturas probióticas para assegurar a
511 sustentabilidade da aquicultura intensiva e superintensiva. Assim como a identificação e
512 validação das melhores práticas de aplicação em diferentes sistemas e fases de produção.

513 **OBJETIVOS**

514 **Objetivo Geral**

515 Avaliar o uso de diferentes bactérias probióticas isoladas e em mix probiótico no
516 cultivo intensivo e superintensivo do *Penaeus vannamei* durante as fases de berçário e
517 engorda em sistemas de água clara e sistema de bioflocos e seus efeitos na qualidade da
518 água, desempenho zootécnico, composição de microrganismos, abundância bacteriana
519 nos diferentes sistemas.

520 **Objetivos Específicos**

- 521 • Avaliar o efeito de diferentes bactérias probióticas isoladas e estratégias de
522 aplicação na qualidade da água, desempenho zootécnico do *Penaeus vannamei*,
523 na fase de engorda em sistema superintensivo, avaliando individualmente o
524 comportamento dos probióticos em diferentes condições de cultivo, seus efeitos
525 de antagonismo com bactérias patogênicas e efeito sobre o sistema imune dos
526 camarões.
- 527 • Avaliar o efeito do uso de mix probiótico comercial e diferentes vias de aplicação
528 em diferentes sistemas na fase de berçário do *Penaeus vannamei* em sistema
529 superintensivo, avaliando qualidade da água, desempenho zootécnico,
530 microrganismos, comunidade bacteriana e colonização do intestino dos camarões.
- 531 • Avaliar a eficiência do uso do probiótico mix comercial no cultivo superintensivo
532 e semi-intensivo no cultivo do *Penaeus vannamei* na fase de engorda em
533 diferentes sistemas e as interações com a qualidade da água, desempenho
534 zootécnico, comunidade microbiana e abundância bacteriana.

535 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 536 Amiin, M.K., Lahay, A.F., Putriani, R.B., Reza, M., Putri, S.M.E., Sumon, M.A.A.,
537 Jamal, M.T., Santanumurti, M.B., 2023. The role of probiotics in *Litopenaeus*
538 *vannamei* shrimp aquaculture performance - A review. Vet. World 16, 638–
539 649. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.638-649>
- 540 Arias-Moscoso, J.L., Espinoza-Barrón, L.G., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M.E.,
541 Nieves-Soto, M., 2018. Effect of commercial probiotics addition in a biofloc
542 shrimp farm during the nursery phase in zero water exchange. Aquac. Rep. 11,
543 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.06.001>
- 544 Avnimelech, Y., Ritvo, G., Meijer, L.E., Kochba, M., 2001. Water content, organic
545 carbon and dry bulk density in flooded sediments. Aquacult. Eng. 25, 25–33.
546 [https://doi.org/10.1016/s0144-8609\(01\)00068-1](https://doi.org/10.1016/s0144-8609(01)00068-1)
- 547 Bezerra, A., Poersch, L., Krummenauer, D., Cesar, D., Wasielesky, W., Bezerra, O.A.,
548 Poersch, L., Cesar, D., Krummenauer, D., 2024. Optimizing Pacific White
549 Shrimp *Penaeus vannamei* Nursery Phase in Super-Intensive Culture Through
550 Probiotic Mix Application and Management. J. Aquac. Mar. Biol. Ecol. 2024.
551 <https://doi.org/10.37722/JAMBE.2024204>
- 552 Brandão, H., dos Reis, W.G., Krummenauer, D., Wasielesky, W., Jr, 2024. Growth
553 performance of *Litopenaeus vannamei* under biofloc system using denitrified
554 seawater. Aquac. Int. 32, 3129–3145. [https://doi.org/10.1007/s10499-023-](https://doi.org/10.1007/s10499-023-01315-0)
555 [01315-0](https://doi.org/10.1007/s10499-023-01315-0)
- 556 Chiu, C.-H., Guu, Y.-K., Liu, C.-H., Pan, T.-M., Cheng, W., 2007. Immune responses
557 and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by
558 *Lactobacillus plantarum*. Fish Shellfish Immunol. 23, 364–377.
559 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.010>
- 560 da Silveira, L.G.P., Rosas, V.T., Krummenauer, D., Fróes, C., da Silva, A., Poersch,
561 L.H., Fóes, G., Wasielesky, W., Jr, 2022. Establishing the most productive
562 stocking densities for each stage of a multi-phase shrimp culture in BFT
563 system. Aquac. Int. 30, 1889–1903. [https://doi.org/10.1007/s10499-022-00879-](https://doi.org/10.1007/s10499-022-00879-7)
564 [7](https://doi.org/10.1007/s10499-022-00879-7)
- 565 Emerenciano, M.G.C., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza,
566 A., 2017. Biofloc technology (BFT): A tool for water quality management in
567 aquaculture, em: Water Quality. InTech.
- 568 FAO (Food & Agriculture Organisation), 2022. The State of World Fisheries and
569 Aquaculture 2022. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- 570 Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals: a review. J. Appl. Bacteriol., 68: 365–
571 378.
- 572 Gainza, O., Ramírez, C., Ramos, A.S., Romero, J., 2018. Intestinal Microbiota of white
573 shrimp *Penaeus vannamei* under intensive cultivation conditions in Ecuador.
574 Microb. Ecol. 75, 562–568. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1066-z>
- 575 Gatesoupe, F.J., 2016. Probiotics and other microbial manipulations in fish feeds, em:
576 Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Elsevier, p. 319–328.
- 577 He, X., Abakari, G., Tan, H., Liu, W., Luo, G., 2023. Effects of different probiotics
578 (*Bacillus subtilis*) addition strategies on a culture of *Litopenaeus vannamei* in
579 biofloc technology (BFT) aquaculture system. Aquaculture 566, 739216.
580 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739216>
- 581 Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.-E.,
582 Kautsky, N., 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for
583 environmental impacts and human health. Int. J. Food Sci. Technol. 38, 255–
584 266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x>

- 585 Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D.E., Wasielesky, W., Jr, 2017. Efficacy and
586 variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a
587 BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic
588 mixture. *Aquaculture* 480, 58–64.
589 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036>
- 590 Kesselring, J.C., Gruber, C., Standen, B., Wein, S., 2019. Continuous and pulse-feeding
591 application of multispecies probiotic bacteria in whiteleg shrimp, *Litopenaeus*
592 *vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 50, 1123–1132.
593 <https://doi.org/10.1111/jwas.12640>
- 594 Khanjani, M.H., Mohammadi, A., Emerenciano, M.G.C., 2024. Water quality in biofloc
595 technology (BFT): an applied review for an evolving aquaculture. *Aquac. Int.*
596 <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01618-w>
- 597 Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G.,
598 Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H., 2007.
599 Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus*
600 human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J.*
601 *Antimicrob. Chemother.* 59, 900–912. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm035>
- 602 Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., Tyler, C.R., 2021. Probiotics and
603 competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Rev. Aquac.* 13,
604 324–352. <https://doi.org/10.1111/raq.12477>
- 605 Kongnum, K., Hongpattarakere, T., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated
606 from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp
607 (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish*
608 *Immunol.* 32, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.008>
- 609 Krummenauer, D., Poersch, L., Romano, L.A., Lara, G.R., Encarnação, P., Wasielesky,
610 W., Jr, 2014. The effect of probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc
611 culture system infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Appl. Aquacult.* 26,
612 370–379. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.965575>
- 613 Lara, G., Honda, M., Poersch, L., Wasielesky, W., Jr, 2017. The use of biofilm and
614 different feeding rates in biofloc culture system: the effects in shrimp growth
615 parameters. *Aquac. Int.* 25, 1959–1970. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0151-0>
- 616
- 617 Li, J., Tan, B., Mai, K., 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and
618 isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations,
619 immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp
620 (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 291, 35–40.
621 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.005>
- 622 Liu, C.-H., Chiu, C.-S., Ho, P.-L., Wang, S.-W., 2009. Improvement in the growth
623 performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing
624 probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1031–
625 1041. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x>
- 626 Lubis, A.R., Sumon, M.A.A., Dinh-Hung, N., Dhar, A.K., Delamare-Deboutteville, J.,
627 Kim, D.-H., Shinn, A.P., Kanjanasopa, D., Permpoonpattana, P., Van Doan,
628 H., Linh, N.V., Brown, C.L., 2024. Review of quorum-quenching probiotics: A
629 promising non-antibiotic-based strategy for sustainable aquaculture. *J. Fish*
630 *Dis.* 47, e13941. <https://doi.org/10.1111/jfd.13941>
- 631 Mathan Muthu, C.M., Vickram, A.S., Bhavani Sowndharya, B., Saravanan, A.,
632 Kamalesh, R., Dinakarkumar, Y., 2024. A comprehensive review on the
633 utilization of probiotics in aquaculture towards sustainable shrimp farming.

- 634 Fish Shellfish Immunol. 147, 109459.
635 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109459>
- 636 Ninawe, A.S., Selvin, J., 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and
637 challenges. Crit. Rev. Microbiol. 35, 43–66.
638 <https://doi.org/10.1080/10408410802667202>
- 639 Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K.,
640 Manikkam, S., Sadayappan, B., 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Inven.
641 Today 5, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>
- 642 Pereira, W.A., Mendonça, C.M.N., Urquiza, A.V., Marteinsson, V.P., LeBlanc, J.G.,
643 Cotter, P.D., Villalobos, E.F., Romero, J., Oliveira, R.P.S., 2022. Use of
644 probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in
645 aquaculture. Microorganisms 10, 1705.
646 <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>
- 647 Pimentel, O.A.L.F., Wasielesky, W., Jr, Poersch, L.H., Krummenauer, D., 2024. Effect
648 of different synbiotic fertilizer processing strategies in *Penaeus vannamei*
649 intensive nurseries. Aquaculture 584, 740667.
650 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740667>
- 651 Rajasulochana, P., Gummadi, S.N., 2022. A probiotic based product using multi-strain
652 *Bacillus* species and predictive models for shrimp growth following probiotic
653 intervention. Aquaculture 551, 737869.
654 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737869>
- 655 Ramiro, B. de O., Wasielesky, W., Jr, Pimentel, O.A.L.F., Poersch, L.H. da S., Advent,
656 B., Gonçalves Júnior, G.F., Krummenauer, D., 2024. The effect of using nano
657 and microbubbles as aeration strategies on the nitrification process, microbial
658 community composition, and growth of *Penaeus vannamei* in a super-intensive
659 biofloc system. Aquaculture 587, 740842.
660 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740842>
- 661 Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 1998. Effects of a
662 probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and
663 growth. Aquaculture 167, 301–313. [https://doi.org/10.1016/s0044-](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00305-6)
664 [8486\(98\)00305-6](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00305-6)
- 665 Sahoo, T.K., Jena, P.K., Patel, A.K., Seshadri, S., 2016. Bacteriocins and their
666 applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review.
667 Aquac. Res. 47, 1013–1027. <https://doi.org/10.1111/are.12556>
- 668 Samocha, T., 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-
669 product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus*
670 *vannamei*. Aquaculture 231, 197–203.
671 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.023>
- 672 Sam-On, M.F.S., Mustafa, S., Yusof, M.T., Mohd Hashim, A., Abbasiliasi, S., Zulkifly,
673 S., Jahari, M.A., Roslan, M.A.H., 2022. Evaluation of three *Bacillus spp.*
674 isolated from the gut of giant freshwater prawn as potential probiotics against
675 pathogens causing Vibriosis and Aeromonosis. Microb. Pathog. 164, 105417.
676 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105417>
- 677 Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S.H., Kumar, V., Lymbery, A.J., Roy, S., Ringø, E.,
678 2019. Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal
679 origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and
680 shellfish. Rev. Fish. Sci. Aquac. 27, 331–379.
681 <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- 682 Souza, D.M., Suita, S.M., Leite, F.P.L., Romano, L.A., Wasielesky, W., Ballester,
683 E.L.C., 2012. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink

684 shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange
685 system. Aquac. Res. 43, 1828–1837. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02992.x)
686 [2109.2011.02992.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02992.x)

687 Sumon, T.A., Hussain, M.A., Sumon, M.A.A., Jang, W.J., Abellan, F.G.,
688 Sharifuzzaman, S.M., Brown, C.L., Lee, E.-W., Kim, C.-H., Hasan, M.T.,
689 2022. Functionality and prophylactic role of probiotics in shellfish aquaculture.
690 Aquac. Rep. 25, 101220. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101220>

691 Tamilselvan, M., Raja, S., 2024. Exploring the role and mechanism of potential
692 probiotics in mitigating the shrimp pathogens. Saudi J. Biol. Sci. 31, 103938.
693 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103938>

694 Waiho, K., Abd Razak, M.S., Abdul Rahman, M.Z., Zaid, Z., Ikhwanuddin, M., Fazhan,
695 H., Shu-Chien, A.C., Lau, N.-S., Azmie, G., Ishak, A.N., Syahnon, M., Kasan,
696 N.A., 2023. A metagenomic comparison of clearwater, probiotic, and Rapid
697 BFTTM on Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* cultures. PeerJ 11,
698 e15758. <https://doi.org/10.7717/peerj.15758>

699 Wang, Y.-C., Lin, H.-Y., Chang, P.-S., 2023. Evaluation of probiotic potentiality of
700 GM-Lac (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) in juvenile Asian seabass *Lates*
701 *calcarifer*. Aquac. Rep. 30, 101615.
702 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101615>

703 Wasielesky, W., Jr, Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural
704 production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive
705 culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258, 396–
706 403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>

707 Wasielesky, W., Jr, Bezerra, A., Poersch, L., Hoffling, F.B., Krummenauer, D., 2020.
708 Effect of feeding frequency on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during
709 the pilot-scale nursery phase of a superintensive culture in a biofloc system. J.
710 World Aquac. Soc. 51, 1175–1191. <https://doi.org/10.1111/jwas.12694>

711 Wu, Y.-S., Chu, Y.-T., Chen, Y.-Y., Chang, C.-S., Lee, B.-H., Nan, F.-H., 2022. Effects
712 of dietary *Lactobacillus reuteri* and *Pediococcus acidilactici* on the cultured
713 water qualities, the growth and non-specific immune responses of *Penaeus*
714 *vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 127, 176–186.
715 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.004>

716 Yeh, S.-P., Chiu, C.-H., Shiu, Y.-L., Huang, Z.-L., Liu, C.-H., 2014. Effects of diets
717 supplemented with either individual or combined probiotics, *Bacillus subtilis*
718 E20 and *Lactobacillus plantarum* 7-40, on the immune response and disease
719 resistance of the mud crab, *Scylla paramamosain* (Estampador). Aquac. Res.
720 45, 1164–1175. <https://doi.org/10.1111/are.12061>

721 Zan, Z., Chen, K., Wang, H., Han, Z., Sun, J., 2023. Effects of a multistrain probiotic on
722 the growth, immune function and intestinal microbiota of the tongue sole
723 *Cynoglossus semilaevis*. Aquaculture 575, 739813.
724 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739813>

725 Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.-R.,
726 Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on
727 digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp
728 *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252, 516–524.
729 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>

730

731

732

733 **CAPÍTULO I: USO DE DIFERENTES BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA**
734 **ENGORDA DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Penaeus vannamei* EM**
735 **SISTEMA SUPERINTENSIVO**

736 Artigo submetido a revista *Aquaculture International*

737 **Resumo**

738 O propósito deste estudo foi avaliar diferentes bactérias probióticas isoladas de
739 um probiótico comercial, contendo *Bacillus subtilis* ($3,4 \times 10^9$ UFC g⁻¹), *Lactobacillus*
740 *plantarum* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹) e *Pediococcus acidilactici* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹) em diferentes
741 vias de aplicação, sendo inseridos somente na ração, somente na água e aplicando em
742 conjunto na ração e na água. Também foram objetivos avaliar os efeitos sobre a qualidade
743 da água e desempenho zootécnico dos camarões em sistema superintensivo na fase de
744 engorda. Os isolados probióticos foram submetidos a testes *in vitro* avaliando salinidade
745 e nutrientes disponíveis, fornecendo curvas de crescimento durante 48h. Foram realizados
746 testes de sensibilidade microbiana contra bactérias patogênicas comuns da aquicultura e
747 a contagem diferencial de hemócitos para avaliar as condições de sanidade dos animais
748 cultivados. O experimento teve duração de 49 dias. Não foram observadas diferenças na
749 qualidade da água. Para dados de desempenho zootécnico (peso final e produtividade)
750 foram observadas diferenças significativas, onde os tratamentos com *B. subtilis*
751 adicionado na ração e na água demonstraram maiores valores (8,75g e 0,81kg/m²),
752 enquanto *L. plantarum* e *P. acidilactici* obtiveram resultados de peso final e produtividade
753 satisfatórios, porém inferiores aos bacilos. Ambos os bacilos e as bactérias ácido lácticas
754 foram capazes de crescer em salinidade 30 e temperatura de 30°C. O uso do probiótico
755 com a mistura de diferentes bactérias mostrou-se eficaz contra diversos patógenos
756 comuns de sistemas de aquicultura como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*,
757 *Salmonella* sp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas*
758 *hydrophila*. A utilização de probióticos emergiu como uma ferramenta crucial para
759 fortalecer o sistema imunológico dos camarões, destacando-se como agentes biológicos
760 promissores na aquicultura.

761

762

763

764 **Abstract**

765 The purpose of this study was to evaluate different probiotic bacteria isolated from
766 a commercial probiotic mix containing *Bacillus subtilis* (3.4×10^9 CFU g⁻¹), *Lactobacillus*
767 *plantarum* (1.2×10^9 CFU g⁻¹) and *Pediococcus acidilactici* (1.2×10^9 CFU g⁻¹) in different
768 methods of application: only in the feed, only in the water and in the feed and water
769 together. To evaluate the effects on water quality and the zootechnical performance of
770 shrimp in a super-intensive system during the grow-out phase. The probiotic isolates were
771 subjected to *in vitro* tests evaluating salinity and available nutrients, providing growth
772 curves for 48 hours. Microbial sensitivity tests against common aquaculture pathogenic
773 bacteria and differential hemocyte counts were carried out to assess the health conditions
774 of the farmed animals. The experiment lasted 49 days. No differences in water quality
775 were observed. For zootechnical performance data (final weight and productivity),
776 significant differences were observed, where the treatments with *B. subtilis* added to the
777 feed and water showed higher values, *L. plantarum* and *P. acidilactici* obtained
778 satisfactory final weight and productivity results, but lower than the bacilli. Both bacilli
779 and lactic acid bacteria were able to grow in salinity 30. The use of the probiotic mix
780 proved to be effective against several common pathogens in aquaculture systems, such as
781 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Vibrio parahaemolyticus*,
782 *Pseudomonas fluorescens* and *Aeromonas hydrophila*. The use of probiotics has emerged
783 as a crucial tool to strengthen the immune system of shrimp, standing out as promising
784 biological agents in aquaculture.

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794 **Introdução**

795 Em 2020, o camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*) liderou a produção
796 aquícola global com 5,8 milhões de toneladas, o aumento na produção de camarões
797 cultivados resultou em uma disponibilidade cinco vezes maior entre 1961 e 2019 (FAO,
798 2022). De acordo com o mesmo relatório os alimentos aquáticos são promissores para
799 segurança alimentar, desde que se promova consumo diversificado de maneira
800 sustentável e equitativa, considerando o potencial nutricional desses alimentos. Para
801 atender a demanda por organismos aquáticos ocorreu a intensificação da produção,
802 causando o surgimento de problemas ambientais e sanitários, provocados pelo
803 desequilíbrio na inter-relação entre hospedeiro, ambiente e patógeno (Lalumera et al.,
804 2004). A aquicultura busca desempenhar um papel importante na transição para um
805 sistema alimentar global eficiente. Para realizar esta transição, é necessário promover a
806 produção de alimentos e gerar menos pressão sobre os recursos utilizados para essa
807 produção, causando assim menor impacto para o meio ambiente, reduzindo a dependência
808 de farinha de peixe, novos ingredientes adicionados a formulação das rações, sistemas de
809 produção fechados e a utilização de probióticos (Bauer et al., 2012; Fry et al., 2016;
810 Hostins et al., 2017; Macias-Sancho et al., 2014; Moriarty, 1998; Wasielesky et al., 2006).

811 Probióticos são definidos como microrganismos vivos que proporcionam
812 benefícios para a saúde do hospedeiro em doses corretamente administradas, podem
813 colonizar trato e promover melhora da microbiota intestinal e sistema imune (Nayak,
814 2021; Verschuere, L.G.Rombaut, P.Sorgeloos, 2000). As bactérias probióticas
815 proporcionam diversos benefícios para a saúde do hospedeiro e desempenham um papel
816 importante na manutenção da qualidade da água, no aumento da produtividade,
817 resistência a várias doenças, função imunitária e microbiota benéfica no intestino (El-
818 Saadony et al., 2021). Além disso, o uso de probióticos na aquicultura pode reduzir os
819 efeitos secundários do uso de antibióticos (Hoseinifar et al., 2018). A utilização de
820 bactérias probióticas proporciona efeitos positivos no crescimento, imunidade,
821 antioxidantes e microbiota intestinal (Krummenauer et al., 2014; Nayak, 2021). Os
822 probióticos, como aditivos alimentares, ajudam na digestão adequada dos alimentos e
823 disponibilizam nutrientes para um crescimento mais rápido e maior produção, reforçando
824 a importância da suplementação probiótica, especialmente em sistemas convencionais de
825 cultura em águas claras (Hostins et al., 2017; Balcázar et al., 2006; Luis-Villasenor et al.,
826 2012; Newaj-Fyzul & Austin, 2015; van Hai & Fotedar, 2010).

827 Algumas variedades de bactérias probióticas foram amplamente testadas na
828 produção do *Penaeus vannamei*, incluindo bacilos e bactérias ácido lácticas (Farzanfar,
829 2006; Ferreira et al., 2017). Sendo o gênero mais explorado o *Bacillus sp* e em nível de
830 espécie *Bacillus subtilis*, amplamente estudado e aplicado comercialmente em todo
831 mundo (Keysami et al., 2012). As bactérias do gênero bacilos são as mais utilizadas na
832 aquicultura, sendo a espécie *Bacillus subtilis* a mais utilizada e encontrada em diversos
833 estudos e produtos comerciais (Akhter et al., 2015; Farzanfar, 2006; Keysami et al.,
834 2007). *Bacillus subtilis* são bactérias formadoras de esporos que pertence ao gênero
835 Bacillus. As bactérias formadoras de esporos são definidas por sua capacidade de formar
836 endosporos, que são estruturas altamente resistentes que permitem que as bactérias
837 sobrevivam em ambientes adversos (Lalloo et al., 2007). Outro grupo de bactérias
838 relevantes são as bactérias ácido lácticas que também possuem importante desempenho
839 em cultivos de diferentes espécies. Estudos indicam grande potencial e resistências dessas
840 bactérias, dentre elas as mais importantes são *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus*
841 *acidilactici* (Chiu et al., 2007; Klare et al., 2007; Sabo et al., 2018).

842 *Lactobacillus plantarum* é uma cepa de bactérias que tem sido amplamente
843 estudada e aplicada no cultivo de camarões marinhos e demonstra desempenho eficaz
844 como probiótico, especificamente na microbiota intestinal, uma vez que a administração
845 de *L. plantarum* pode aumentar a abundância de bactérias benéficas no intestino do
846 camarão (Kesselring et al., 2019; Soccol et al., 2010). Estas são amplamente utilizadas na
847 produção de camarões para combater efeitos negativos da baixa salinidade e para
848 melhorar o desempenho de crescimento e a capacidade imunológica (Wei et al., 2022; Li
849 et al., 2019; et al., 2008).

850 *Pediococcus acidilactici* também são bactérias ácido lácticas e ultimamente seu
851 potencial probiótico na aquicultura vem sendo estudado com muito sucesso e eficácia
852 (Ferguson et al., 2010). Estudos comprovam que adição desta cepa bacteriana melhorou
853 a qualidade da água, o crescimento e a resposta imunológica de camarões (Wu et al.,
854 2022). De um modo geral, foi demonstrado que a *P. acidilactici* confere benefícios para
855 a saúde e o desempenho dos animais cultivados sem quaisquer efeitos secundários
856 conhecidos na aquicultura (Ringø et al., 2014).

857 As bactérias probióticas possuem diferentes métodos de aplicação na produção
858 aquícola, podendo ser aplicadas diretamente na água de cultivo ou adicionada a ração
859 fornecida aos animais, ambos métodos de aplicação são eficazes e melhoram o
860 desempenho dos animais cultivados e da qualidade de água, porém ambos possuem

861 diferentes implicações e eficácias (Chu et al., 2014; Ghosh et al., 2016; Luis-Villasenor
862 et al., 2012; Moriarty, 1997; Ringø et al., 2016). Na aquicultura são usados probióticos
863 para prevenção e tratamento de doenças, com modos de administração que variam de
864 acordo com os probióticos usados, a forma de suplementação, o vetor, o nível de dosagem
865 e a duração da aplicação. Os probióticos podem ser adicionados à água em que os animais
866 são cultivados, misturados à ração ou administrados por meio de vacinas ou imersão dos
867 animais em banho. A eficácia desses métodos pode depender de vários fatores, como o
868 tipo e a quantidade de probióticos usados, a composição da ração ou da água e as
869 condições ambientais (Nayak, 2021; Rengpipat et al., 1998; Ringø, 2020).

870 **Objetivo Geral**

871 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes bactérias probióticas
872 isoladas e estratégias de aplicação na qualidade da água, desempenho zootécnico do
873 *Penaeus vannamei*, na fase de engorda em sistema superintensivo, avaliando
874 individualmente o comportamento dos probióticos em diferentes condições de cultivo,
875 seus efeitos de antagonismo com bactérias patogênicas e efeito sobre o sistema imune dos
876 camarões.

877 **Objetivos Específicos**

- 878 • Identificar e caracterizar as bactérias probióticas utilizadas, avaliando diferentes
879 meios de cultivo e condições de crescimento.
- 880 • Avaliar os efeitos da adição das bactérias probióticas isoladas no desempenho
881 zootécnico dos camarões cultivados na fase de engorda e qualidade da água.
- 882 • Avaliar halos de resistência frente a patógenos bacterianos e resposta sistema
883 imune dos camarões.

884 **Material e Métodos**

885 *Condições experimentais*

886 O experimento foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura, do Instituto de
887 Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, Brasil (32°110S;
888 52°100W). O estudo teve a duração de 49 dias. Camarões da espécie *Penaeus vannamei*,

889 provenientes da Aquatec® (Rio Grande do Norte), foram obtidos em estágio de náuplio
890 e passaram pela fase da larvicultura e berçário no Laboratório de Carcinocultura - FURG.
891 Após esse período, pós-larvas com peso médio de 0,48g ($\pm 0,1$) foram estocadas nas
892 unidades experimentais em uma densidade de estocagem de 300 camarões m⁻². O
893 experimento foi realizado em uma sala experimental com controle de temperatura e
894 fotoperíodo. Para controle de temperatura foram utilizados aquecedores de água
895 submersos com termostatos (Stealth, ETP250, USA, 250W). O controle de luminosidade
896 foi feito com temporizador analógico de luz, mantendo em 12 horas de escuro e 12h de
897 claridade. O sistema de aeração era composto por soprador tipo *blower*, onde o oxigênio
898 atmosférico era distribuído em cada unidade experimental através de duas mangueiras
899 microperfuradas (Aerotubes®) de 30 cm. Os tanques possuíam área de fundo de 0,49 m²,
900 com volume útil de 150 litros. Os tanques foram preenchidos com água salgada
901 (salinidade 30). Para desinfecção inicial da água, aplicou-se uma solução de hipoclorito
902 de sódio (10ppm) e posterior aplicação de ácido ascórbico (1ppm) para neutralização dos
903 resíduos de hipoclorito de sódio. O estudo foi realizado em sistema de água clara, para
904 isso, foram realizadas renovações de água de 50% do volume (75 litros) a cada dois dias
905 ou de acordo com as concentrações de amônia e nitrito, durante todo período
906 experimental.

907 *Delineamento experimental*

908 O experimento foi realizado com três repetições por tratamento. Foram utilizados
909 trinta (30) tanques, sendo três tanques para cada tratamento. Os tratamentos foram
910 distribuídos da seguinte maneira:

- 911 • CONTROLE sem adição de probióticos (CTL)
- 912 • *Bacillus subtilis* (BS)
 - 913 ○ PA – Probióticos na água (BS-PA)
 - 914 ○ PR – Probióticos na ração (BS-PR)
 - 915 ○ PRA – Probióticos na ração e na água (BS-PRA)
- 916 • *Lactobacillus plantarum* (LP)
 - 917 ○ PA – Probióticos na água (LP-PA)
 - 918 ○ PR – Probióticos na ração (LP-PR)
 - 919 ○ PRA – Probióticos na ração e na água (LP-PRA)
- 920 • *Pediococcus acidilactici* (PED)

- 921 ○ PA – Probióticos na água (**PED-PA**)
- 922 ○ PR – Probióticos na ração (**PED-PR**)
- 923 ○ PRA – Probióticos na ração e na água (**PED-PRA**)

924 *Aplicação dos probióticos e alimentação*

925 As bactérias probióticas comerciais isoladas e distribuídas em suas respectivas
926 concentrações: *Bacillus subtilis* ($3,4 \times 10^9$ UFC g⁻¹), *Lactobacillus plantarum* ($1,2 \times 10^9$
927 UFC g⁻¹) e *Pediococcus acidilactici* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹), utilizando lactose como veículo.
928 Foram aplicadas as dosagens recomendadas pelo fabricante, diariamente na ração (2g de
929 probiótico/kg de ração) e na água foram utilizadas doses diárias de 1g/tonelada de água,
930 nos tratamentos com duas vias de aplicação, ração e água, as doses eram dobradas. Cada
931 bactéria probiótica isolada foi misturada com água proveniente de cada unidade
932 experimental, para serem aspergidas à ração e pipetadas na água de cultivo. Os camarões
933 foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 16:00 h), utilizando ração comercial Active
934 40% PB (Guabi®) sendo alimentados na fase de engorda seguindo tabelas de alimentação
935 de acordo com a biomassa de cada unidade experimental (Jory et al., 2001).

936 *Qualidade da água*

937 Parâmetros como temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados duas
938 vezes ao dia (08:00 e 17:00h) utilizando um aparelho multiparâmetro da marca YSI®
939 (modelo 556). A salinidade foi verificada semanalmente com o auxílio de um
940 refratômetro óptico (ATC, RTP-20ATC, Brasil). Os níveis da amônia total (N-AT) e
941 nitrito (N-NO₂) foram analisados a cada dois dias seguindo metodologia descritas em
942 (UNESCO, 1983; Strickland & Parsons, 1972). As concentrações de nitrato (N-NO₃),
943 ortofosfato (P-PO₄₋₃) seguiram metodologias de (Aminot & Chaussepied, 1983) e
944 alcalinidade (AOAC, 2005) sendo mensurados semanalmente. Sólidos suspensos totais
945 (SST) foram medidos no início e final do experimento, baseando-se no método de
946 (Strickland & Parsons, 1972).

947 *Desempenho Zootécnico*

948 O crescimento dos camarões em todas as unidades experimentais foi
949 acompanhado por meio de biometrias semanais, utilizando balança digital com precisão
950 de 0,001g. Ao final do experimento, foram avaliados os seguintes parâmetros:
951 sobrevivência: ((biomassa final / peso médio individual final) / n° indivíduos estocados)

952 x 100. Conversão alimentar aparente (C.A.A.): alimento oferecido / incremento de
953 biomassa. Produtividade: (biomassa final / volume unidade experimental).

954 *Identificação das bactérias probióticas*

955 Amostras dos isolados probióticos foram encaminhadas ao LEBIOMM
956 (Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos – Universidade
957 Federal de Juíz de Fora/MG) para identificação das espécies de bactérias com base em
958 suas características morfológicas e sequenciamento genético. Diferentes amostras foram
959 separadas (diluições seriadas de dez vezes foram preparadas para 10⁶) em solução salina
960 0,9% estéril (121 °C por 15 min) e colocadas em placas de ágar Man, Rugosa e Sharpe
961 (MRS - Difco[®]) antes de serem incubadas em uma estufa bacteriológica a 35 °C por 24
962 horas em condições microaerofílicas. Após a verificação do crescimento, todas as
963 colônias bacterianas foram caracterizadas e diferenciadas pela coloração de Gram e
964 novamente isoladas em placas de Petri com Tryptic Soy Agar (TSA - Difco[®]) para
965 confirmar a pureza das bactérias isoladas. Posteriormente, os isolados bacterianos puros
966 foram armazenados a -20 °C em uma solução de glicerol a 10% (Del'Duca et al., 2013).

967 *Curvas de crescimento bacteriano*

968 Foram realizadas curvas de crescimento das diferentes bactérias isoladas presentes
969 no probiótico comercial, em temperatura de 30°C em diferentes meios de cultivo (meio
970 Todd, água marinha e água marinha contendo nutrientes dos bioflocos) durante 48 horas,
971 com coletas feitas a cada 6 horas. Para o crescimento das bactérias em escala líquida,
972 foram utilizados meios Todd e água marinha (contendo nutrientes dos bioflocos, não
973 autoclavada, apenas filtrada), essa água continha os nutrientes de um cultivo anterior,
974 concentrações de amônia e nitrito próximas a zero ou indetectáveis e concentração de
975 nitrato em 80 mg L, salinidade 30 g/L, concentrações de fosfato 2,24 mg L, alcalinidade
976 175 mg CaCO³/L e pH 7,88.

977 A densidade óptica das culturas bacterianas foi medida usando um
978 espectrofotômetro óptico utilizando o comprimento de onda de 600 nm para o meio Todd
979 e 530 nm para o meio em solução salina, seguindo escala de McFarland (BioMerieux,
980 Marcy L'Etoile, France). Cada ensaio foi realizado com três repetições e os valores
981 médios de densidade óptica foram registrados. Para abundância bacteriana total foi usado
982 corante DAPI para contagem das bactérias em ampliação de 1000x usando um
983 microscópio de epifluorescência (Olympus[®] BX-60).

984 *Testes de sensibilidade antimicrobiana (antagonismo)*

985 Para teste de sensibilidade antimicrobiana ou teste de antagonismo “*in vitro*”,
986 foram usados os isolados probióticos e testados contra bactérias patogênicas encontradas
987 em produção aquícola isoladas previamente (Del’Duca et al., 2013). Foram usados 6
988 isolados bacterianos patogênicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*
989 *sp*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas hydrophila* testados
990 contra as bactérias probióticas isoladas e no mix probiótico, cepas utilizadas em estudo
991 prévio (Del’Duca et al., 2015). Para realização do teste as bactérias foram descongeladas,
992 colocadas em solução salina 0,5 McFarland (correspondente a 2×10^8 UFC/ml) onde
993 250µL de cada bactéria probiótica foram pipetados na base do replicador (carimbo) e os
994 patógenos previamente inoculados em placas Petri com ágar nutriente, incubadas a 30°C.
995 Para avaliação do teste foram medidos e registrados os halos de inibição (mm) das
996 bactérias probióticas sobre as placas com bactérias patogênicas. Para interpretação dos
997 dados são classificados como susceptível (S), intermediário (I) e resistente (R). De acordo
998 com diâmetro do halo, são denominados: susceptível ≥ 16 mm, intermediário ≤ 12 mm e
999 resistente < 11 mm (Matuschek et al., 2014).

1000 *Contagem diferencial de hemócitos (CDH)*

1001 Para determinar a contagem diferencial de hemócitos foi utilizada metodologia
1002 adaptada (Salimi et al., 2009). A hemolinfa foi coletada da região ventral de 9 camarões
1003 por tratamento ao final do experimento, utilizando uma seringa de 1 mL previamente
1004 preenchida com heparina (Hepamax-S®) como anticoagulante. O conteúdo foi esfregado
1005 em uma lâmina e fixado com paraformaldeído a 4% e corado com May-Grunwald
1006 Giemsa. Os hemócitos granulares e hialinos foram determinados utilizando um
1007 microscópio óptico modelo Primo Star 415500, marca Zeiss em objetiva de 40x.

1008 *Análise estatística*

1009 Os dados foram submetidos a análise de variância de uma via, levando em
1010 consideração os pressupostos de homocedasticidade e normalidade através dos testes
1011 Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. O teste de Tukey foi aplicado quando
1012 diferenças significativas foram detectadas ($p < 0,05$), os dados de sobrevivência e
1013 contagem diferencial de hemócitos foram transformados (arco seno da raiz quadrada)
1014 antes da análise (Zar, 1999).

1015 **Resultados**

1016 *Qualidade da água*

1017 Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para
 1018 os parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade e alcalinidade.
 1019 Também não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos diferentes
 1020 tratamentos nos parâmetros amônia, nitrito e nitrato, porém foram encontrados resultados
 1021 estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para dados de fosfato e sólidos suspensos totais,
 1022 apresentados na tabela 1.

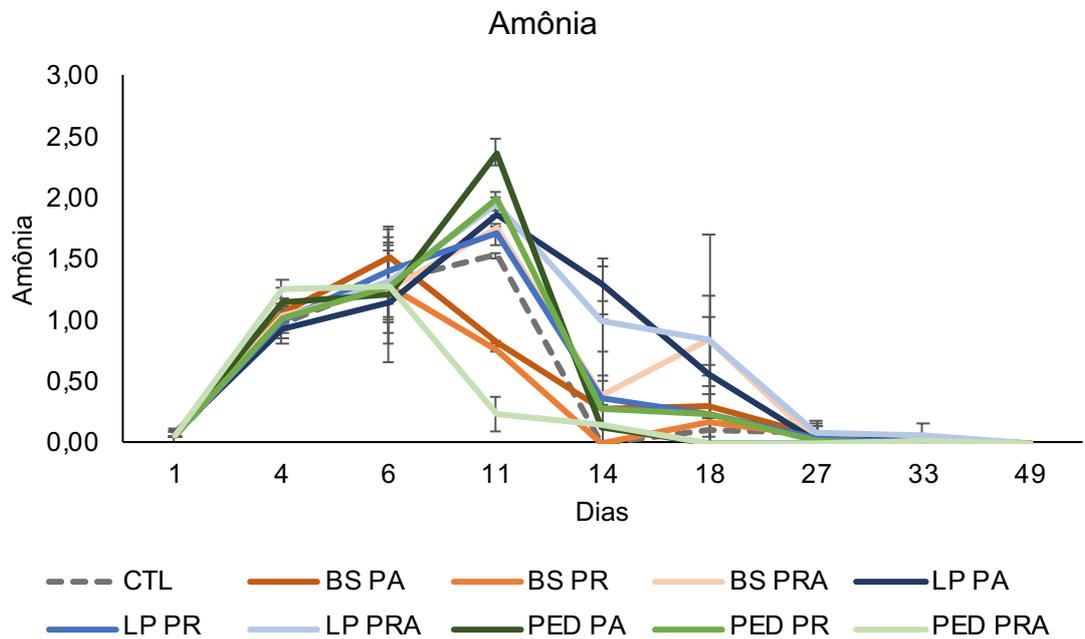
1023 **Tabela 1** - Médias (\pm desvio padrão) dos parâmetros físico e químicos da água na engorda
 1024 de *P. vannamei* em sistema de água clara com aplicação de diferentes espécies de
 1025 bactérias probióticas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus*
 1026 *acidilactici*) em diferentes vias de aplicação (apenas na ração, apenas na água e em ambos
 1027 - na ração e água), durante 49 dias de experimento.

Tratamentos	Temperatura (°C)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH	Salinidade (g/L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	Amônia (N-NH ₃ ⁺ N-NH ₄ mg/L)	Nitrito (N-NO ₂ ⁻ mg/L)	Nitrato (N-NO ₃ ⁻ mg/L)	Fosfato (P-PO ₄ ³⁻ mg/L)	SST (mg/L)
CTL	29,58±0,88	6,44±0,22	8,04±0,05	31,90±0,15	225,56±4,19	0,45±0,61	2,35±1,58	2,78±2,22	0,04±0,01 ^b	83,33±17,56 ^{ab}
BS PA	29,43±0,93	6,40±0,17	7,99±0,03	32,33±0,25	232,22±12,40	0,45±0,55	2,72±1,97	5,56±1,65	0,05±0,01 ^b	85,00±21,79 ^{ab}
BS PR	29,69±0,67	6,40±0,16	8,00±0,03	32,32±0,33	233,33±4,41	0,38±0,50	2,61±2,01	3,78±0,19	0,04±0,01 ^b	90,00±8,66 ^a
BS PRA	30,06±0,50	6,22±0,15	8,00±0,03	32,05±0,28	231,11±8,56	0,60±0,69	2,63±2,02	3,56±3,05	0,07±0,01 ^{ab}	65,00±13,23 ^{ab}
LP PA	29,19±0,94	6,24±0,19	8,05±0,04	32,15±0,20	224,44±7,32	0,66±0,69	2,53±2,28	4,44±1,35	0,07±0,02 ^{ab}	53,33±7,64 ^{ab}
LP PR	30,13±0,38	6,16±0,12	8,04±0,03	32,32±0,13	226,11±5,43	0,53±0,67	2,52±1,93	3,44±1,03	0,06±0,01 ^{ab}	70,00±8,66 ^{ab}
LP PRA	29,61±0,72	6,08±0,25	8,05±0,03	31,55±0,61	227,78±4,81	0,70±0,69	2,24±2,00	2,56±1,65	0,10±0,08 ^a	53,33±2,89 ^{ab}
PED PA	29,68±0,34	6,06±0,10	8,05±0,03	32,10±0,13	216,67±0,01	0,55±0,82	2,44±1,86	3,22±2,05	0,07±0,02 ^{ab}	58,33±23,63 ^{ab}
PED PR	29,87±0,50	6,07±0,16	8,05±0,02	32,30±0,25	226,67±6,01	0,54±0,71	2,45±1,89	1,89±1,18	0,07±0,02 ^{ab}	70,00±5,00 ^{ab}
PED PRA	29,28±0,48	6,14±0,14	8,06±0,03	32,03±0,28	222,22±1,92	0,33±0,53	2,22±1,44	3,78±2,72	0,06±0,01 ^{ab}	48,33±7,64 ^b

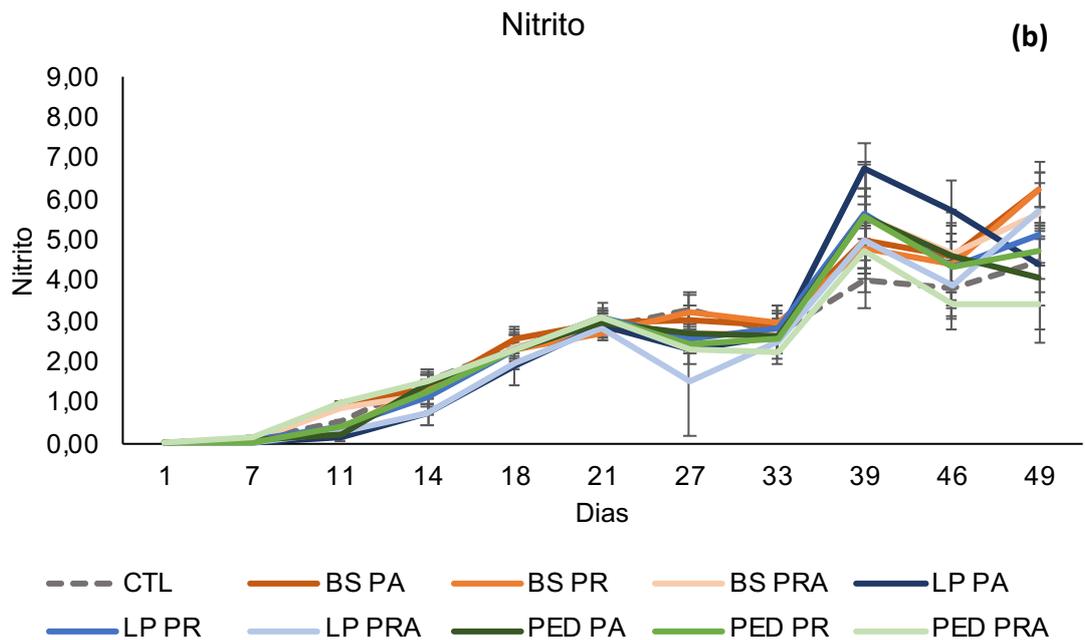
1028 CTL=Controle, BS PA=*Bacillus subtilis* na água, BS PR=*Bacillus subtilis* na ração, BS PRA=*Bacillus*
 1029 *subtilis* na ração e água, LP PA=*Lactobacillus plantarum* na água, LP PR=*Lactobacillus plantarum*
 1030 na ração, LP PRA=*Lactobacillus plantarum* na ração e água, PED PA= *Pediococcus acidilactici* na
 1031 água, PED PR=*Pediococcus acidilactici* na ração, PED PRA=*Pediococcus acidilactici* na ração e
 1032 água.

1033 A temperatura média em todos os tratamentos manteve-se em 29 e 30°C, as
 1034 concentrações de oxigênio dissolvido acima de 6 mg/L, pH entre 7,99 e 8,06, salinidade
 1035 média entre 31 e 32 (g/L) e alcalinidade oscilando entre 216 e 233 (mg CaCO₃/L). As
 1036 concentrações de amônia (a) e nitrito (b) também não diferiram ($p > 0,05$) (figura 1a). As
 1037 concentrações de sólidos suspensos totais (a) e fosfato (b) observados na figura 2

1038 diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), considerando as condições experimentais em água
 1039 clara.



1040



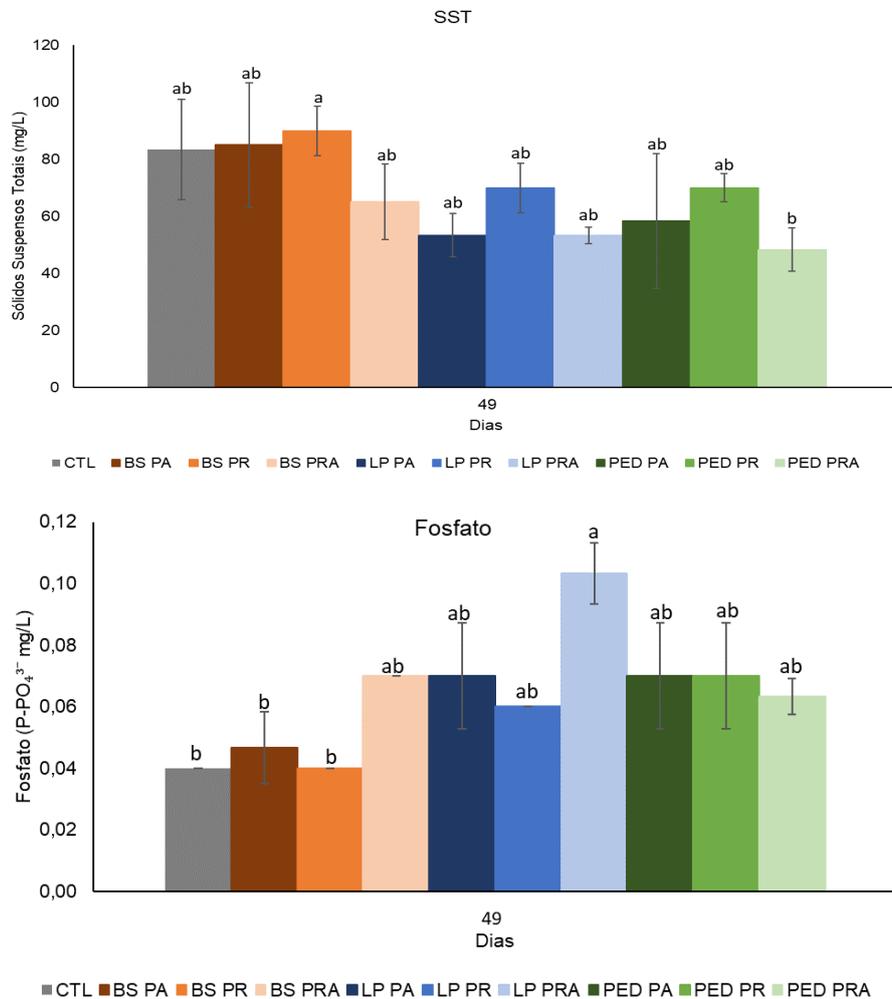
1041

1042 **Figura 1** – Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (a) e nitrito (b)
 1043 durante 49 dias de experimento de engorda em água clara com diferentes bactérias
 1044 probióticas e diferentes vias de aplicação. Médias e desvios padrão são mostrados nos
 1045 gráficos.

1046

1047 Os sólidos suspensos totais observados na figura 2 (a) apresentam concentrações
 1048 baixas considerando as condições experimentais em água clara, porém foram encontradas
 1049 diferenças significativas entre os tratamentos, onde as menores concentrações obtidas

1050 foram no tratamento PED PRA, e as maiores no tratamento BS PRA. Para as
 1051 concentrações de fosfato (b) foram encontradas diferenças entre os tratamentos CTL, BS
 1052 PA e BS PR com menores concentrações, e o tratamento LP PRA com as maiores
 1053 concentrações.



1054

1055

1056 **Figura 2** – Concentração de sólidos suspensos totais (a) (mg/L) e concentrações de
 1057 fosfato (b) (P-PO₄³⁻ mg/L) ao final do período experimental de engorda em água clara
 1058 com diferentes bactérias probióticas e diferentes vias de aplicação. Médias e desvios
 1059 padrão são mostrados no gráfico. Letras diferentes indicam diferença significativa
 1060 (p<0,05).

1061

Desempenho Zootécnico

1062

1063 O peso médio final (g) foi significativamente maior nos tratamentos (p<0,05),
 1064 onde houve a adição de probióticos *Bacillus subtilis* na ração e na água (BS PRA) com
 1065 8,75g, comparado com os demais tratamentos, porém similar ao *Bacillus subtilis* na ração
 1066 (BS PR) com 8,08g e ao *Lactobacillus plantarum* na ração e na água (LP PRA) com
 1067 8,05g. O menor peso médio foi encontrado no tratamento com *Pediococcus acidilactici*
 na água (PED PA) com 6,69g e similar ao tratamento da mesma bactéria, porém

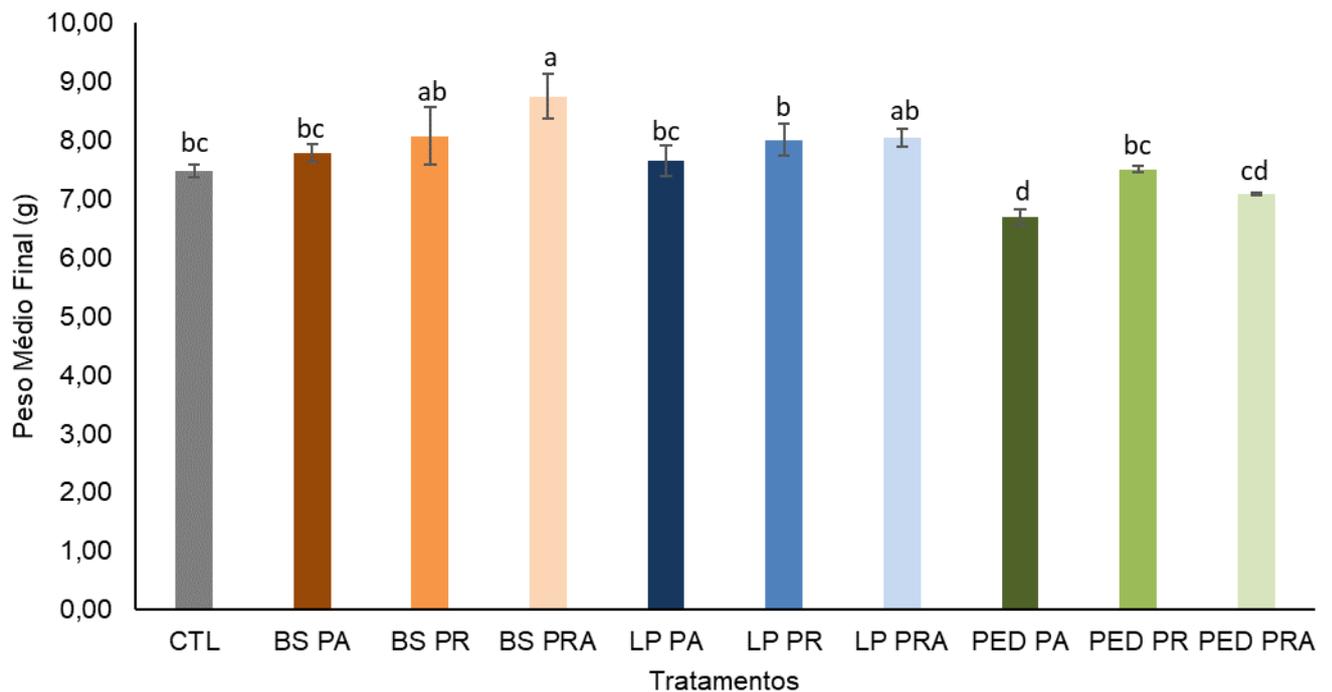
1068 adicionado na ração e na água (PED PRA) com 7,08g. O tratamento controle sem adição
 1069 de probióticos (CTL) obteve valores de peso médio 7,48g (figura 3). Dados de
 1070 sobrevivência (%) e conversão alimentar aparente (CAA) não diferiram estatisticamente
 1071 ($p>0,05$), variando entre 93,3 e 99,3 % e 1,42 e 1,66, respectivamente como observados
 1072 na tabela 3.

1073 **Tabela 2** – Médias (\pm desvio padrão) dos parâmetros zootécnicos durante 49 dias de
 1074 experimento de engorda em água clara com diferentes bactérias probióticas e diferentes
 1075 vias de aplicação. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas
 1076 ($p<0,05$).

Tratamentos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Sobrevivência (%)	CAA	Biomassa final (g)	Produtividade (kg/m ²)
CTL	0,48 \pm 0,10	7,48 \pm 0,10 ^{bc}	93,33 \pm 4,16	1,57 \pm 0,12	349,02 \pm 12,52 ^{ab}	0,66 \pm 0,03 ^{ab}
BS PA	0,48 \pm 0,10	7,78 \pm 0,15 ^{bc}	98,00 \pm 2,00	1,50 \pm 0,11	383,43 \pm 15,95 ^{ab}	0,73 \pm 0,03 ^{ab}
BS PR	0,48 \pm 0,10	8,08 \pm 0,50 ^{ab}	98,67 \pm 2,31	1,49 \pm 0,10	401,02 \pm 23,94 ^{ab}	0,77 \pm 0,05 ^{ab}
BS PRA	0,48 \pm 0,10	8,75 \pm 0,38 ^a	94,67 \pm 4,62	1,42 \pm 0,15	420,11 \pm 34,87 ^a	0,81 \pm 0,07 ^a
LP PA	0,48 \pm 0,10	7,65 \pm 0,26 ^{bc}	97,33 \pm 4,62	1,52 \pm 0,14	387,10 \pm 21,20 ^{ab}	0,74 \pm 0,04 ^{ab}
LP PR	0,48 \pm 0,10	8,01 \pm 0,27 ^b	94,00 \pm 2,00	1,52 \pm 0,07	376,57 \pm 18,12 ^{ab}	0,72 \pm 0,04 ^{ab}
LP PRA	0,48 \pm 0,10	8,05 \pm 0,15 ^{ab}	94,67 \pm 9,24	1,48 \pm 0,29	399,41 \pm 57,32 ^{ab}	0,77 \pm 0,12 ^{ab}
PED PA	0,48 \pm 0,10	6,69 \pm 0,13 ^d	98,00 \pm 2,00	1,66 \pm 0,20	327,94 \pm 11,25 ^b	0,62 \pm 0,02 ^b
PED PR	0,48 \pm 0,10	7,51 \pm 0,05 ^{bc}	98,67 \pm 2,31	1,46 \pm 0,02	373,03 \pm 12,63 ^{ab}	0,71 \pm 0,03 ^{ab}
PED PRA	0,48 \pm 0,10	7,08 \pm 0,02 ^{cd}	99,33 \pm 1,15	1,44 \pm 0,11	358,85 \pm 14,96 ^{ab}	0,68 \pm 0,03 ^{ab}

1077 CTL=Controle, BS PA=*Bacillus subtilis* na água, BS PR=*Bacillus subtilis* na ração, BS
 1078 PRA=*Bacillus subtilis* na ração e água, LP PA=*Lactobacillus plantarum* na água, LP
 1079 PR=*Lactobacillus plantarum* na ração, LP PRA=*Lactobacillus plantarum* na ração e água, PED
 1080 PA= *Pediococcus acidilactici* na água, PED PR=*Pediococcus acidilactici* na ração, PED
 1081 PRA=*Pediococcus acidilactici* na ração e água.

1082 Valores de biomassa final (g) foram encontradas diferenças significativas entre o
 1083 maior valor, 420,11g encontrado no tratamento *Bacillus subtilis* na ração e água (BS
 1084 PRA) e o menor valor 327,94g no tratamento *Pediococcus acidilactici* na água (PED PA)
 1085 e produtividade (kg/m²) manteve o padrão, onde o maior valor, 0,81 kg/m² no tratamento
 1086 (BS PRA) e o menor valor, 0,62 kg/m² no tratamento (PED PA) valores encontrados na
 1087 tabela 3.



1089 **Figura 3** – Peso médio final (g) ao final de 49 dias de engorda em água clara,
 1090 tratamentos: CTL=Controle, BS PA=*Bacillus subtilis* na água, BS PR=*Bacillus subtilis*
 1091 na ração, BS PRA=*Bacillus subtilis* na ração e água, LP PA=*Lactobacillus plantarum* na
 1092 água, LP PR=*Lactobacillus plantarum* na ração, LP PRA=*Lactobacillus plantarum* na
 1093 ração e água, PED PA= *Pediococcus acidilactici* na água, PED PR=*Pediococcus*
 1094 *acidilactici* na ração, PED PRA=*Pediococcus acidilactici* na ração e água.

1095 *Identificação das bactérias*

1096 As bactérias probióticas foram isoladas do mix probiótico comercial em meio
 1097 específico de cultura onde foram classificadas de acordo com suas características de
 1098 colônias, morfologia e compatibilidade com GenBank (tabela 4).

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106

1107

1108 **Tabela 3** – Características das colônias, morfologia celular e comparação com dados
 1109 disponíveis no GenBank das bactérias probióticas isoladas do mix comercial e usadas no
 1110 presente experimento.

Isolado	Morfologia	Características das colônias	Proximidade GenBank	Números de pares de bases	Similaridade
BS	Bacilos gram positivos	Grandes e circulares, borda irregular, cor creme opaca	<i>Bacillus sp</i>	300	99%
LP	Bastonetes gram positivos	Médias e circulares, borda regular, altura elevada, cor branca opaca	<i>Lactobacillus sp</i>	119	98%
PA	Cocos gram positivos	Pequenas e irregulares, elevadas, cor amarelada opaca	<i>Pediococcus sp</i>	526	99%

1111 BS = *Bacillus subtilis*, LP = *Lactobacillus plantarum*, PA = *Pediococcus acidilactici*.

1112 *Curvas de crescimento bacteriano*

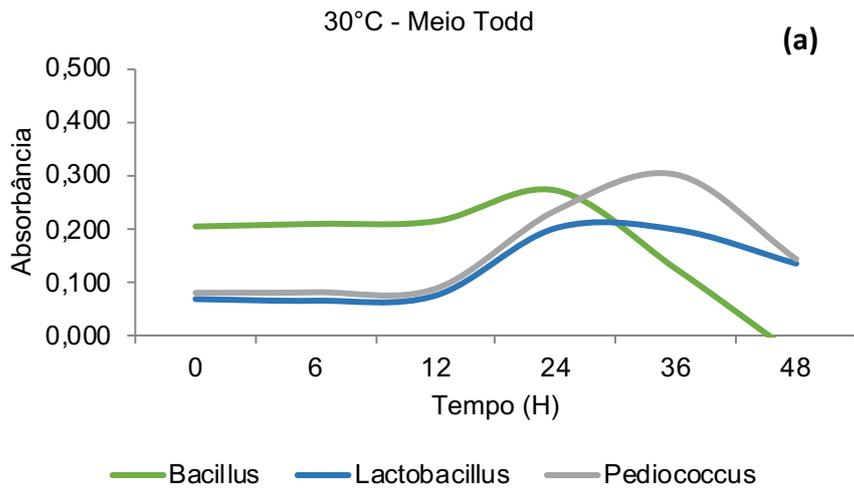
1113 Na figura 4 (b) onde os bacilos obtiveram melhor crescimento após 36h, com
 1114 maior número de org/mL (160^6 org/mL), porém as bactérias ácido lácticas tiveram
 1115 comportamentos diferentes, onde os lactobacilos e pediococcus obtiveram maior
 1116 crescimento (100^6 org/L) próximo as 12h experimentais, com curva decrescente em 24h.

1117

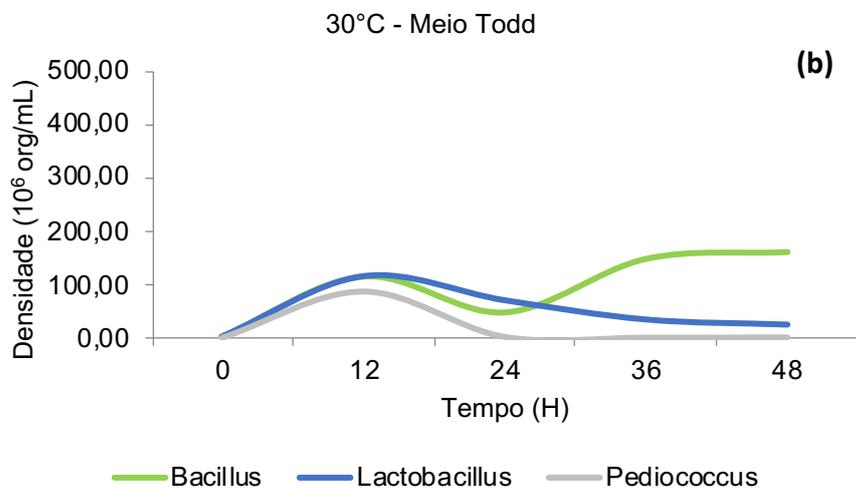
1118

1119

1120



1121



1122

1123

1124

1125 **Figura 4** – Densidade óptica medida em absorbância (a) e contagem de organismos/mL

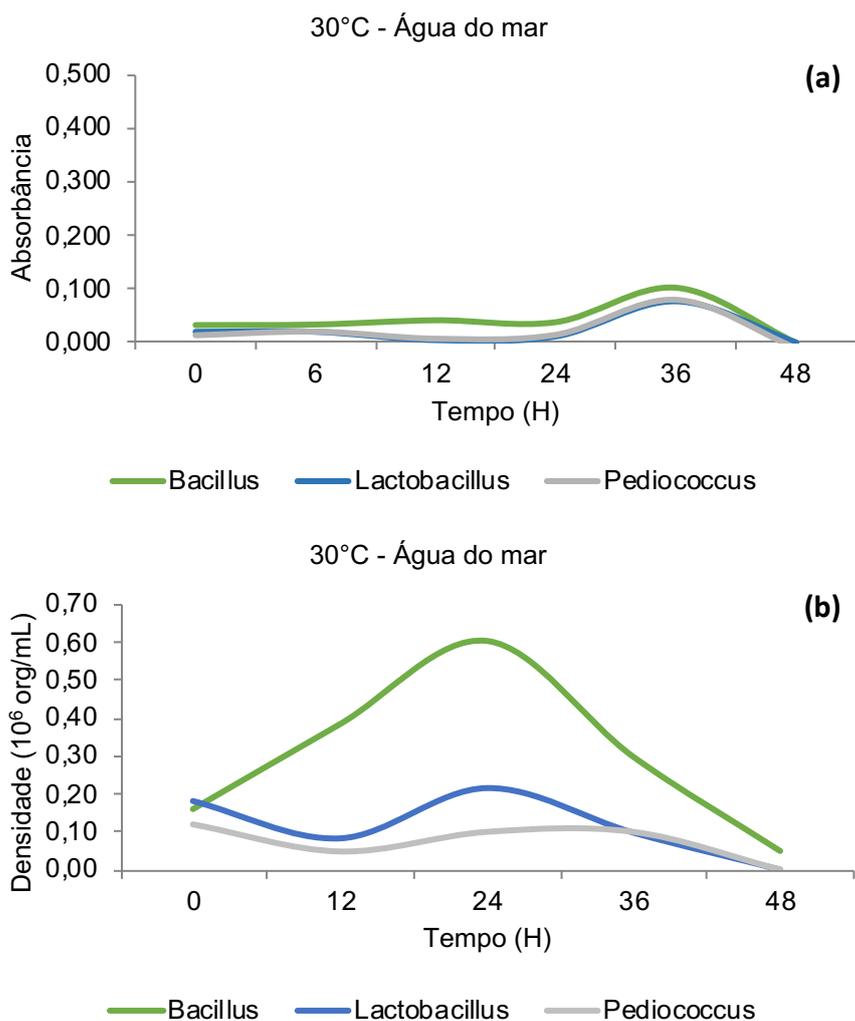
1126 (10^6) (b), usando os diferentes isolados em meio Todd específico para crescimento

1127 bacteriano em forma líquida, ao longo de 48h em temperatura de 30°C constante.

1128

1129

1130



1131

1132

1133

1134

1135

1136

Figura 5 - Densidade óptica medida em absorbância (a) e contagem de organismos/mL (10^6) (b), usando os diferentes isolados em água marinha filtrada (30 g/L), ao longo de 48h em temperatura de 30°C constante.

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

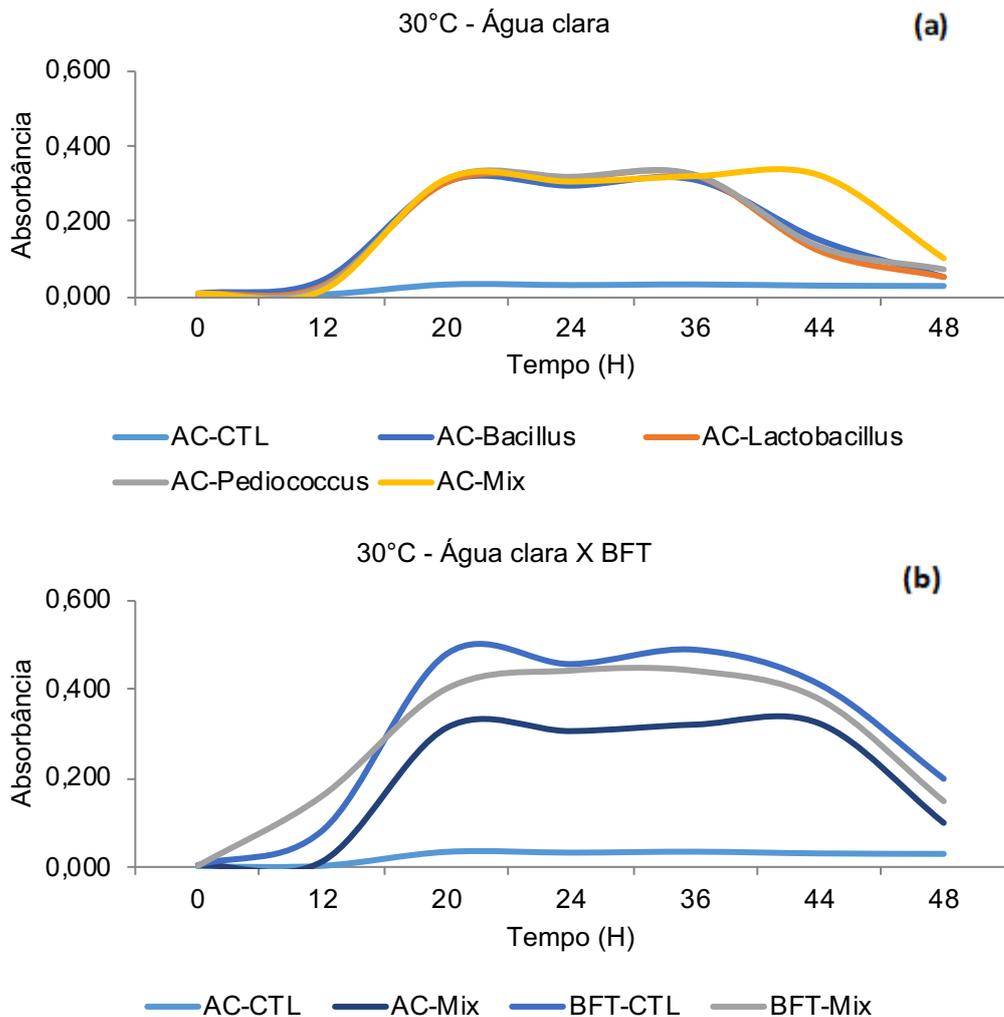
1144

1145

1146

1147

Testes com água marinha (30g/L) contendo nutrientes de um cultivo prévio, em sistema de bioflocos, onde as concentrações de amônia e nitrito estavam indetectáveis e as concentrações de nitrato em 80 mg/L são observadas na figura 6. Apenas em água clara os resultados foram similares para todas as bactérias isoladas com crescimento exponencial em 20h, fase estacionária até 36h e posterior decaimento, com exceção do mix que manteve sua fase estacionária após 44h, entrando em decaimento apenas próximo das 48h (a). Teste realizado entre água clara e água com bioflocos (BFT) observamos crescimento superior em água enriquecida com nutrientes dos bioflocos, indicando que servem como nutriente para crescimento bacteriano, onde o BFT-CTL obteve mesmo crescimento de curva que o BFT-Mix, crescimento próximo as 20h e fase estacionária até 44h, entrando em decaimento com 48h (b).



1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

Figura 6 - Densidade óptica medida em absorbância de ambos isolados probióticos e do mix em água clara (marinha) e água clara sem adição de probióticos (a). Densidade óptica medida em absorbância do mix probiótico em água clara (marinha) e em água contendo nutrientes dos bioflocos (BFT) (b), ao longo de 48h em temperatura de 30°C constante.

Teste de sensibilidade antimicrobiana (antagonismo)

Testes de antagonismo das bactérias probióticas contra bactérias patogênicas forneceram diversos resultados observados na tabela 5, onde diferentes tamanhos de halos (mm) foram gerados. Observa-se que o mix probiótico conferiu maiores halos de resistência contra todas as bactérias patogênicas, os bacilos isolados conseguiram gerar halos maiores em todos os ensaios, lactobacilos e pediococos apresentaram halos maiores em espécies específicas.

1165 **Tabela 4** – Teste de antagonismo *in vitro* das bactérias probióticas isoladas e do mix
 1166 probiótico contra bactérias patogênicas. EC=*Escherichia coli*; SA=*Staphylococcus*
 1167 *aureus*; SS=*Salmonella sp*; VP=*Vibrio parahaemolyticus*; PF=*Pseudomonas fluorescens*
 1168 e AH=*Aeromonas hydrophila*

	EC	SA	SS	VP	PF	AH
<i>Bacillus subtilis</i>	18,0±0,03 ^{ab}	10,3±0,06 ^a	15,0±0,04 ^a	10,7±0,02 ^{ab}	10,3±0,01 ^a	9,0±0,02 ^{ab}
	Susceptível	Resistente	Intermed.	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10,7±0,08 ^{ab}	5,3±0,03 ^a	11,0±0,01 ^b	7,6±0,01 ^{ab}	0,7±0,00 ^b	1,3±0,01 ^{bc}
	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Pediococcus acidilactici</i>	7,3±0,01 ^b	1,7±0,01 ^b	2,0±0,00 ^c	0,7±0,01 ^b	0,8±0,01 ^b	1,0±0,02 ^c
	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Mix probiótico	19,3±0,06 ^a	12,5±0,05 ^a	17,0±0,07 ^a	17,8±0,05 ^a	11,7±0,02 ^a	11,4±0,04 ^a
	Susceptível	Intermed.	Susceptível	Susceptível	Intermed.	Intermed.

1169 Valores médios (±desvio padrão) dos halos de inibição (mm) das bactérias probióticas contra as
 1170 bactérias patogênicas. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas
 1171 (p<0,05).

1172

1173 *Contagem diferencial de hemócitos (CDH)*

1174 Os dados da contagem total de hemócitos estão apresentados na tabela 6. Foram
 1175 observadas diferenças significativas na contagem total de hemócitos, com maior número
 1176 de células nos tratamentos com adição de bactérias probióticas quando comparados ao
 1177 controle, excetuando-se os tratamentos com adição de *P. acidilactici* e o tratamento LP
 1178 PRA (*L. plantarum* na ração e água). Maior porcentagem de hemócitos granulares foram
 1179 observadas no tratamento controle comparado aos tratamentos com aplicação de bactérias
 1180 probióticas. Da mesma maneira, os hemócitos hialinos foram observados em maiores
 1181 proporções nos tratamentos com adição de bactérias probióticas em comparação ao
 1182 controle (CTL).

1183

1184

1185

1186

1187

1188

1189 **Tabela 5** – Contagem diferencial de hemócitos, dividido em contagem total de hemócitos,
 1190 hemócitos hialinos (%) e hemócitos granulares (%) ao final do período experimental nos
 1191 diferentes tratamentos.

	Total hemócitos	Hialinos (%)	Granulares (%)
CTL	113,3±2,5 ^e	26,8±3,2 ^b	73,2±3,2 ^a
BS PA	345,0±48,7 ^{ab}	63,3±3,2 ^a	36,7±3,2 ^b
BS PR	419,0±17,1 ^a	65,6±4,7 ^a	34,4±4,7 ^b
BS PRA	410,0±64,5 ^a	63,9±9,1 ^a	36,1±9,1 ^b
LP PA	260,3±21,9 ^{bcd}	62,6±5,2 ^a	37,4±5,2 ^b
LP PR	306,3±6,5 ^{bc}	65,1±5,8 ^a	34,9±5,8 ^b
LP PRA	235,3±29,7 ^{cde}	55,3±6,4 ^a	44,7±6,4 ^b
PED PA	153,0±38,0 ^e	68,2±10,4 ^a	31,8±10,4 ^b
PED PR	172,0±2,6 ^{de}	59,9±3,3 ^a	40,1±3,3 ^b
PED PRA	185,0±19,0 ^{de}	50,3±10,5 ^a	49,7±10,5 ^b

1192 CTL=Controle, BS PA=*Bacillus subtilis* na água, BS PR=*Bacillus subtilis* na ração, BS
 1193 PRA=*Bacillus subtilis* na ração e água, LP PA=*Lactobacillus plantarum* na água, LP
 1194 PR=*Lactobacillus plantarum* na ração, LP PRA=*Lactobacillus plantarum* na ração e água, PED
 1195 PA= *Pediococcus acidilactici* na água, PED PR=*Pediococcus acidilactici* na ração, PED
 1196 PRA=*Pediococcus acidilactici* na ração e água. Letra diferentes na mesma coluna indicam
 1197 diferenças significativas (p<0,05).

1198
 1199
 1200

1201 **Discussão**

1202 A manutenção dos níveis de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade e
 1203 alcalinidade ao longo do período experimental são fundamentais durante um cultivo, pois
 1204 afetam diretamente os processos metabólicos dos camarões. A estabilidade desses níveis
 1205 dentro das faixas recomendadas sugere um controle eficaz das condições do sistema,
 1206 sendo assim, não influenciando negativamente no desenvolvimento do experimento. Essa
 1207 estabilidade está em conformidade com estudos anteriores que destacam a importância
 1208 do controle dos parâmetros avaliados, onde mantiveram-se dentro dos níveis
 1209 recomendados para a espécie e sem afetar o desempenho dos organismos cultivados
 1210 (Furtado et al., 2011, 2015; Wyk & Scarpa, 1999).

1211 Manter as concentrações de amônia, nitrito e nitrato controladas é vital para
 1212 prevenir estresse e doenças nos camarões ao longo do ciclo de cultivo. Os compostos

1213 nitrogenados mantiveram-se controlados devido as taxas de renovação de água clara e
1214 manutenção constante das unidades experimentais. O controle rigoroso desses
1215 parâmetros, mantendo-se dentro das faixas recomendadas, promove um ambiente
1216 aquático favorável, assegurando o bem-estar e a produtividade sustentável do *P.*
1217 *vannamei* (Hostins et al., 2017; Lin & Chen, 2001; Wei et al., 2022). Os valores
1218 mantiveram-se dentro do aceitável para a espécie e encontrados em outros estudos
1219 (Esparza-Leal et al., 2016; Kuhn et al., 2010; Lin & Chen, 2001).

1220 As concentrações de fosfato encontradas, apesar de diferirem significativamente
1221 entre os tratamentos, mantiveram-se em níveis baixos, variando entre 0,04 mg/L no
1222 tratamento CTL e 0,10 mg/L no tratamento LP PRA e próximos aos encontrados em
1223 experimentos em fases iniciais em viveiros (Burford et al., 2003; Zemor et al., 2019).
1224 Sólidos suspensos totais em condições experimentais em água clara não são considerados
1225 importantes como em condições experimentais em bioflocos, sendo assim, as
1226 concentrações foram baixas devido as altas taxas de renovações e constante controle da
1227 qualidade da água, no entanto houve diferença significativa entre os tratamentos, onde o
1228 tratamento com menor concentração de sólidos suspensos totais foi o PED PRA e o maior
1229 valor médio foi encontrado no tratamento BS PA, enfatizando que são valores inferiores
1230 a 100 mg/L, diferente das concentrações encontradas em condições experimentais
1231 heterotróficas, que podem chegar a 500 mg/L (Gaona et al., 2011).

1232 No presente estudo os tratamentos com *Bacillus subtilis* apresentaram maior peso
1233 final ($8,75 \pm 0,38$ g) quando aplicados na ração e na água BS PRA, sendo estatisticamente
1234 similar ao tratamento com *B. subtilis* adicionado somente na ração BS PR (8,08g) e ao
1235 tratamento com *L. plantarum* adicionado na ração e na água LP PRA (8,05g), estudos
1236 similares com adição de *B. subtilis* e *L. plantarum* apontam melhoras nos dados de
1237 desempenho zootécnico, como peso final, muitas vezes atribuídos a melhor absorção dos
1238 nutrientes da ração, melhora da imunidade dos animais e controle de bactérias patogênicas
1239 (Du et al., 2022; Interaminense et al., 2019). No tratamento LP PR o peso final foi de
1240 8,01g sendo próximo estatisticamente dos pesos finais com 7,48; 7,51; 7,65 e 7,78g que
1241 foram encontrados nos tratamentos CTL, PED PR, LP PA e BS PA, respectivamente,
1242 observa-se que a inclusão de duas vias de aplicação (PRA) ou apenas na ração (PR)
1243 mostram-se mais eficientes para um melhor desempenho zootécnico com exceção dos
1244 tratamentos com *Pediococcus acidilactici* adicionados na ração e na água (PED PRA)
1245 com peso final de 7,08g e adicionados somente na água (PED PA) com peso final de
1246 6,69g apresentando menor desempenho zootécnico, resultados similares foram

1247 encontrados em experimentos controle versus bactérias ácido lácticas (Kongnum &
1248 Hongpattarakere, 2012). Estudos com *Pediococcus acidilactici* mostram sua capacidade
1249 probiótica de forma satisfatória, mas quando comparado com outras bactérias como
1250 *Lactobacillus sp* apresentam efeitos menos notáveis (Wu et al., 2022).

1251 Neste estudo não foram observadas diferenças significativas para sobrevivência,
1252 os dados obtidos variam de 93,3% no tratamento CTL e 99,3% para o tratamento PED
1253 PRA, ambos podem ser considerados satisfatórios assim como encontrados em outros
1254 experimentos em água clara (Esparza-Leal et al., 2016; MAICÁ et al., 2018). Não foram
1255 encontradas diferenças significativas também para os valores de conversão alimentar
1256 aparente, onde foram encontrados valores de 1,42 no tratamento BS PRA e 1,66 para
1257 tratamento PED PA, valores encontrados em água clara tendem a serem maiores que a
1258 conversão alimentar aparente em sistemas de bioflocos (Sistema BFT) (Wasielesky et al.,
1259 2006).

1260 Os testes de crescimento bacteriano realizados em água marinha demonstraram a
1261 viabilidade das bactérias probióticas, mostrando suas habilidades de crescimento e
1262 sobrevivência, tolerando salinidade 30 e temperatura de 30°C. As curvas de crescimento
1263 em água salgada de *B. subtilis* comportaram-se de maneira diferente das bactérias ácido
1264 lácticas, onde obteve-se maior crescimento em 24h, *L. plantarum* e *P. acidilactici* também
1265 cresceram em 24h, porém expressaram seu crescimento três vezes menor que os bacilos.
1266 Resultados semelhantes foram encontrados onde curvas de crescimento foram testadas
1267 em 34 salinidade, as cepas bacterianas embora tenham apresentado uma taxa de
1268 crescimento lenta, demonstraram capacidade de prosperar e se reproduzir em condições
1269 de água marinha, confirmando sua aplicabilidade como probióticos em sistemas aquáticos
1270 marinhos (Tank et al., 2018). Estudos em organismos aquáticos evidenciaram que as
1271 bactérias do gênero *Vibrio sp.* apresentaram maior abundância ou prevalência na
1272 microbiota intestinal em condições com salinidade 30 (Zheng et al., 2022). A
1273 possibilidade de crescimento dos bacilos e bactérias ácido lácticas em condições de
1274 salinidade 30 como testado no presente estudo pode contribuir para melhor desempenho
1275 zootécnico e melhora do sistema imune dos camarões.

1276 Os resultados do presente estudo são respaldados por trabalhos que utilizaram
1277 salinidade próxima à 29 e confirmaram a tolerância ao sal de *B. subtilis* (Ikeuchi et al.,
1278 2003). Em testes realizados com várias soluções de alta salinidade para a imersão de *B.*
1279 *subtilis*, observaram atividade metabólica da bactéria e efeitos moderados na germinação
1280 dos esporos bacterianos até aproximadamente salinidade 70 (Nagler et al., 2014). As

1281 bactérias ácido lácticas isoladas do intestino de peixes de água doce mostraram ampla
1282 adaptação a salinidade variando de 0 a 35, além disso as cepas isoladas foram capazes de
1283 combater patógenos específicos, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
1284 *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* (Chong et al., 2019). Para contribuir com
1285 dados sobre crescimento bacteriano as curvas de crescimento das diferentes bactérias
1286 probióticas e o mix probiótico foram testados em condições de água marinha (salinidade
1287 30) e água contendo nutrientes dos bioflocos foram observadas curvas de crescimento em
1288 20h, onde somente adição do mix probiótico em água clara obteve valor médio de
1289 absorvância de 0,3. As curvas de crescimento com água marinha contendo bioflocos e
1290 adição do mix probiótico cresceram mais no mesmo tempo (20h), com valores de
1291 absorvância de 0,4 e a curva de crescimento controle, apenas com os bioflocos teve valor
1292 médio de 0,5. Esses dados são de extrema importância para ressaltar a capacidade de
1293 aporte de nutrientes que compõem uma água com nutrientes provenientes do sistema de
1294 bioflocos, alguns estudos mostram a ciclagem dos nutrientes em sistemas de bioflocos
1295 (Luis-Villaseñor et al., 2015; Miranda-Baeza et al., 2020).

1296 Diversos estudos demonstram que os probióticos contribuem para a exclusão de
1297 patógenos, melhora do crescimento, sobrevivência e melhor absorção dos nutrientes,
1298 além de modulação imunológica em crustáceos (Jastaniah et al., 2023; NavinChandran et
1299 al., 2014; Wang et al., 2023). As bactérias probióticas na aquicultura podem atuar como
1300 agentes de controle microbiano, produzindo compostos que inibem patógenos,
1301 competindo com microrganismos nocivos, aumentando a resposta imunológica e
1302 melhorando a qualidade da água (Verschuere, L.G.Rombaut, P.Sorgeloos, 2000).

1303 As diferentes bactérias probióticas testadas geraram halos de resistência contra
1304 diferentes patógenos, através do teste de sensibilidade antimicrobiana. Testes *in vitro* com
1305 cepas de *L. plantarum* isoladas do intestino de *P. vannamei* apresentaram amplo espectro
1306 de ação, os maiores halos de inibição contra diversos patógenos, alta taxa de crescimento
1307 e tolerância a todos os parâmetros avaliados, incluindo salinidades de 1,5 e 3% (Vieira et
1308 al., 2013). Os halos de resistência encontrados variaram de 0,7 a 19,3 mm, onde o mix
1309 probiótico obteve os maiores halos contra as bactérias patogênicas *E. coli*, *Salmonella sp*
1310 e *V. parahaemolyticus*, sendo assim, consideradas susceptíveis ao mix de bactérias
1311 probióticas. *Bacillus subtilis* gerou seu maior halo contra o patógeno *E. coli* (18mm) e
1312 para *Salmonella sp* gerou halo (15mm) sendo considerado intermediário e resistente para
1313 as demais bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*,
1314 *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas hydrophila*. Diferentemente dos resultados

1315 encontrados com *Bacillus sp.* isolados, que apresentaram potencial como probióticos
1316 eficazes na aquicultura, oferecendo benefícios significativos para a saúde e resistência
1317 contra patógenos como *Vibrio sp* e *Aeromonas sp*, através da atividade enzimática,
1318 incluindo amilase, protease e lipase (Sam-on et al., 2022). As bacteriocinas produzidas
1319 por algumas espécies de bactérias probióticas desempenham grande atividade
1320 antagonista, onde a microbiota intestinal colonizada por bactérias probióticas inibindo os
1321 patógenos por meio do antagonismo bacteriano, interferência bacteriana, efeito de
1322 barreira, resistência à colonização e exclusão competitiva (Patterson & Burkholder, 2003;
1323 Sahoo et al., 2016)

1324 As bactérias ácido lácticas isoladas não formaram halos de grande
1325 susceptibilidade contra os patógenos testados, contrário dos resultados encontrados de
1326 espécies de Lactobacilos isoladas do intestino de peixes que apresentaram atividade
1327 antimicrobiana significativa contra espécies patogênicas de *Aeromonas sp* e *Vibrio sp*
1328 (Dhanasekaran et al., 2010). A maior eficiência contra patógenos pode ser atribuída ao
1329 uso de multiespécies em um mesmo produto, ou seja, suplementos de probióticos na
1330 forma de multiespécies/multicepas são mais eficazes do que probióticos individuais, tais
1331 efeitos benéficos podem ser causados por sinergismo e potenciais interações entre as
1332 diferentes espécies (Mohapatra et al., 2012; Timmerman et al., 2004).

1333 No que diz respeito à resposta imunológica, os hemócitos constituem células
1334 sanguíneas presentes em animais invertebrados, como os camarões peneídeos. Essas
1335 células desempenham uma função crucial no sistema imune, atuando na defesa do
1336 organismo contra infecções e diversas formas de agressões. Além disso, elas contribuem
1337 diretamente para a defesa imunológica básica, coagulação da hemolinfa, transporte de
1338 nutrientes e eliminação de resíduos (B. Li et al., 2014; Martin & Graves, 1985). Os
1339 hemócitos do camarão desempenham funções de desintoxicação relacionadas ao acúmulo
1340 de compostos nitrogenados e seus efeitos tóxicos (Sumon et al., 2022). No presente estudo
1341 a contagem total de hemócitos foi significativamente maior nos tratamentos com *B.*
1342 *subtilis*, seguido por *L. plantarum* e *P. acidilactici*, indicando maior atividade indicando
1343 uma resposta imunológica reforçada, pois os hemócitos estão diretamente envolvidos no
1344 reconhecimento e na eliminação de agentes patogênicos no corpo do camarão. Em
1345 condições de estresse os hemócitos granulares encontram-se em maior atividade, devido
1346 a resposta imune contra bactérias invasoras e atuam na encapsulação desses patógenos,
1347 ajudando a limitar a disseminação de doenças aos organismos cultivados (B. Li et al.,
1348 2014). Assim como encontrado neste estudo onde o tratamento Controle (sem adição de

1349 probióticos) obteve maior contagem de hemócitos granulares. Embora os hemócitos
1350 hialinos desempenhem uma função crucial na resposta imunológica, sua principal
1351 atividade está associada à fagocitose, ou seja, à ingestão de partículas estranhas, como
1352 bactérias, para proteger o organismo contra infecções (Abdollahi-arpanahi et al., 2018;
1353 Sadat Hoseini Madani et al., 2018). No presente estudo todas as bactérias probióticas
1354 apresentaram contagem de hemócitos hialinos menores quando comparadas com
1355 Controle, confirmando ação das bactérias probióticas sobre o sistema imunológico dos
1356 camarões peneídeos.

1357

1358

1359 **Conclusões**

1360 Neste estudo os resultados encontrados contribuem substancialmente para o
1361 melhor entendimento do comportamento das bactérias probióticas sobre diferentes
1362 condições de disponibilidade de nutrientes e salinidade, tanto *Bacillus subtilis* como as
1363 bactérias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici* foram
1364 capazes de crescer em salinidade 30 e os nutrientes dos bioflocos podem contribuir para
1365 maior crescimento dos probióticos. Os dados de desempenho zootécnico encontrados
1366 neste trabalho mostram a eficiência dos *Bacillus subtilis* e sua adição na ração e na água
1367 em conjunto, obtendo maior peso final e produtividade. *Lactobacillus plantarum* e
1368 *Pediococcus acidilactici* obtiveram resultados de peso final e produtividade satisfatórios,
1369 porém inferiores aos bacilos. O uso do mix probiótico se mostrou eficaz contra diversos
1370 patógenos comuns de sistemas de aquicultura. O uso de probióticos confirmou-se como
1371 uma ferramenta de extrema importância para manutenção do sistema imune dos
1372 camarões.

1373 **Referências Bibliográficas**

- 1374 Abdollahi-arpanahi, D., Soltani, E., & Jafaryan, H. (2018). Efficacy of two commercial
1375 and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth
1376 performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp
1377 (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*,
1378 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.082>
1379 Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics
1380 associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 733–
1381 741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
1382 Aminot, A., & Chaussepied, M. (1983). Manuel des analyses chimiques en milieu
1383 marin. *CNEXO, Brest*. <http://pascal->

- 1384 francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=6411644
- 1385 AOAC, C. (2005). Official methods of analysis of the Association of Analytical
- 1386 Chemists International. *Official Methods: Gaithersburg, MD, USA*.
- 1387 Balcazar, J., Blas, I., Ruizzarzuella, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J.
- 1388 (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4),
- 1389 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- 1390 Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M. B., Wasielesky, W., & Poersch, L. H. S.
- 1391 (2012). Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein
- 1392 concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.
- 1393 *Aquaculture*, 342–343(1), 112–116.
- 1394 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.023>
- 1395 Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., & Pearson, D. C.
- 1396 (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp
- 1397 ponds in Belize. *Aquaculture*, 219(1–4), 393–411. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00575-6)
- 1398 [8486\(02\)00575-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00575-6)
- 1399 Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M., & Cheng, W. (2007). Immune
- 1400 responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by
- 1401 *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(2), 364–377.
- 1402 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.010>
- 1403 Chong, W.-W., Lim, C. S.-Y., Lai, K.-S., & Loh, J.-Y. (2019). In vitro antimicrobial
- 1404 assessment on lactic acid bacteria isolated from common freshwater fishes. *Asia*
- 1405 *Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 27(2), 18–25.
- 1406 <https://doi.org/10.35118/apjmbb.2019.027.2.03>
- 1407 Chu, W., Zhou, S., Zhu, W., & Zhuang, X. (2014). Quorum quenching bacteria *Bacillus*
- 1408 sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection.
- 1409 *Scientific Reports*, 4, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep05446>
- 1410 Del’Duca, A., Cesar, D. E., & Abreu, P. C. (2015). Bacterial community of pond’s
- 1411 water, sediment and in the guts of tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles
- 1412 characterized by fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture Research*,
- 1413 46(3), 707–715. <https://doi.org/10.1111/are.12218>
- 1414 Del’Duca, A., Cesar, D. E., Diniz, C. G., & Abreu, P. C. (2013). Evaluation of the
- 1415 presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia
- 1416 (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique.
- 1417 *Aquaculture*, 388–391(1), 115–121.
- 1418 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>
- 1419 Dhanasekaran, D., Saha, S., Thajuddin, N., Rajalakshmi, M., & Panneerselvam, A.
- 1420 (2010). Probiotic Effect Of *Lactobacillus* isolates Against Bacterial Pathogens In
- 1421 Fresh Water Fish. *Journal of Coastal Development*, 13(2), 103–112.
- 1422 Du, Y., Xu, W., Wu, T., Li, H., Hu, X., & Chen, J. (2022). Enhancement of growth,
- 1423 survival, immunity and disease resistance in *Litopenaeus vannamei*, by the
- 1424 probiotic, *Lactobacillus plantarum* Ep-M17. *Fish & Shellfish Immunology*, 129,
- 1425 36–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.08.066>
- 1426 El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O.,
- 1427 Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in
- 1428 aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36–52.
- 1429 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>
- 1430 Esparza-Leal, H. M., Amaral Xavier, J. A., & Wasielesky, W. (2016). Performance of
- 1431 *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks under biofloc
- 1432 conditions at different salinities and zero-water exchange. *Aquaculture*
- 1433 *International*, 24(5), 1435–1447. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0001-5>

- 1434 FAO (Food & Agriculture Organisation). (2022). *The State of World Fisheries and*
 1435 *Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- 1436 Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology*
 1437 *& Medical Microbiology*, 48(2), 149–158. [https://doi.org/10.1111/j.1574-](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x)
 1438 [695X.2006.00116.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x)
- 1439 Ferreira, M. G. P., Melo, F. P., Lima, J. P. V., Andrade, H. A., Severi, W., & Correia, E.
 1440 S. (2017). Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine
 1441 shrimp culture with biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(1),
 1442 167–176. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue1-fulltext-16>
- 1443 Fry, J. P., Love, D. C., MacDonald, G. K., West, P. C., Engstrom, P. M., Nachman, K.
 1444 E., & Lawrence, R. S. (2016). Environmental health impacts of feeding crops to
 1445 farmed fish. *Environment International*, 91, 201–214.
 1446 <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2016.02.022>
- 1447 Furtado, P. S., Fugimura, M. M. S., Monserrat, J. M., Souza, D. M., Garcia, L. de O., &
 1448 Wasielesky, W. (2015). Acute effects of extreme pH and its influences on the
 1449 survival and biochemical biomarkers of juvenile White Shrimp, *Litopenaeus*
 1450 *vannamei*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(6), 417–429.
 1451 <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1086539>
- 1452 Furtado, P. S., Poersch, L. H., & Wasielesky, W. (2011). Effect of calcium hydroxide,
 1453 carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance
 1454 of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems.
 1455 *Aquaculture*, 321(1–2), 130–135.
 1456 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034>
- 1457 Gaona, C. a P., Poersch, L. H., Krummenauer, D., & Foes, G. K. (2011). The Effect of
 1458 Solids Removal on Water Quality , Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei*
 1459 in a Biofloc Technology Culture System. *International Journal of Recirculating*
 1460 *Aquaculture*, 12(June 2011), 54–73.
- 1461 Ghosh, A. K., Bir, J., Azad, M. A. K., Hasanuzzaman, A. F. M., Islam, M. S., & Huq,
 1462 K. A. (2016). Impact of commercial probiotics application on growth and
 1463 production of giant fresh water prawn (*Macrobrachium Rosenbergii* De Man,
 1464 1879). *Aquaculture Reports*, 4, 112–117.
 1465 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.08.001>
- 1466 Hoseinifar, S. H., Sun, Y.-Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as Means of
 1467 Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future
 1468 Perspectives. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>
- 1469 Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D. E., & Wasielesky, W. (2017). Efficacy and
 1470 variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT
 1471 system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture.
 1472 *Aquaculture*, 480, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036>
- 1473 Ikeuchi, T., Ishida, A., Tajifi, M., & Nagata, S. (2003). Induction of salt tolerance in
 1474 *Bacillus subtilis* IFO 3025. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 184–
 1475 186. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90123-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90123-X)
- 1476 Interaminense, J. A., Vogeley, J. L., Gouveia, C. K., Portela, R. S., Oliveira, J. P., Silva,
 1477 S. M. B. C., Raquel, M., Coimbra, M., Peixoto, S. M., Soares, R. B., Buarque, D.
 1478 S., & Bezerra, R. S. (2019). Fish and Shell fish Immunology E ffects of dietary
 1479 *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* in expression pro fi le of immune-related
 1480 genes from hemolymph of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio*
 1481 *parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86(July 2018), 253–259.
 1482 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.051>
- 1483 Jastaniah, S. D., Alaidaroos, B. A., Shafi, M. E., Aljarari, R. M., Abd El-Aziz, Y. M.,

- 1484 Munir, M. B., Eissa, M. E. H., AL-Farga, A., Eissa, E.-S. H., & Said, R. M. (2023).
 1485 Dietary *Pediococcus acidilactici* improved the growth performance, feed
 1486 utilization, gut microbiota, and disease resistance against *Fusarium solani* in
 1487 Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*,
 1488 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01318-x>
- 1489 Jory, D. E., Cabrera, T. R., Dugger, D. M., Fegan, D., Lee, P. G., Lawrence, L.,
 1490 Jackson, C. J., McIntosh, R. P., Castañeda, J., International, B., Park, H. A., Hwy,
 1491 N. O. D., & Pierce, F. (2001). a Global Review of Shrimp Feed Management :
 1492 Status and Perspectives. *Aquaculture*, 104–152.
- 1493 Kesselring, J. C., Gruber, C., Standen, B., & Wein, S. (2019). Continuous and pulse-
 1494 feeding application of multispecies probiotic bacteria in whiteleg shrimp,
 1495 *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(6), 1123–
 1496 1132. <https://doi.org/10.1111/jwas.12640>
- 1497 Keysami, M. A., Mohammadpour, M., & Saad, C. R. (2012). Probiotic activity of
 1498 *Bacillus subtilis* in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de
 1499 Man) at different methods of administration to the feed. *Aquaculture International*,
 1500 20(3), 499–511. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9481-5>
- 1501 Keysami, M. A., Saad, C. R., Sijam, K., Daud, H. M., & Alimon, A. R. (2007). Effect
 1502 of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium*
 1503 *rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 131–136.
 1504 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00463.x>
- 1505 Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G.,
 1506 Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., & Goossens, H. (2007).
 1507 Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus*
 1508 human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of*
 1509 *Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 900–912. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm035>
- 1510 Kongnum, K., & Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum*
 1511 isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp
 1512 (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish*
 1513 *Immunology*, 32(1), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.008>
- 1514 Krummenauer, D., Poersch, L., Romano, L. A., Lara, G. R., Encarnação, P., &
 1515 Wasielesky, W. (2014). The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei*
 1516 Biofloc Culture System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied*
 1517 *Aquaculture*, 26(4), 370–379. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.965575>
- 1518 Kuhn, D. D., Lawrence, A. L., Boardman, G. D., Patnaik, S., Marsh, L., & Flick, G. J.
 1519 (2010). Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of
 1520 fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.
 1521 *Aquaculture*, 303(1–4), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.001>
- 1522 Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2007). Isolation
 1523 and selection of *Bacillus spp.* as potential biological agents for enhancement of
 1524 water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*,
 1525 103(5), 1471–1479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x>
- 1526 Lalumera, G. M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., & Fanelli, R.
 1527 (2004). Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of
 1528 antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, 54(5), 661–668.
 1529 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.08.001>
- 1530 Li, B., Xian, J.-A., Guo, H., Wang, A.-L., Miao, Y.-T., Ye, J.-M., Ye, C.-X., & Liao, S.-
 1531 A. (2014). Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white
 1532 shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 22(2), 761–774.
 1533 <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9704-z>

- 1534 Li, J., Yang, X., Shi, G., Chang, J., Liu, Z., & Zeng, M. (2019). Cooperation of lactic
1535 acid bacteria regulated by the AI-2/LuxS system involve in the biopreservation of
1536 refrigerated shrimp. *Food Research International*, 120, 679–687.
1537 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.025>
- 1538 Lin, Y. C., & Chen, J. C. (2001). Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei*
1539 boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine*
1540 *Biology and Ecology*, 259(1), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0022-](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00227-1)
1541 [0981\(01\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00227-1)
- 1542 Luis-Villasenor, I. E., Campa-Cordova, A. I., & Ascencio-Valle, F. J. (2012). Probiotics
1543 in Larvae and Juvenile Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics*.
1544 <https://doi.org/10.5772/50123>
- 1545 Luis-Villaseñor, I. E., Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J. M., Pacheco-Marges, M. R.,
1546 Herrera-Espericueta, V. E., & Romero-Beltrán, E. (2015). Effects of biofloc
1547 promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in
1548 *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive culture. *Italian*
1549 *Journal of Animal Science*, 14(3), 332–337. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3726>
- 1550 Macias-Sancho, J., Poersch, L. H., Bauer, W., Romano, L. A., Wasielesky, W., &
1551 Tesser, M. B. (2014). Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*)
1552 in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological
1553 parameters. *Aquaculture*, 426–427, 120–125.
1554 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.028>
- 1555 Maicá, P. F., Furtado, P. S., Martins, Á. C. Da S., Filho, K. C. M., & Wasielesky Jr., W.
1556 (2018). Efeito Da Alcalinidade No Consumo Alimentar De Juvenis De Camarão
1557 Branco Do Pacífico Cultivados Em Sistema De Água Clara E Bioflocos. *Boletim*
1558 *Do Instituto de Pesca*, 44(2). <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.222>
- 1559 Martin, G. G., & Graves, B. L. (1985). Fine structure and classification of shrimp
1560 hemocytes. *Journal of Morphology*, 185(3), 339–348.
1561 <https://doi.org/10.1002/jmor.1051850306>
- 1562 Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST
1563 disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in
1564 routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4).
1565 <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
- 1566 Miranda-Baeza, A., Nolasco-López, M., Rivas-Vega, M. E., Huerta-Rábago, J. A.,
1567 Martínez-Córdova, L. R., & Martínez-Porchas, M. (2020). Short-term effect of the
1568 inoculation of probiotics in mature bioflocs: Water quality parameters and
1569 abundance of heterotrophic and ammonia-oxidizing bacteria. *Aquaculture*
1570 *Research*, 51(1), 255–264. <https://doi.org/10.1111/are.14371>
- 1571 Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., Das, P., Paniprasad, K., & Mohanta, K.
1572 N. (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita*
1573 fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive
1574 enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18(1), 1–11.
1575 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00866.x>
- 1576 Moriarty, D. J. W. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds.
1577 *Aquaculture*, 151(1–4), 333–349. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01487-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01487-1)
- 1578 Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture
1579 ponds. *Aquaculture*, 164(1–4), 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
1580 [8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
- 1581 Nagler, K., Setlow, P., Li, Y. Q., & Moeller, R. (2014). High salinity alters the
1582 germination behavior of *Bacillus subtilis* spores with nutrient and nonnutrient
1583 germinants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1314–1321.

- 1584 <https://doi.org/10.1128/AEM.03293-13>
- 1585 NavinChandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S.,
1586 Immanuel, G., & Palavesam, A. (2014). Influence of probiotic bacterium *Bacillus*
1587 *cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent
1588 growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish*
1589 *Immunology*, 36(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.004>
- 1590 Nayak, S. K. (2021). Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in
1591 aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. In *Reviews in Aquaculture*
1592 (Vol. 13, Issue 2, pp. 862–906). John Wiley and Sons Inc.
1593 <https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- 1594 Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2015). Probiotics, immunostimulants, plant products
1595 and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish
1596 diseases. *Journal of Fish Diseases*, 38(11), 937–955.
1597 <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>
- 1598 Patterson, J., & Burkholder, K. (2003). Application of prebiotics and probiotics in
1599 poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627–631.
1600 <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627>
- 1601 Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. (1998). Effects of
1602 a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and
1603 growth. *Aquaculture*, 167(3–4), 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00305-6)
1604 [8486\(98\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00305-6)
- 1605 Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 5(1),
1606 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001>
- 1607 Ringø, E., Olsen, R. E., Jensen, I., Romero, J., & Lauzon, H. L. (2014). Application of
1608 vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges.
1609 *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(4), 1005–1032.
1610 <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9361-y>
- 1611 Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J. L. G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Olsen, R.
1612 E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H. L., Martinsen, L.
1613 L., De Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., & Merrifield, D. L. (2016). Effect of
1614 dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending
1615 story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- 1616 Sabo, S. da S., Lopes, A. M., Santos-Ebinuma, V. de C., Rangel-Yagui, C. de O., &
1617 Oliveira, R. P. de S. (2018). Bacteriocin partitioning from a clarified fermentation
1618 broth of *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in aqueous two-phase systems with
1619 sodium sulfate and choline-based salts as additives. *Process Biochemistry*,
1620 66(November), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.018>
- 1621 Sadat Hoseini Madani, N., Adorian, T. J., Ghafari Farsani, H., & Hoseinifar, S. H.
1622 (2018). The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus*
1623 *licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and
1624 immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae.
1625 *Aquaculture Research*, 49(5), 1926–1933. <https://doi.org/10.1111/are.13648>
- 1626 Sahoo, T. K., Jena, P. K., Patel, A. K., & Seshadri, S. (2016). Bacteriocins and their
1627 applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review.
1628 *Aquaculture Research*, 47(4), 1013–1027. <https://doi.org/10.1111/are.12556>
- 1629 Salimi, L., Jamily, S., Motalebi, A., Eghtesadi-Araghi, P., Rabbani, M., & Rostami-
1630 Beshman, M. (2009). Morphological characterization and size of hemocytes in
1631 *Anodonta cygnea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 81–85.
1632 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.003>
- 1633 Sam-on, M. F. S., Mustafa, S., Yusof, M. T., Mohd Hashim, A., Abbasiliasi, S.,

- 1634 Zulkifly, S., Jahari, M. A., & Roslan, M. A. H. (2022). Evaluation of three *Bacillus*
1635 spp. isolated from the gut of giant freshwater prawn as potential probiotics against
1636 pathogens causing Vibriosis and Aeromonosis. *Microbial Pathogenesis*, 164,
1637 105417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105417>
- 1638 Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. de S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi,
1639 C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential
1640 of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- 1641 Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater
1642 Analysis. *Bulletin Fisheries Research Board of Canada*, 167(2nd edition).
1643 <https://doi.org/10.25607/OBP-1791>
- 1644 Sumon, T. A., Hussain, M. A., Sumon, M. A. A., Jang, W. J., Abellan, F. G.,
1645 Sharifuzzaman, S. M., Brown, C. L., Lee, E.-W., Kim, C.-H., & Hasan, M. T.
1646 (2022). Functionality and prophylactic role of probiotics in shellfish aquaculture.
1647 *Aquaculture Reports*, 25, 101220. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101220>
- 1648 Tank, P. R., Vadher, K. H., & Patel, M. P. (2018). Effect of Salinity on Growth
1649 Performance of Probiotics for Its Potential Use in Shrimp Aquaculture. *J. Exp.*
1650 *Zool. India*, 21(2), 1111–1113.
- 1651 Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C.
1652 (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics—A comparison of
1653 functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3),
1654 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012>
- 1655 UNESCO. (1983). Chemical methods for use in marine environmental monitoring. In
1656 *Manual and Guides 12*.
- 1657 Van Hai, N., & Fotedar, R. (2010). A review of probiotics in shrimp aquaculture. In
1658 *Journal of Applied Aquaculture* (Vol. 22, Issue 3, pp. 251–266).
1659 <https://doi.org/10.1080/10454438.2010.500597>
- 1660 Verschuere, L.G.Rombaut, P.Sorgeloos, and W. V. (2000). *Probiotic Bacteria as*
1661 *Biological Control Agents in Aquaculture*. 64(4), 655–671.
- 1662 Vieira, F., Jatobá, A., Mouriño, J. L. P., Vieira, E. A., Soares, M., Silva, B. C. da,
1663 Seiffert, W. Q., Martins, M. L., & Vinatea, L. A. (2013). In vitro selection of
1664 bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesquisa*
1665 *Agropecuária Brasileira*, 48(8), 998–1004. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800027>
- 1667 Vieira, N., Carlos, C., Neto, B., Luiz, J., Mouriño, P., & Jatobá, A. (2008). Time-related
1668 action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive
1669 tract and its action as immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(6),
1670 763–769.
- 1671 Wang, Y.-C., Lin, H.-Y., & Chang, P.-S. (2023). Evaluation of probiotic potentiality of
1672 GM-Lac (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*) in juvenile Asian seabass *Lates*
1673 *calcarifer*. *Aquaculture Reports*, 30, 101615.
1674 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101615>
- 1675 Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., & Browdy, C. L. (2006). Effect of natural
1676 production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive
1677 culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1–4),
1678 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- 1679 Wei, Y., Shen, D., Lukwambe, B., Wang, Y., Yang, W., Zhu, J., Nicholas, R., &
1680 Zheng, Z. (2022). The exogenous compound bacteria alter microbial community
1681 and nutrients removal performance in the biofilm unit of the integrated aquaculture
1682 wastewater bioremediation systems. *Aquaculture Reports*, 27(October), 101414.
1683 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101414>

1684 Wu, Y.-S., Chu, Y.-T., Chen, Y.-Y., Chang, C.-S., Lee, B.-H., & Nan, F.-H. (2022).
1685 Effects of dietary *Lactobacillus reuteri* and *Pediococcus acidilactici* on the
1686 cultured water qualities, the growth and non-specific immune responses of
1687 *Penaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 127, 176–186.
1688 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.004>

1689 Wyk, P. Van, & Scarpa, J. (1999). Water quality requirements and management. In:
1690 Van Wyk, P.M., Hodgkins, M.D., Laramore, C.R., Main, K.L., Mountain, J.,
1691 Scarpa, J. (Eds.). *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*,
1692 *Florida*, 141–162.

1693 Zar, J. H. (1999). Biostatistical analysis. *Pearson Education India*.

1694 Zemor, J. C., Wasielesky, W., Fóes, G. K., & Poersch, L. H. (2019). The use of
1695 clarifiers to remove and control the total suspended solids in large-scale ponds for
1696 production of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc system. *Aquacultural*
1697 *Engineering*, 85(March), 74–79.
1698 <https://doi.org/10.1016/J.AQUAENG.2019.03.001>

1699 Zheng, Q., Wang, Y., Chen, J., Li, Y., Zhao, F., Liu, D., Wei, M., Kong, D., Chen, Z.,
1700 Zhang, Z., & Ma, Y. (2022). Effects of Salinity on the Growth, Physiological
1701 Characteristics, and Intestinal Microbiota of the Echiura Worm (*Urechis*
1702 *unicinctus*). *Frontiers in Marine Science*, 9(July), 1–16.
1703 <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.912023>
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721

1722 **CAPÍTULO II: UTILIZAÇÃO DE MIX PROBIÓTICO E MANEJO DE**
1723 **APLICAÇÃO NO CULTIVO SUPERINTENSIVO DO CAMARÃO BRANCO DO**
1724 **PACÍFICO *Penaeus vannamei* NA FASE DE BERÇÁRIO**

1725 Artigo publicado na revista *Journal of Aquaculture, Marine Biology & Ecology*

1726 **Resumo**

1727 Este estudo investigou a eficácia do uso do mix probiótico (composto por
1728 multiespécies *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) em
1729 berçário de camarões marinhos em sistemas de bioflocos e diferentes vias de aplicação e
1730 sua relação com a comunidade microbiana, qualidade da água e desempenho zootécnico.
1731 A técnica de FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) foi utilizada para análise da
1732 abundância bacteriana presente na água de cultivo e no intestino dos camarões, assim
1733 como a análise dos microrganismos presentes no sistema. Os tratamentos eram divididos
1734 em dois sistemas, água clara (AC) e bioflocos (BFT), onde os probióticos eram
1735 adicionados somente na ração (PR), somente na água (PA) e em duas vias de aplicação,
1736 sendo ração e água (PRA). O berçário teve duração de 35 dias, com densidade de
1737 estocagem de 2000 cam/m². Não foram encontradas diferenças significativas para dados
1738 de qualidade da água ($p>0,05$). A diversidade e abundância de microrganismos foi
1739 superior nos tratamentos com bioflocos e duas vias de aplicação dos probióticos, assim
1740 como a abundância bacteriana na água e no intestino dos camarões. A colonização do
1741 intestino dos camarões foi evidenciada no presente estudo pela presença das bactérias
1742 probióticas hibridizadas, quantificadas e classificadas, onde apresentaram relação direta
1743 com a água de cultivo. O desempenho zootécnico foi significativamente ($p<0,05$) melhor
1744 no tratamento com adição de probióticos na ração e na água em sistema de bioflocos
1745 (BFT-PRA), onde todos os índices foram superiores aos demais tratamentos.
1746 Sobrevivências foram superiores a 89%, com exceção do tratamento controle (79%).
1747 Demais tratamentos com pelo menos uma via de aplicação mostrou desempenho
1748 zootécnico satisfatório em relação ao controle, incluindo o sistema de água clara que se
1749 aproximou do sistema de bioflocos sem adição de probióticos (BFT-CTL). A utilização
1750 do mix probiótico foi eficiente e apresentou efeito positivo na produção de *Penaeus*
1751 *vannamei* na fase de berçário.

1752 **Abstract**

1753 This study investigated the efficacy of using a probiotic mix (composed of multi-
1754 species *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*) in
1755 marine shrimp nursery in biofloc system and different application ways and its
1756 relationship with the microbial community, water quality and zootechnical performance.
1757 The FISH (fluorescent *in situ* hybridization) technique was used to analyze the bacterial
1758 abundance present in the water and in the gut of the shrimps, as well as the analysis of
1759 the microorganisms present in the system. The treatments were divided into two systems,
1760 clear water (CW) and biofloc (BFT), where the probiotics were added only to the feed
1761 (PF), only to the water (PW) and both feed and water (PFW). The nursery lasted 35 days,
1762 with a stocking density of 2000 shrimps/m². No significant differences were found for
1763 water quality data ($p>0.05$), The diversity and abundance of microorganisms was higher
1764 in the treatments with biofloc and two routes of probiotic application, as was the bacterial
1765 abundance in the water and in the shrimp intestines. The colonization of the shrimp gut
1766 was evidenced in this study by the presence of hybridized, quantified, and classified
1767 probiotic bacteria, which were directly related to the rearing water. Zootechnical
1768 performance data were significantly ($p<0.05$) better in the treatment with the addition of
1769 probiotics in the feed and water in the biofloc system (BFT-PFW), where all the indices
1770 were higher than the other treatments. Survival rates were over 89%, except for the
1771 control treatment (79%). Other treatments with at least one way of application showed
1772 satisfactory zootechnical performance compared to the control, including the clear water
1773 system which came close to the biofloc system without the addition of probiotics (BFT-
1774 CTL). The use of the probiotic mix was efficient and showed a positive effect on the
1775 culture of *Penaeus vannamei* in the nursery phase.

1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784

1785 **Introdução**

1786 A intensificação dos sistemas de cultivo em aquicultura proporciona maiores
1787 produções em menor área e maior lucratividade, no entanto sistemas superintensivos
1788 exigem controle regular e preciso da qualidade de água e do ambiente de produção (El-
1789 Saadony, Shehata, Alagawany, A.-M. E. Abdel-Moneim, et al. 2022). A fase de berçário
1790 é considerada uma ferramenta de manejo entre as fases larvais iniciais e a fase de engorda
1791 final, essa intensificação proporcionada pelos berçários pode resultar em um rápido
1792 crescimento e permitir altas densidades de estocagem desde que o manejo apropriado seja
1793 realizado durante esta fase (Emerenciano et al. 2022; Wasielesky et al. 2013). O
1794 surgimento de patógenos e doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e parasitas,
1795 geram grandes problemas para a indústria e são relacionados ao aumento da intensificação
1796 da produção (Gatesoupe 2016).

1797 A comunidade microbiana desempenha papel essencial na aquicultura,
1798 influenciando a produtividade, a ciclagem de nutrientes, a alimentação dos animais
1799 cultivados, a qualidade da água, o controle de doenças e o impacto ambiental dos
1800 efluentes (Defoirdt, Sorgeloos, and Bossier 2011; Luis-Villaseñor et al. 2015; Moriarty
1801 1997). Sistemas de produção em meio os bioflocos são compostos por diversos grupos de
1802 microrganismos, principalmente bactérias, restos de ração, detritos dos animais
1803 cultivados, partículas orgânicas e inorgânicas, são considerados eficientes no controle e
1804 equilíbrio da comunidade microbiana (Emerenciano et al. 2017). Sua composição é
1805 influenciada por diversos fatores como o sistema de produção adotado, espécie-alvo,
1806 formulação da ração, condições ambientais, físicas e químicas (Ray et al. 2010; De
1807 Schryver et al. 2008).

1808 Os microrganismos são eficazes no controle de patógenos, pois competem com
1809 potenciais organismos patogênicos, possuem propriedades probióticas, promovendo o
1810 crescimento, digestão, metabolismo e resistência a doenças aos organismos aquáticos
1811 (Cienfuegos-Martínez et al. 2020; Hostins et al. 2019; Khanjani, Shari, and Emerenciano
1812 2024; Pandiyan et al. 2013). As bactérias compõem os bioflocos em sua maior abundância
1813 relativa, são capazes de transformar matéria orgânica, remover compostos nitrogenados,
1814 servem como fonte de alimento dentro da cadeia trófica alimentar (Del’Duca, Cesar, and
1815 Abreu 2015; Lara, Poersch, and Wasielesky 2021; Wasielesky et al. 2006).

1816 Dentro da diversidade da composição dos microrganismos presentes no sistema
1817 de produção de camarões marinhos em sistemas de bioflocos, os probióticos são

1818 evidenciados como uma ferramenta de manejo de fundamental e indispensável
1819 importância, pois são capazes de competir contra bactérias patogênicas, são capazes de
1820 colonizar o trato dos camarões e melhoram sistema imune dos animais (Hostins et al.
1821 2017; Krummenauer et al. 2011; Llario et al. 2019; Widanarni et al. 2010). As bactérias
1822 probióticas podem ser adicionadas aos sistemas de produção ou podem estar presentes
1823 em meio aos próprios bioflocos. Seus mecanismos de ação são diversos e cruciais para
1824 desenvolvimento de uma microbiota abundante e capaz de competir com possíveis
1825 outbreaks de doenças (Algburi et al. 2016; El-Sayed 2021; Miranda-Baeza et al. 2020).

1826 O manejo de aplicação dos probióticos podem ser variados e acompanham as
1827 necessidades de cada sistema de produção e espécie-alvo, os probióticos podem ser
1828 administrados diretamente na água, adicionados a ração, usando óleos ou substâncias
1829 aglutinantes, banhos de imersão dos animais e aplicando no solo ou sedimento, onde cada
1830 método tem suas vantagens e desvantagens, como armazenamento, manuseio e aplicação
1831 em grandes volumes (Hancz 2022; Kumar et al. 2016; Das Susmita and Haque 2017). O
1832 uso de probióticos com diferentes composições bacterianas é amplamente discutido e
1833 testado em diversos estudos atualmente, são chamados de mix probiótico, probiótico
1834 multi-espécies ou multi-cepas (Timmerman et al. 2004; Zan et al. 2023).

1835 A grande maioria dos produtos comerciais são compostos por bactérias do gênero
1836 *Bacillus* e suas espécies mais utilizadas são *B. subtilis* e *B. licheniformis*, sendo
1837 considerado o gênero mais estudado e utilizado comercialmente no mundo inteiro
1838 (Farzanfar 2006; Keysami and Mohammadpour 2013). As bactérias ácido lácticas, como
1839 *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*, são utilizadas em conjunto com
1840 bacilos e apresentam efeitos benéficos sinérgicos no crescimento dos animais, nutrição,
1841 sistema imune, antagonismo a doenças, colonização do trato do hospedeiro e estimulam
1842 respostas imunes a condições de estresse (Aly et al. 2008; Giang et al. 2019; Giri et al.
1843 2014; Guimarães et al. 2022; Hendam et al. 2023; Jastaniah et al. 2023; Kongnum and
1844 Hongpattarakere 2012; Won et al. 2020).

1845 O monitoramento da comunidade microbiana em sistemas superintensivos deve
1846 ser efetuado com periodicidade e agilidade, pois a resposta para surgimento de eventos
1847 negativos, como surgimento de patógenos, deve ser tomada de maneira rápida e eficiente
1848 (Cardona et al. 2016; Panigrahi et al. 2020). Técnicas de biologia molecular livres de
1849 cultivos bacterianos prévios são capazes de fornecer respostas rápidas e independentes,
1850 sendo assim, a técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH) torna-se uma
1851 ferramenta direta na identificação das espécies presentes nos sistemas de produção,

1852 utilizando as sondas específicas para cada bactéria alvo a ser identificada (Cottrell and
1853 Kirchman 2003; Glöckner et al. 1996). O uso de probióticos e sua efetividade foram
1854 confirmados por diversos estudos usando esta técnica de biologia molecular em sistemas
1855 super-intesivos com bioflocos (Del’Duca et al. 2013; Hostins et al. 2017).

1856 A microbiota presente no intestino dos camarões marinhos desempenha
1857 fundamental importância para sua imunidade, resistência a doenças e aumento da
1858 produção e esta relacionada diretamente com a água do meio de cultivo (Holt et al. 2021;
1859 Verschuere et al. 2000). Um ambiente de cultivo estável com condições favoráveis de
1860 qualidade da água, as bactérias probióticas provavelmente dominam sobre outros grupos,
1861 reduzindo a carga patogênica na água e nos intestinos das espécies aquáticas cultivadas
1862 em sistema de bioflocos (Cienfuegos-Martínez et al. 2022). Diversas habilidades são
1863 relacionadas as bactérias probióticas, onde atuam diretamente na modulação bacteriana,
1864 ocupam sítios de ligação e competem com bactérias nocivas, produção de enzimas
1865 digestivas, produção de enzimas antagonistas (bacteriocinas), são capazes de sobreviver
1866 e se multiplicar nas condições adversas do intestino dos animais, modular e ajustar a
1867 microbiota do hospedeiro (El-Saadony, Shehata, Alagawany, A. M. E. Abdel-Moneim,
1868 et al. 2022; Nayak 2021; Ninawe and Selvin 2009; Wee et al. 2024). O avanço
1869 biotecnológico deve acompanhar a demanda de informações necessárias, considerando
1870 que ainda existem lacunas substanciais na literatura a serem preenchidas e respondidas
1871 sobre a caracterização microbiana intestinal (Bentzon-Tilia, Sonnenschein, and Gram
1872 2016; Huang et al. 2020).

1873

1874

1875

1876

1877

1878

1879

1880

1881

1882

1883 **Objetivo Geral**

1884 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do uso de mix probiótico comercial e
1885 diferentes vias de aplicação em diferentes sistemas na fase de berçário em sistema
1886 superintensivo, avaliando qualidade da água, desempenho zootécnico, microrganismos,
1887 comunidade bacteriana e colonização do intestino dos camarões.

1888 **Objetivos Específicos**

- 1889 • Avaliar as diferentes vias de aplicação do mix probiótico na qualidade da água e
1890 no desempenho zootécnico dos camarões na fase de berçário.
- 1891 • Identificar e quantificar a composição da comunidade microbiana dos bioflocos e
1892 as bactérias probióticas presentes na água e intestino dos camarões.

1893

1894

1895 **Material e Métodos**

1896 *Condições experimentais*

1897 O estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura, do Instituto de
1898 Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, Brasil (32°110S;
1899 52°100W). Camarões da espécie *Penaeus vannamei*, provenientes da Aquatec® (Rio
1900 Grande do Norte), foram obtidos em estágio de náuplio e passaram pela fase da
1901 larvicultura no Laboratório de Carcinocultura – IO -FURG. Após esse período, pós-larvas
1902 com peso médio de 0,012g ($\pm 0,001$) foram estocadas nas unidades experimentais em uma
1903 densidade de estocagem de 2000 camarões m⁻². O experimento foi realizado em uma sala
1904 experimental com controle de temperatura e fotoperíodo. O estudo teve a duração de 35
1905 dias. Para controle de temperatura foram utilizados aquecedores de água submersos com
1906 termostatos (Stealth, ETP250, USA, 250W). O controle de luminosidade foi feito com
1907 temporizador analógico de luz, mantendo em 12 horas de escuro e 12h de claridade. O
1908 sistema de aeração era composto por soprador tipo *blower*, onde o oxigênio atmosférico
1909 era distribuído em cada unidade experimental através de duas mangueiras
1910 microperfuradas (Aerotubes®) de 30 cm.

1911

1912 *Sistema em água clara (AC) e Sistema de Bioflocos (BFT)*

1913 Os tanques possuíam área de fundo de 0,49 m², com volume útil de 150 litros,
1914 foram preenchidos com água salgada (salinidade 30). Para desinfecção inicial da água,
1915 aplicou-se uma solução de hipoclorito de sódio (10ppm) e posterior aplicação de ácido
1916 ascórbico (1ppm) para neutralização. O estudo foi realizado em dois sistemas diferentes,
1917 em sistema de água clara (AC) e sistema de bioflocos (BFT), ambos com doze (12)
1918 tanques em cada sistema. Para manter a qualidade da água no sistema de água clara,
1919 renovações de água de 50% do volume (75 litros) foram realizadas a cada três dias ou de
1920 acordo com as concentrações de amônia e nitrito, durante todo período experimental.

1921 Para os tanques com sistema de bioflocos foi inoculado 10% do seu volume com
1922 um inóculo de água de bioflocos maduro (amônia e nitrito com valores próximos a zero,
1923 nitrato 30mg/L, fosfato 1,10 mg/L e sólidos suspensos totais 460mg/L) (Krummenauer et
1924 al. 2014). De acordo com as concentrações de amônia foram realizadas fertilizações
1925 orgânicas com melão de cana-de-açúcar para manutenção da relação C:N da água
1926 (Avnimelech 1999; Ebeling, Timmons, and Bisogni 2006). Para reposição do volume por
1927 evaporação foram feitas adições de água doce declorada. Para manutenção dos valores de
1928 pH e alcalinidade no sistema de bioflocos foram adicionadas doses de cal hidratada de
1929 acordo com decaimento dos valores de pH e alcalinidade (Furtado, Poersch, and
1930 Wasielesky 2011).

1931 *Delineamento experimental*

1932 O experimento foi realizado em triplicata, foram utilizados vinte e quatro (24)
1933 tanques, sendo três tanques para cada tratamento. Os tratamentos foram distribuídos da
1934 seguinte maneira:

- 1935 • Sistema água clara (AC):
- 1936 ○ AC-CTL (sem adição de probióticos)
 - 1937 ○ AC-PR (adição de probióticos somente na ração)
 - 1938 ○ AC-PA (adição de probióticos somente na água)
 - 1939 ○ AC-PRA (adição de probióticos na ração e na água)
- 1940 • Sistema de bioflocos (BFT):
- 1941 ○ BFT-CTL (sem adição de probióticos)
 - 1942 ○ BFT-PR (adição de probióticos somente na ração)

- 1943 ○ BFT-PA (adição de probióticos somente na água)
1944 ○ BFT-PRA (adição de probióticos na ração e na água)

1945 *Aplicação dos probióticos e alimentação*

1946 O mix probiótico comercial utilizado nesse estudo é composto pelas seguintes
1947 bactérias e suas respectivas concentrações: *Bacillus subtilis* ($3,4 \times 10^9$ UFC g⁻¹),
1948 *Lactobacillus plantarum* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹) e *Pediococcus acidilactici* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹).
1949 Foram aplicadas as dosagens recomendadas pelo fabricante, diariamente na ração (2g
1950 de probiótico/kg de ração) e na água foram utilizadas doses diárias de 1g/tonelada de
1951 água. Os probióticos foram misturados com água proveniente de cada unidade
1952 experimental, para serem aspergidas à ração e pipetados na água de cultivo, 5 dias da
1953 semana. Os camarões foram alimentados três vezes ao dia (08:00, 14:00 e 17:00h), onde
1954 a primeira alimentação recebia a adição probiótica nos respectivos tratamentos, utilizando
1955 ração comercial PL 40% PB (Guabi®) para fase de berçário (Jory et al. 2001; Wasielesky
1956 et al. 2020).

1957 *Qualidade da água*

1958 Os parâmetros como temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados
1959 duas vezes ao dia (08:00 e 17:00h) utilizando um aparelho multiparâmetro da marca YSI®
1960 modelo 556. A salinidade foi verificada semanalmente com o auxílio de um refratômetro
1961 óptico (ATC, RTP-20ATC, Brasil). Os níveis da amônia total (N-AT) e nitrito (N-NO₂-)
1962 foram analisados três vezes na semana (Strickland and Parsons 1972; UNESCO 1983).
1963 Nitrato (N-NO₃-), ortofosfato (P-PO₄-₃) (Aminot and Chaussepied 1983) e alcalinidade
1964 (AOAC 2005) foram mensurados semanalmente. Sólidos suspensos totais (SST) foram
1965 medidos semanalmente (Strickland and Parsons 1972).

1966 *Desempenho Zootécnico*

1967 O crescimento dos camarões em todas as unidades experimentais foi
1968 acompanhado por meio de biometrias semanais, utilizando balança digital com precisão
1969 de 0,001g. Ao final do experimento, foram avaliados os seguintes parâmetros: taxa de
1970 crescimento específico [$\ln Pf - \ln Pi$] × 100/dias), onde Pf é o peso final, Pi é o peso inicial
1971 e dias de cultivo. Conversão alimentar aparente (C.A.A.): alimento oferecido/incremento
1972 de biomassa. Sobrevivência: ((n° indivíduos despescados / n° indivíduos estocados) × 100).
1973 Biomassa final: (peso médio final × n° indivíduos despescados). Produtividade: (biomassa
1974 final / volume unidade experimental).

1975 *Avaliação da comunidade microbiana*

1976 Para a quantificação dos microrganismos presentes na água de cultivo, amostras
1977 de água (20 mL) foram coletadas ao final do período experimental. As amostras foram
1978 fixadas em formalina a 4% (concentração final) e mantidas em frascos âmbar para
1979 posterior contagem e identificação dos principais grupos de microrganismos presentes.
1980 Os microrganismos foram classificados em diferentes grupos: flagelados, ciliados,
1981 rotíferos, nematoides e microalgas, foi usado um microscópio invertido Olympus IX51
1982 com ampliação final de 200x, no qual alíquotas de 2,1 mL de amostra foram colocadas
1983 em uma câmara de sedimentação e 30 campos foram contados aleatoriamente (Utermöhl
1984 1958). As contagens foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Microrganismos
1985 Aplicados à Aquicultura (LEMAQUI) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

1986 *Análise de Hibridização in situ Fluorescente (FISH)*

1987 Foram coletadas amostras finais de água de cada unidade experimental e coletados
1988 intestinos dos camarões, ambos fixados em paraformaldeído a 2% (concentração final) e
1989 estocadas sob refrigeração para posterior realização da análise de hibridização
1990 fluorescente *in situ* (FISH) para identificação de bactérias dos gêneros presentes no mix
1991 probiótico (Tabela 1). Previamente ao início do protocolo de FISH (Cottrell and
1992 Kirchman 2003; Del'Duca et al. 2013) as amostras de intestino que foram pesadas
1993 previamente e sonificadas (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics Materials®) com amplitude
1994 de 110.7 µm por 60s (três vezes). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a
1995 500 g por cinco minutos e o sobrenadante retirado, repetindo esta etapa duas vezes com
1996 adição de água ultrapura para lavagem do conteúdo. As três porções de sobrenadante
1997 foram colocadas em um mesmo frasco, novamente centrifugadas e só então filtradas em
1998 filtros brancos de policarbonato (Nuclepore® 0,2 µm) e mantidas refrigeradas a 4° C até
1999 a realização do protocolo de hibridização. As amostras de água foram filtradas
2000 diretamente em filtros brancos de policarbonato (Nuclepore® 0,2 µm).

2001 Posteriormente as amostras foram avaliadas através de microscopia de
2002 epifluorescência, utilizando sondas de oligonucleotídeos dirigidos ao rRNA para
2003 identificar e quantificar os grupos das bactérias alvo do estudo (tabela 1). Todas as sondas
2004 foram marcadas com fluorocromo Cy3. Sondas do mesmo grupo de bactérias foram
2005 misturadas para a hibridização. Adicionado a cada sonda específica foi usado DAPI, para
2006 determinação da abundância bacteriana total. Um controle negativo (NON) foi utilizado

2007 com uma sonda sem nenhum marcador específico para bactérias, servindo como um teste
 2008 de eficiência do processo de hibridização. A abundância de bactérias foi obtida pela
 2009 contagem direta com aumento de 1000x utilizando um microscópio de epifluorescência
 2010 (Olympus® BX-60), equipado com os filtros: Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2
 2011 e U-MWG2, no Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos
 2012 (LEBIOMM) da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

2013 **Tabela 2** Sondas de oligonucleotídeos para identificação de diferentes grupos
 2014 bacterianos usados neste estudo. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo
 2015 Cy3.

Sonda	Especificidade	Sequência (5'-3')	%FA*	Referência
NON	Controle negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	(Yokokawa and Nagata 2005)
Bacil1	<i>Bacillus</i>	GCCGCCTTTCAATTTTCGAAC	35	(Ichijo et al. 2010)
Bmy843	<i>Bacillus</i>	CTTCAGCACTCAGGTTTCG	35	(Salzman et al. 2002)
Bsub	<i>B. subtilis</i>	CGTTCAAACAACCATCCGG	35	(Kyselková et al. 2009)
BsubC	<i>B. subtilis</i> grupo	AAGCCACCTTTTATGTTTGA	35	(Kyselková et al. 2009)
Lacto15	<i>Lactobacillus</i>	CCGTCAACCCTTGAACAGTT	30	(Demanèche et al. 2008)
Lacto39	<i>Lactobacillus</i>	TCTGTTTAGTTCCGCTCGTTC	30	(Demanèche et al. 2008)
LGC354A	Firmicutes	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier et al. 1999)
LGC354B	Firmicutes	CGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier et al. 1999)
LGC354C	Firmicutes	CCGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier et al. 1999)

2016 *Porcentagem de formamida (FA) na solução de hibridização *in situ*.

2017 *Análise Estatística*

2018 Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via, levando em
 2019 consideração os pressupostos de homocedasticidade e normalidade através dos testes
 2020 Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. O teste de Tukey foi aplicado quando
 2021 diferenças significativas foram detectadas ($p < 0,05$), os dados de sobrevivência,
 2022 microrganismos e abundância bacteriana foram transformados (arco seno da raiz
 2023 quadrada) antes da análise (Zar 1999).

2024 **Resultados**

2025 *Qualidade da água*

2026 Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos
 2027 para temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido (mg/l) e salinidade. No entanto, para dados de
 2028 pH, alcalinidade, amônia, nitrito, nitrato, fosfato e sólidos suspensos totais foram
 2029 encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, todos resultados de
 2030 qualidade de água são apresentados na tabela 2.

2031

2032 **Tabela 3** – Média (\pm desvio padrão) dos valores médios encontrados para parâmetros
 2033 físico e químicos da qualidade da água monitorados durante 35 dias de berçário de *P.*
 2034 *vannamei* em sistema superintensivo em água clara e sistema de bioflocos nos
 2035 diferentes tratamentos.

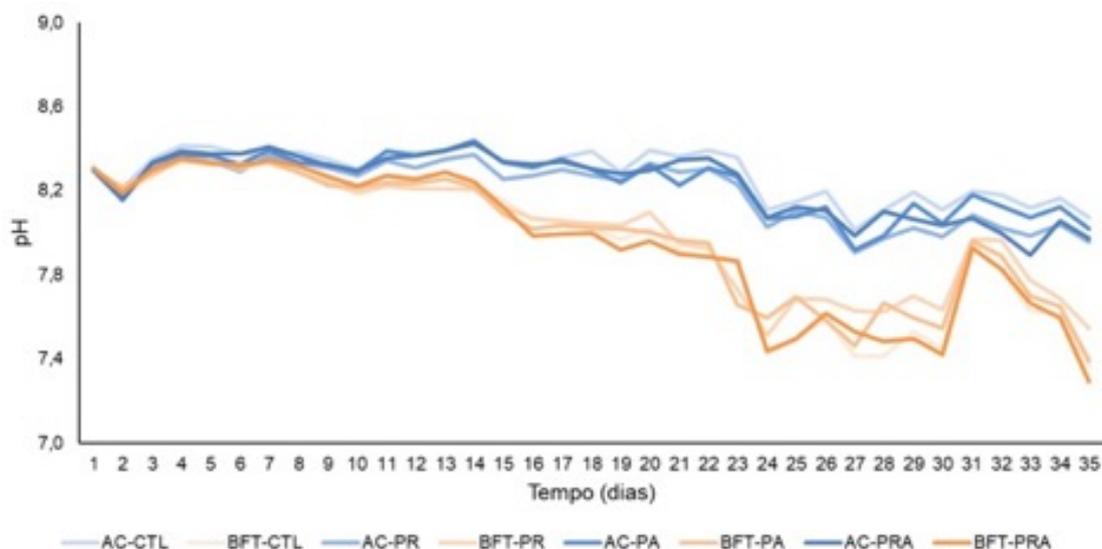
	AC-CTL	BFT-CTL	AC-PR	BFT-PR	AC-PA	BFT-PA	AC-PRA	BFT-PRA
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	28,44 $\pm 0,76$	28,74 $\pm 0,69$	28,61 $\pm 0,51$	28,87 $\pm 0,78$	28,64 $\pm 0,29$	28,86 $\pm 0,54$	28,58 $\pm 0,62$	28,84 $\pm 0,72$
O ₂ D (mg L^{-1})	5,94 $\pm 0,20$	5,80 $\pm 0,20$	5,91 $\pm 0,24$	5,79 $\pm 0,23$	5,98 $\pm 0,18$	5,77 $\pm 0,20$	5,87 $\pm 0,22$	5,79 $\pm 0,22$
pH	8,28 $\pm 0,03^a$	7,96 $\pm 0,05^b$	8,20 $\pm 0,03^a$	8,00 $\pm 0,06^b$	8,24 $\pm 0,03^a$	7,98 $\pm 0,05^b$	8,23 $\pm 0,04^a$	7,95 $\pm 0,03^b$
Alcalinidade ($\text{mgCaCO}_3\text{L}^{-1}$)	207,33 $\pm 8,66^a$	153,33 $\pm 8,60^b$	205,00 $\pm 17,29^a$	159,67 $\pm 18,27^b$	207,00 $\pm 5,21^a$	159,00 $\pm 7,15^b$	202,00 $\pm 13,34^a$	155,67 $\pm 7,83^b$
Amônia (N-AT mg L^{-1})	1,47 $\pm 0,30^a$	0,11 $\pm 0,06^b$	1,18 $\pm 0,29^a$	0,11 $\pm 0,05^b$	1,50 $\pm 0,30^a$	0,13 $\pm 0,06^b$	1,51 $\pm 0,38^a$	0,11 $\pm 0,04^b$
Nitrito (N-NO ₂ - mg L^{-1})	0,93 $\pm 0,27^{ab}$	0,30 $\pm 0,09^c$	1,26 $\pm 0,43^a$	0,28 $\pm 0,04^c$	1,03 $\pm 0,16^{ab}$	0,34 $\pm 0,08^c$	1,33 $\pm 0,28^a$	0,38 $\pm 0,11^{bc}$
Nitrato (N-NO ₃ - mg L^{-1})	0,94 $\pm 0,54^b$	26,73 $\pm 2,34^a$	1,47 $\pm 0,23^b$	23,25 $\pm 2,67^a$	1,01 $\pm 0,23^b$	25,28 $\pm 2,29^a$	1,14 $\pm 0,23^b$	26,45 $\pm 2,12^a$
Fosfato (P-PO ₄ ⁻³ mg L^{-1})	0,07 $\pm 0,02^b$	0,35 $\pm 0,03^a$	0,07 $\pm 0,02^b$	0,30 $\pm 0,09^a$	0,08 $\pm 0,04^b$	0,32 $\pm 0,06^a$	0,10 $\pm 0,01^b$	0,31 $\pm 0,09^a$
Salinidade (ppt)	31,06 $\pm 1,53$	32,78 $\pm 2,10$	30,67 $\pm 1,29$	32,67 $\pm 1,71$	30,50 $\pm 1,19$	32,67 $\pm 1,29$	30,83 $\pm 2,29$	32,94 $\pm 1,55$
SST (mg L^{-1})	86,40 $\pm 23,56^b$	352,53 $\pm 22,92^a$	129,40 $\pm 32,78^{ab}$	363,67 $\pm 25,69^a$	85,07 $\pm 20,27^b$	363,53 $\pm 23,47^a$	103,40 $\pm 37,82^{ab}$	388,33 $\pm 35,38^a$

2036 Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao
 2037 longo do período experimental após ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

2038 Os valores encontrados para temperatura foram em média de $28,5^{\circ}\text{C}$, sem
 2039 variações ao longo do período experimental, o mesmo ocorreu com as concentrações de
 2040 oxigênio dissolvido que se mantiveram em concentrações médias acima de $5,7 \text{ mg/l}$ entre
 2041 todos os tratamentos. Valores de salinidade mantidos entre 30 e 32, sem diferença entre
 2042 os tratamentos.

2043 Os valores de pH sofreram variações de acordo com os sistemas, em água clara
 2044 mantiveram as médias acima de 8,2 e no sistema de bioflocos os valores encontrados não

2045 foram inferiores a 7,95 (Figura 1). O mesmo comportamento foi observado para
2046 alcalinidade, mantendo os valores médios acima de 200 mg CaCO₃/L em água clara, nos
2047 tratamentos com sistema de bioflocos mantiveram-se acima de 150 mg CaCO₃/L (Figura
2048 3c).
2049



2050

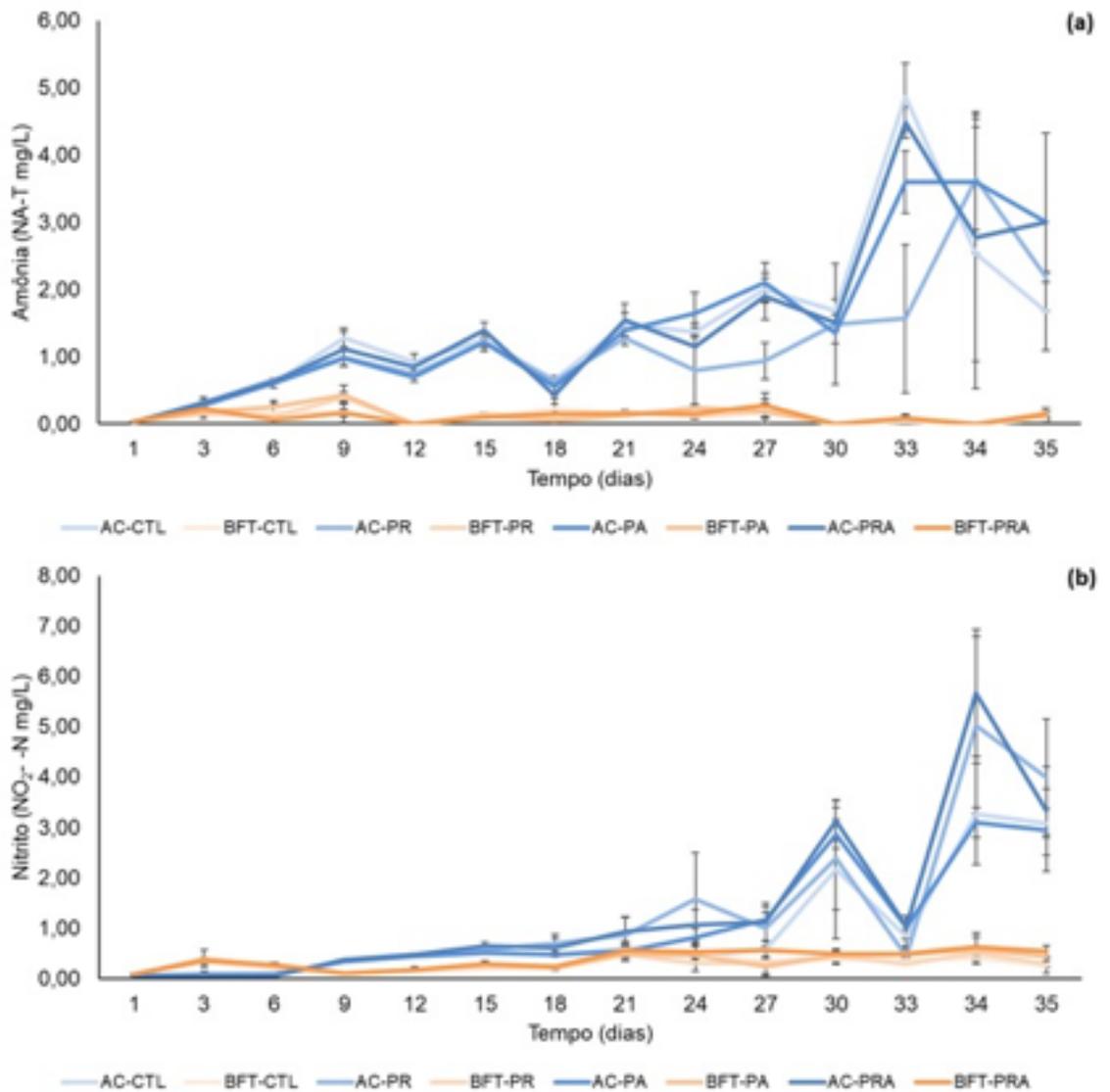
2051 **Figura 1** – Variação temporal do pH durante os 35 dias de berçário no sistema em água clara (AC) e sistema de bioflocos (BFT) nos diferentes tratamentos.

2052 As concentrações de amônia foram maiores nos sistemas de água clara em todos
2053 os tratamentos quando comparadas com sistema de bioflocos, o maior valor encontrado
2054 foi no tratamento AC-PRA (1,51 TA-N mg L⁻¹) e a menor concentração foi encontrada
2055 no sistema de bioflocos nos tratamentos BFT-CTL, BFT-PR e BFT-PRA (0,11 TA-N mg
2056 L⁻¹) (Figura 2a).

2057 Os valores médios das concentrações de nitrito foram significativamente maiores
2058 nos tratamentos do sistema de água clara, com maior valor medio nos tratamentos AC-
2059 PRA (1,33) e AC-PR (1,26). Os menores valores médios encontrados foram no sistema
2060 de bioflocos nos tratamentos BFT-PR (0,28), BFT-CTL (0,30) e BFT-PA (0,34) (Figura
2061 2b).

2062

2063

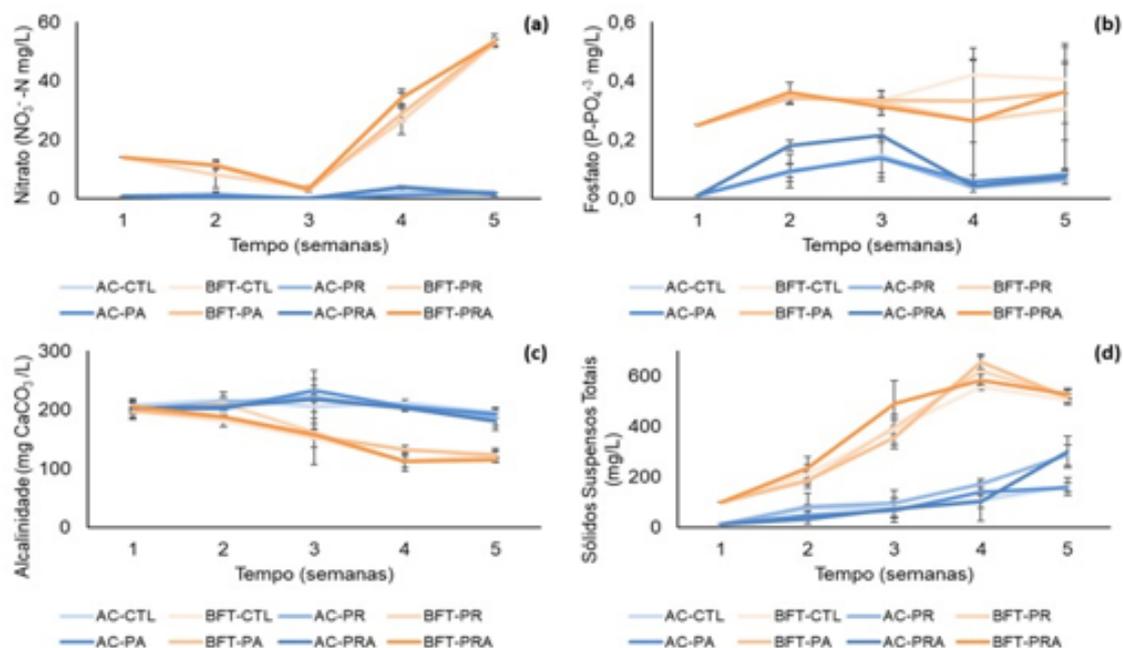


2064

2065 **Figura 2** – Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (NA-T) (a) e nitrito (N-NO₂) (b) durante os 35
 2066 dias de berçário nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

2066

2067 As concentrações de nitrato foram significativamente maiores no sistema de
 2068 bioflocos, porém sem diferença entre os tratamentos neste mesmo sistema, valores
 2069 médios das concentrações de nitrato nos tratamentos do sistema de bioflocos variaram de
 2070 26,7 a 23,2 nos tratamentos BFT-CTL e BFT-PR, respectivamente. Para sistema de água
 2071 clara os valores médios mantiveram-se entre 0,94 e 1,47 nos tratamentos AC-CTL e AC-
 2072 PR, respectivamente (Figura 3a).



2073
2074
2075
2076
2077

Figura 3 – Variação temporal do nitrato (N-NO₃) (a), fosfato (PO₄⁻³) (b), alcalinidade (CaCO₃) (c) e sólidos suspensos totais (mg/L) (d) ao longo das 5 semanas de berçário nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

2078
2079
2080
2081
2082

As concentrações de fosfato comportaram-se com mesmo padrão esperado nos sistemas, onde acumulou no sistema de bioflocos e manteve-se em concentrações próximas de zero no sistema de água clara. Os maiores valores médios foram encontrados no tratamento BFT-CTL (0,35) e o menor valor médio no tratamento AC-CTL (0,07) (Figura 3b).

2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092

Valores médios das concentrações de sólidos suspensos totais encontrados foram maiores nos tratamentos do sistema de bioflocos em todos os tratamentos, variando de 352,5 a 388,3 nos tratamentos BFT-CTL e BFT-PRA, respectivamente. No sistema de água clara o menor valor médio foi encontrado no tratamento AC-PA (85,0) e o maior valor médio no tratamento AC-PR (129,4) (Figura 3d). Ao longo do período experimental houve a tendência de formação de acúmulo de sólidos suspensos totais no sistema de água clara mesmo com as altas taxas de renovação, no entanto são valores considerados baixos quando comparados ao sistema de bioflocos, este possui maiores concentrações de sólidos suspensos totais devido ao comportamento do sistema heterotrófico.

Desempenho Zootécnico

O tratamento BFT-PRA apresentou melhor desempenho zootécnico para todos os parâmetros zootécnicos avaliados, como maior peso final (1,22g), segunda maior sobrevivência (96,5%), maior taxa de crescimento específico (13,2%), maior biomassa final (354,1 g) e conseqüentemente maior produtividade por metro quadrado (0,72 kg) (tabela 3). Os tratamentos BFT-PR, BFT-PA e AC-PRA foram estatisticamente iguais para valores médios de peso final, com 1,03g, 1,01g e 1,01g respectivamente. Tratamento AC-PR (0,98g) foi similar ao tratamento BFT-CTL (0,94g). O segundo menor peso final foi encontrado no tratamento AC-PA (0,80g) e o menor peso final encontrado foi no tratamento AC-CTL (0,62g) apresentando-se como tratamento com desempenho menos satisfatório no presente estudo (Figura 4).

Tabela 4 – Média (\pm desvio padrão) dos valores médios dos parâmetros de desempenho zootécnico ao final de 35 dias de berçário de *P. vannamei* em sistema superintensivo em água clara e sistema de bioflocos entre os diferentes tratamentos.

Parâmetros zootécnicos	Tratamentos							
	AC-CTL	BFT-CTL	AC-PR	BFT-PR	AC-PA	BFT-PA	AC-PRA	BFT-PRA
Peso inicial (g)	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001
Peso final (g)	0,62 \pm 0,05 ^d	0,94 \pm 0,04 ^{bc}	0,98 \pm 0,11 ^{bc}	1,03 \pm 0,01 ^b	0,80 \pm 0,13 ^c	1,01 \pm 0,04 ^b	1,01 \pm 0,01 ^b	1,22 \pm 0,09 ^a
Sobrevivência (%)	79,00 \pm 1,86 ^b	90,89 \pm 2,17 ^a	91,89 \pm 4,68 ^a	96,89 \pm 0,84 ^a	89,00 \pm 4,58 ^a	91,22 \pm 4,53 ^a	91,33 \pm 2,65 ^a	96,56 \pm 1,84 ^a
TCE (%)	11,26 \pm 0,24 ^c	12,46 \pm 0,12 ^b	12,56 \pm 0,33 ^b	12,71 \pm 0,02 ^b	11,99 \pm 0,45 ^b	12,66 \pm 0,11 ^b	12,68 \pm 0,01 ^b	13,20 \pm 0,21 ^a
CAA	3,01 \pm 0,37 ^a	2,85 \pm 0,22 ^{ab}	2,23 \pm 0,59 ^{ab}	2,20 \pm 0,32 ^{ab}	2,05 \pm 0,18 ^b	2,56 \pm 0,17 ^{ab}	2,11 \pm 0,31 ^{ab}	2,85 \pm 0,22 ^{ab}
Biomassa final (g)	146,74 \pm 11,38 ^d	256,21 \pm 9,14 ^{bc}	269,15 \pm 32,62 ^{bc}	298,42 \pm 2,92 ^{ab}	213,65 \pm 28,52 ^c	276,26 \pm 13,65 ^b	277,81 \pm 8,20 ^b	354,15 \pm 29,63 ^a
Produtividade (kg/m ²)	0,29 \pm 0,02 ^d	0,52 \pm 0,02 ^{bc}	0,54 \pm 0,07 ^{bc}	0,60 \pm 0,01 ^{ab}	0,43 \pm 0,06 ^c	0,56 \pm 0,03 ^b	0,56 \pm 0,02 ^b	0,72 \pm 0,06 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao longo do período experimental após ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

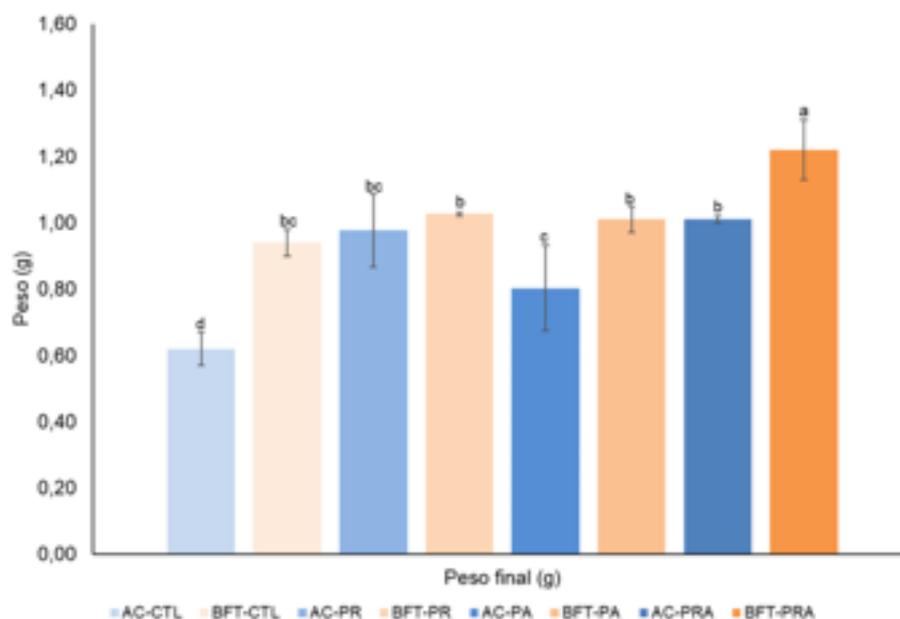


Figura 4 – Valores médios e desvio padrão do peso final (g) dos camarões ao fim dos 35 dias de berçário nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Como evidenciado anteriormente a estratégia de aplicação do mix probiótico em duas vias de aplicação no sistema de bioflocos (BFT-PRA) apresentou desempenho significativamente melhor quando comparado a todos os demais tratamentos. E o tratamento sem uso de probióticos em sistema de água clara (AC-CTL) apresentou pior desempenho zootécnico em todos os parâmetros avaliados e significativamente inferior a todos os demais tratamentos, obtendo menor peso médio final, menor sobrevivência (79%), menor taxa de crescimento específico (11,2%), maior taxa de conversão alimentar aparente (3,0), menor biomassa final (146,7g) e por consequência menor valor médio de produtividade (0,29kg) (Tabela 3).

Valores de sobrevivência foram significativamente maiores em todos os tratamentos com exceção do tratamento sem adição de probióticos em água clara (AC-CTL). Os tratamentos do sistema de bioflocos, incluindo o controle (BFT-CTL) quando comparados com os tratamentos do sistema de água clara com exceção do controle (AC-CTL), apresentaram desempenho zootécnico similar estatisticamente, ou seja, tratamentos em sistema de água clara com pelo menos uma via de aplicação do mix probiótico. Por exemplo, para o parâmetro zootécnico avaliado de taxa de crescimento específico (%) o tratamento BFT-PR obteve valor de 12,7 e o tratamento AC-PA o valor de 11,9, ambos estatisticamente iguais. A taxa de conversão alimentar aparente (CAA) no tratamento AC-PRA foi de 2,11 e no tratamento BFT-CTL o valor encontrado é de

2,85, ambos estatisticamente iguais. A biomassa final encontrada no tratamento BFT-PR é de 298,4g e similar ao tratamento AC-PRA com 277,8g. Os valores médios para produtividade em quilos por metro quadrado foram de 0,56 (BFT-PA) e 0,56 (AC-PRA) valores apresentados na tabela 3.

Avaliação da comunidade microbiana

Ao final do período experimental os flagelados e ciliados foram encontrados em maior abundância nos tratamentos do sistema de bioflocos, sendo o tratamento BFT-PRA com maior valor médio de flagelados ($2,34E+04$), ciliados ($1,08E+04$), nematoides ($2,04E+03$) e microalgas ($1,12E+04$). Os tratamentos do sistema em água clara não diferiram entre si e foram encontrados os menores valores médios de abundância de flagelados ($2,32E+03$) no tratamento AC-PRA e ciliados ($9,60E+02$) no tratamento AC-PR (Tabela 4).

Tabela 5 – Médias (+desvio padrão) dos microrganismos encontrados ao final dos 35 dias de berçário de *P. vannamei* em sistema superintensivo em água clara e bioflocos nos diferentes tratamentos.

	Flagelados (org/mL)	Ciliados (org/mL)	Rotíferos (org/mL)	Nematóides (org/mL)	Microalgas (org/mL)
AC-CTL	3,84E+03± 2,47E+03 ^c	1,04E+03± 6,08E+02 ^c	0,00±0,00 ^b	0,00±0,0 ^b	1,33E+03± 6,74E+02 ^b
BFT-CTL	9,46E+03± 2,37E+03 ^b	5,55E+03± 9,72E+02 ^b	1,27E+03± 2,89E+02 ^a	5,32E+02± 2,44E+02 ^a	9,72E+03± 2,67E+03 ^a
AC-PR	4,43E+03± 9,90E+02 ^c	9,60E+02± 6,64E+02 ^c	0,00±0,00 ^b	0,00±0,0 ^b	5,60E+03± 2,21E+03 ^{ab}
BFT-PR	1,40E+04± 1,36E+03 ^b	5,44E+03± 9,42E+02 ^b	1,50E+03± 5,39E+02 ^a	4,86E+02± 5,51E+02 ^a	9,39E+03± 4,14E+03 ^a
AC-PA	3,15E+03± 1,85E+03 ^c	9,72E+02± 8,07E+02 ^c	0,00±0,00 ^b	0,00±0,0 ^b	2,94E+03± 3,22E+02 ^b
BFT-PA	1,40E+04± 7,25E+02 ^b	5,37E+03± 1,88E+03 ^b	2,96E+03± 1,81E+03 ^a	1,48E+03± 2,23E+02 ^a	6,69E+03± 8,10E+02 ^a
AC-PRA	2,32E+03± 1,30E+03 ^c	1,31E+03± 1,09E+03 ^c	0,00±0,00 ^b	0,00±0,0 ^b	1,27E+03± 3,68E+02 ^b
BFT-PRA	2,34E+04± 2,64E+03 ^a	1,08E+04± 2,04E+03 ^a	2,61E+03± 4,24E+02 ^a	2,04E+03± 7,98E+02 ^a	1,12E+04± 2,45E+03 ^a

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos após ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.

Protozoários como os rotíferos e nematoides foram encontrados apenas nos tratamentos do sistema de bioflocos sem diferença entre os tratamentos, com variações nos valores médios no tratamento BFT-CTL ($1,27E+03$) e no tratamento BFT-PA ($2,96E+03$) para os rotíferos e para nematoides no tratamento BFT-PR ($4,86E+02$) e no tratamento BFT-PRA ($2,04E+03$). No sistema de água clara esses microrganismos não

foram encontrados. Microalgas foram encontradas em todos os sistemas e em todos os tratamentos, sendo os maiores valores médios encontrados no tratamento BFT-PRA (1,12E+04) e o menor valor médio encontrado no tratamento AC-PRA (1,27E+03) (Figura 5).

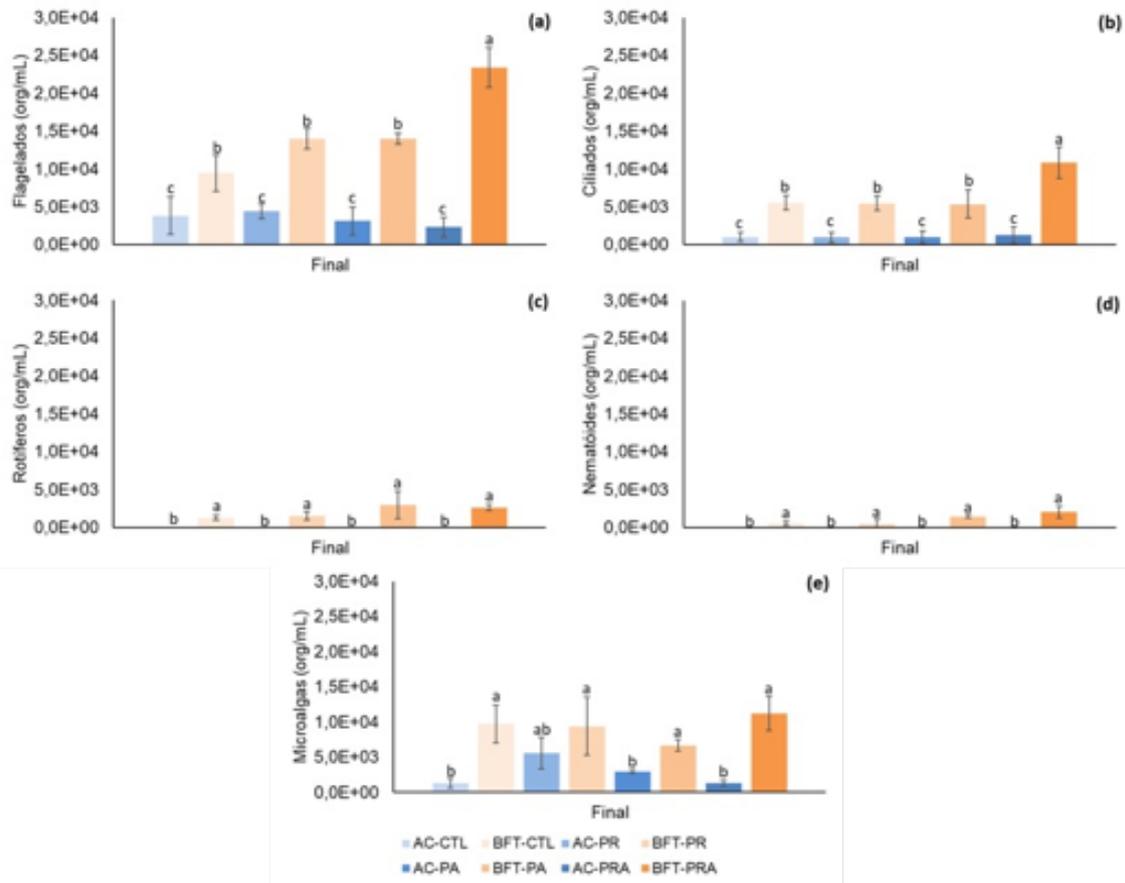


Figura 5 – Abundância de microrganismos (média±desvio padrão) presentes no sistema em água clara e sistema de bioflocos ao final do berçário de 35 dias. Divididos em flagelados (a), ciliados (b), rotíferos (c), nematoides (d) e microalgas (e). Letras diferentes expressam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os dados encontrados para abundância da microbiota total presente na água de cultivo e no intestino dos camarões são expressos na figura 6 (a), onde encontramos os valores totais da comunidade bacteriana similares na água e no trato digestório dos animais. Valores totais de *Bacillus subtilis* (b) e bactérias ácido lácticas totais (c) mantiveram comportamento similar, com maior prevalência bacteriana na água do que no intestino, porém sem diferença significativa em relação a quantidade presente na água ou no intestino dos animais (Tabela 5).

Tabela 6 – Média (\pm desvio padrão) da abundância bacteriana total (Dapi), de *Bacillus subtilis* e bactérias ácido lácticas na água e no intestino de *P. vannamei* ao final dos 35 dias de berçário em sistemas superintensivo em água clara e bioflocos nos diferentes tratamentos.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos após ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey.

Através da contagem total das bactérias encontradas na água do cultivo os maiores valores médios são observados no sistema de bioflocos no tratamento BFT-PRA ($5,13E+08$) destacando-se como o tratamento com maior abundância bacteriana total (Tabela 5). O tratamento BFT-PR ($4,00E+08$) representa a segunda maior abundância bacteriana, seguido pelo tratamento BFT-PA ($3,47E+08$) e BFT-CTL ($3,01E+08$), nos

Tratamentos	Água			Intestino		
	Dapi (abundância total 10^8 mL^{-1})	<i>Bacillus subtilis</i> ($10^7 mL^{-1}$)	Bactérias Ácido Lácticas ($10^7 mL^{-1}$)	Dapi (abundância total 10^8 mL^{-1})	<i>Bacillus subtilis</i> ($10^7 mL^{-1}$)	Bactérias Ácido Lácticas ($10^7 mL^{-1}$)
AC-CTL	0,75 \pm 0,04 ^e	0,09 \pm 0,01 ^g	0,00 \pm 0,00 ^f	0,48 \pm 0,21 ^c	0,03 \pm 0,01 ^b	0,00 \pm 0,00 ^c
BFT-CTL	3,01 \pm 0,60 ^{bc}	0,77 \pm 0,19 ^{cd}	0,00 \pm 0,00 ^f	3,29 \pm 0,30 ^a	0,19 \pm 0,16 ^{ab}	0,00 \pm 0,00 ^c
AC-PR	2,88 \pm 0,29 ^c	0,41 \pm 0,08 ^{ef}	0,26 \pm 0,04 ^{cd}	2,07 \pm 0,46 ^b	0,12 \pm 0,09 ^{ab}	0,06 \pm 0,05 ^{ab}
BFT-PR	4,00 \pm 0,36 ^b	1,43 \pm 0,20 ^{ab}	0,53 \pm 0,19 ^{ab}	3,01 \pm 0,49 ^a	0,42 \pm 0,15 ^a	0,13 \pm 0,04 ^a
AC-PA	1,77 \pm 0,38 ^d	0,25 \pm 0,07 ^{fg}	0,12 \pm 0,03 ^{de}	1,71 \pm 0,60 ^b	0,20 \pm 0,17 ^{ab}	0,05 \pm 0,07 ^{ab}
BFT-PA	3,47 \pm 0,24 ^{bc}	1,16 \pm 0,19 ^{bc}	0,64 \pm 0,28 ^{ab}	3,07 \pm 0,55 ^a	0,43 \pm 0,12 ^a	0,13 \pm 0,06 ^a
AC-PRA	2,49 \pm 0,45 ^{cd}	0,46 \pm 0,07 ^{de}	0,29 \pm 0,05 ^{bc}	2,97 \pm 0,43 ^a	0,26 \pm 0,09 ^{ab}	0,07 \pm 0,02 ^{ab}
BFT-PRA	5,13 \pm 0,21 ^a	2,01 \pm 0,06 ^a	0,92 \pm 0,08 ^a	4,14 \pm 0,56 ^a	0,87 \pm 0,26 ^a	0,17 \pm 0,12 ^a

sistemas de água clara encontramos valores médios inferiores ao sistema de bioflocos, onde o tratamento AC-PR ($2,88E+08$) apresenta maior abundância entre os tratamentos em água clara, seguido pelos tratamentos AC-PRA ($2,49E+08$) e AC-PA ($1,77E+08$). O tratamento AC-CTL ($0,75E+08$) apresenta menor abundância bacteriana total (Figura 7a).

A contagem total das bactérias presentes no intestino nos tratamentos do sistema de bioflocos são estatisticamente iguais nos tratamentos BFT-PRA (4,14E+08), BFT-CTL (3,29E+08), BFT-PR (3,01E+08), BFT-PA (3,07E+08), e AC-PRA (2,97E+08), sendo este último o único tratamento do sistema em água clara que se iguala aos tratamentos em sistema de bioflocos. O tratamento AC-PR (2,07E+08) iguala-se ao tratamento AC-PA (1,71E+08) ambos são superiores e diferem estatisticamente do tratamento AC-CTL (0,48E+08) que se apresenta com menor contagem média de bactérias no intestino dos camarões (Figura 7b).

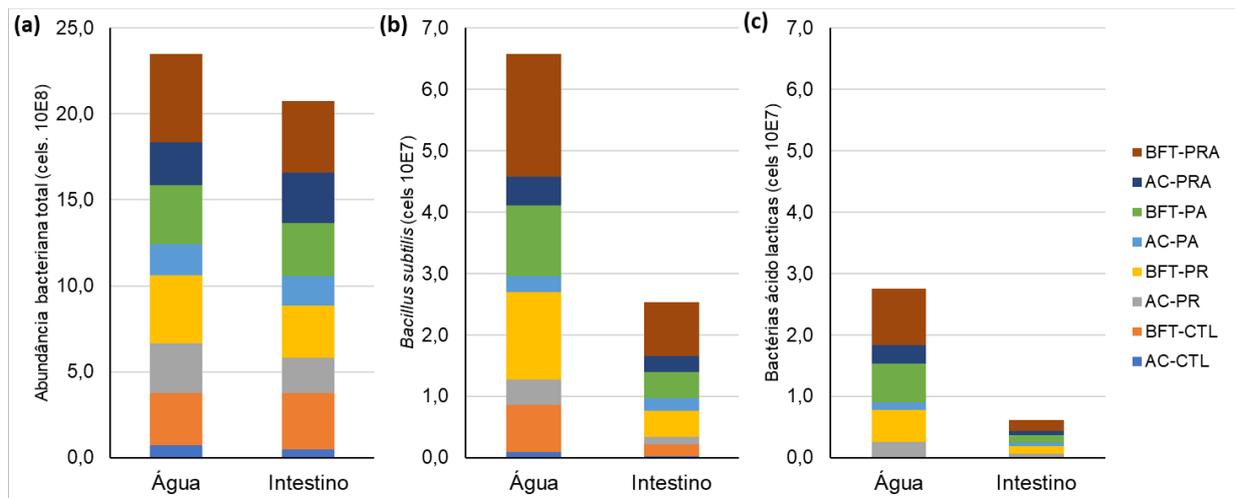


Figura 6 – Abundância bacteriana total (a), *Bacillus subtilis* (b) e bactérias ácido lácticas (c), presentes na água de cultivo e no intestino dos camarões ao final do berçário de 35 dias.

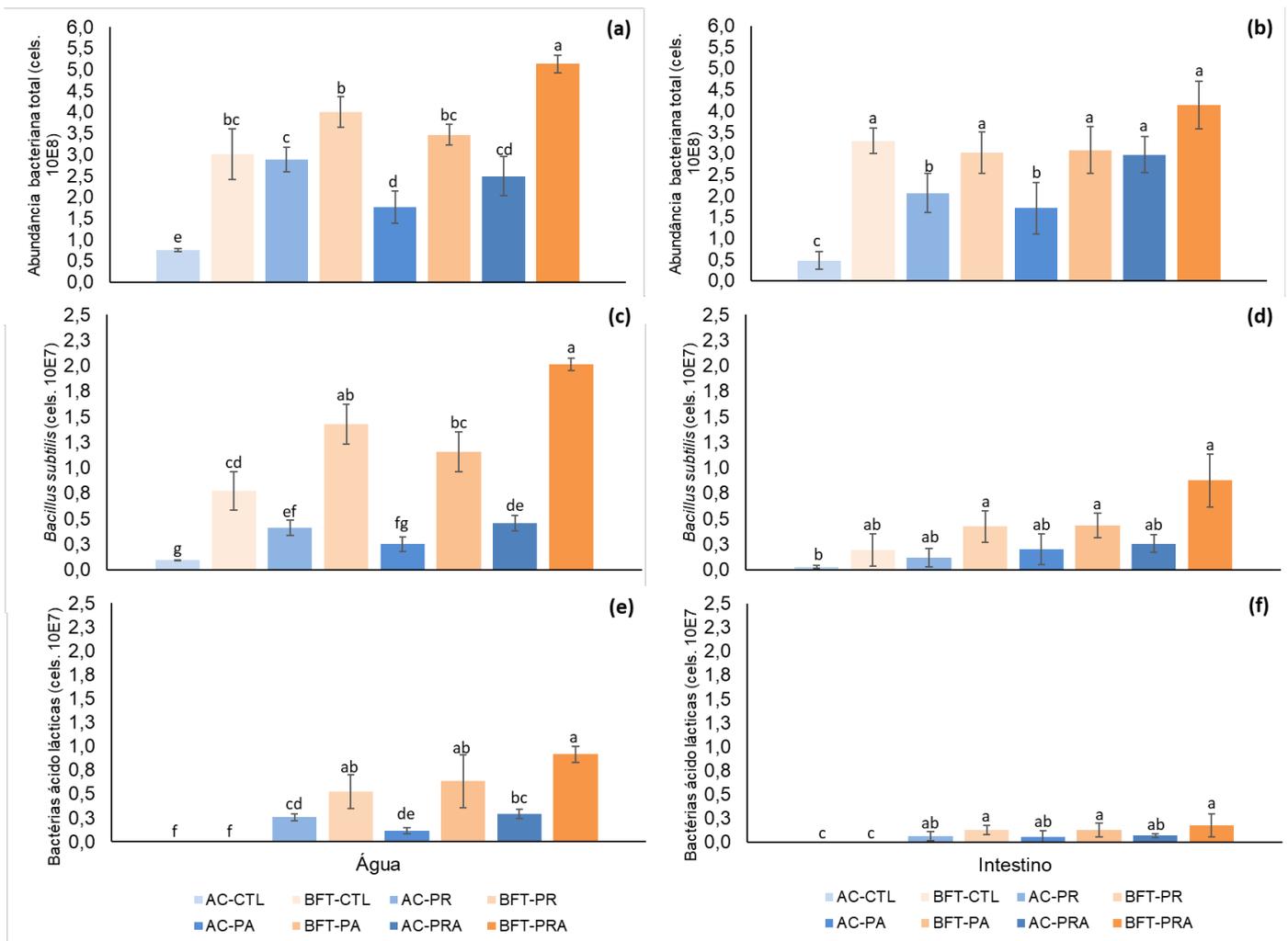


Figura 7 – Médias (\pm desvio padrão) da abundância bacteriana total na água (a), abundância bacteriana total no intestino (b), *Bacillus subtilis* na água (c), *Bacillus subtilis* no intestino (d), bactérias ácido lácticas na água (e) e bactérias ácido lácticas no intestino (f) ao final dos 35 dias de berçário.

Na contagem específica para *Bacillus subtilis* na água de cultivo encontramos o maior valor médio no tratamento BFT-PRA ($2,01E+07$), seguido pelos demais tratamentos em sistema de bioflocos, BFT-PR ($1,43E+07$), BFT-PA ($1,16E+07$) e BFT-CTL ($0,77E+07$). No sistema em água clara o tratamento com maior valor médio foi observado no tratamento AC-PRA ($0,46E+07$), seguido pelos tratamentos AC-PR ($0,41E+07$) e AC-PA ($0,25E+07$). O tratamento AC-CTL ($0,09E+07$) apresentou menor contagem de bacilos (Figura 7c). No intestino dos camarões foram encontrados a maior contagem de bacilos no tratamento BFT-PRA ($0,87E+07$), assim como nos tratamentos BFT-PA ($0,43E+07$) e BFT-PR ($0,42E+07$). O tratamento AC-PRA ($0,26E+07$) apresentou maior contagem de bacilos entre os tratamentos em água clara e igualmente significativo ao tratamento BFT-CTL ($0,19E+07$), seguido pelos tratamentos AC-PA ($0,20E+07$) AC-PR ($0,12E+07$). O tratamento controle em água clara AC-CTL ($0,03E+07$) apresenta menor contagem de bacilos entre todos os tratamentos (Figura 7d).

As bactérias ácido lácticas não foram encontradas nos tratamentos controle em água clara (AC-CTL) e em sistema de bioflocos (BFT-CTL) em ambas as amostragens, tanto na água de cultivo como no intestino dos animais cultivados. Na contagem específica de bactérias ácido lácticas na água foram encontrados maior valor médio no tratamento BFT-PRA ($0,92E+07$) seguido pelos tratamentos BFT-PA ($0,64E+07$), BFT-PR ($0,53E+07$), AC-PRA ($0,29E+07$) e AC-PR ($0,26E+07$), com menor valor médio encontrado temos o tratamento AC-PA ($0,12E+07$) (Figura 7e). No intestino dos camarões o comportamento da colonização bacteriana evidenciou a maior valor médio nos tratamentos em sistema de bioflocos BFT-PRA ($0,17E+07$), BFT-PR e BFT-PA ($0,13E+07$) diferindo estatisticamente dos tratamentos em água clara AC-PRA ($0,07E+07$), AC-PR ($0,06E+07$) e AC-PA ($0,05E+07$) (Figura 7f).

Discussão

A aplicação do mix probiótico não afetou a qualidade da água, onde os parâmetros físicos e químicos da qualidade da água como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, salinidade, amônia, nitrito, nitrato, fosfato e sólidos suspensos totais mantiveram-se dentro da faixa ideal e recomendada para *P. vannamei* (Burford et al. 2003; Furtado et al. 2015; Furtado, Poersch, and Wasielesky 2014; Gaona et al. 2011; Lin and Chen 2001, 2003; Ponce-Palafox, Martinez-Palacios, and Ross 1997; Wyk and Scarpa 1999). No entanto, algumas diferenças encontradas estão relacionadas aos diferentes sistemas de produção, sistema em água clara e bioflocos, sendo o esperado para esse design experimental. Apenas de as concentrações de nitrito e de sólidos suspensos totais apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados em ambos os sistemas. As concentrações médias de nitrito foram maiores no sistema de água clara devido à ausência do processo de nitrificação, com maiores valores encontrados nos tratamentos AC-PRA e AC-PR e as menores concentrações foram encontradas nos tratamentos BFT-PR, BFT-CTL e BFT-PA, comportamento similar foi observado em condições de água clara e sistema de bioflocos com o uso de probióticos, onde a ausência do processo de nitrificação gerou maiores concentrações nos tratamentos em água clara (Hostins et al. 2017).

A adição de probióticos é considerada uma prática de manejo de extrema importância para melhor desempenho zootécnico dos animais cultivados, contribuindo

para melhor performance, imunidade e controle de potenciais bactérias patogênicas (Farzanfar 2006; de Souza et al. 2012). O tratamento com melhor desempenho zootécnico foi o BFT-PRA, onde os índices de crescimento e produção foram superiores, peso médio 50% maior quando comparado com controle. A adição de bactérias probióticas em sistemas de bioflocos (com inoculo) proporciona melhores condições de crescimento bacteriano, onde os nutrientes presentes no sistema de bioflocos contribuem para melhor desenvolvimento da comunidade microbiana (Ekasari et al. 2014; Krummenauer et al. 2014; Kuhn et al. 2010). Quando os probióticos foram adicionados na ração e na água mesmo em condições de água clara (AC-PRA), melhoras significativas foram observadas, como maior peso final, taxa de crescimento específico e produtividade, sem diferir do sistema de bioflocos. Isso foi observado em estudo com adição contínua do mix probiótico (3g/kg ração) onde obtiveram peso médio em 20% mais alto comparado com controle (Kesselring et al. 2019).

Altas densidades de estocagem são comuns em berçários em sistemas superintensivos, quando o sistema não é controlado de maneira eficiente pode causar redução das taxas de sobrevivência e perdas de produção. No entanto, quando o manejo é delineado de maneira apropriada pode resultar em melhores condições de cultivo e controle dos animais (Wasiolesky et al. 2013). A alta densidade de estocagem utilizada neste presente estudo afetou negativamente o desempenho zootécnico no sistema em água clara sem uso de probióticos (AC-CTL) obtendo os piores resultados em todos os parâmetros zootécnicos avaliados. Grupos controle (sem adição de probióticos) muitas vezes são afetados por diversos fatores, como estresse, altas densidades e canibalismo, o que contribui para o desempenho zootécnico pouco satisfatório como observado em estudos com adição de bacilos versus controle (Rengpipat et al. 1998; Zokaeifar et al. 2012). As taxas de sobrevivência foram altas, acima de 89%, em todos os tratamentos, exceto o tratamento em água clara controle (AC-CTL). Aplicação dos probióticos é descrita em diversos estudos onde são efetivos para melhoras em diferentes parâmetros zootécnicos, entre eles são encontradas as altas taxas de sobrevivência ao final dos experimentos (Abumourad, Authman, and Sharaf 2013; Pandiyan et al. 2013; Ramu et al. 2017).

Diferentes metodologias de aplicação dos probióticos são comumente utilizadas, diretamente na água, incorporada a ração, banhos de imersão e adição direta aos sedimentos (Gullian, Thompson, and Rodriguez 2004; Laloo et al. 2007; Rengpipat et al. 1998). A aplicação diária do mix probiótico fornece bactérias de maneira contínua ao

sistema de produção, esse estímulo contínuo contribuiu para melhor desempenho zootécnico em todos os tratamentos com pelo menos uma via de aplicação, conforme mencionado por diversas revisões bibliográficas sobre o uso de probióticos (Kumar et al. 2016; Nayak 2021; Pandiyan et al. 2013). Quando as bactérias probióticas são adicionadas a ração e a água fornecem maior aporte de bactérias benéficas aos animais e ao ambiente de cultivo, podemos observar através dos dados obtidos para o desempenho dos animais que a aplicação dupla dos probióticos causou efeitos satisfatórios, estudos corroboram com essa hipótese onde diferentes vias de aplicação e metodologias influenciam diretamente o desempenho dos organismos cultivados (Bidhan et al. 2014; Wee et al. 2024; Zokaeifar et al. 2012).

O desenvolvimento da comunidade microbiana desempenha um papel crucial no metabolismo da matéria orgânica, reciclagem de nutrientes e suplementação nutricional fornecida aos organismos cultivados, onde transforma nitrogênio em proteína microbiana (Amjad et al. 2022; Huerta-Rábago et al. 2019). No presente estudo foram avaliados os microrganismos presentes na água, classificados entre protozoários (zooplâncton) e microalgas (fitoplâncton), foram encontrados flagelados, ciliados, rotíferos, nematoides e microalgas. O maior número de flagelados e ciliados foram encontrados nos tratamentos em sistema de bioflocos, sendo o tratamento BFT-PRA com maior desenvolvimento desses microrganismos. Os tratamentos BFT-PR, BFT-PA e BFT-CTL, demonstraram desenvolvimento da comunidade microbiana abaixo do tratamento BFT-PRA, porém superiores a todos tratamentos em sistema de água clara. Flagelados, ciliados e microalgas foram encontrados nos tratamentos em sistema de água clara, incluindo o controle (AC-CTL), no entanto sua abundância é significativamente inferior a todos demais tratamentos em sistema de bioflocos. Em sistema de bioflocos o comportamento da comunidade microbiana é relatado em diversos estudos, onde são encontrados diversos protozoários e diferentes microalgas neste sistema, atuam diretamente na composição microbiana e no desempenho dos organismos cultivados (Khanjani, Mohammadi, and Emerenciano 2022; Reis et al. 2019). Demais protozoários como rotíferos e nematoides foram encontrados apenas no sistema de bioflocos e presentes em todos os tratamentos, são organismos indicadores de maior desenvolvimento da cadeia microbiana, participando da ciclagem de nutrientes e do “microbial loop”, atuando como suplementação nutricional de alta qualidade, devido ao aporte de proteínas e lipídeos (Azam et al. 1983; Khanjani et al. 2022; Ray et al. 2010).

As microalgas são responsáveis por produzir proteínas, lipídeos, açúcares e participam da dinâmica de oxigênio dissolvido e dióxido de carbono nos sistemas de aquicultura. São consideradas produtoras primárias e são consumidas pelo zooplâncton, transferindo nutrientes para níveis tróficos mais altos (Brown et al. 1997; Ju et al. 2008; Martins et al. 2016). Nas condições experimentais deste presente estudo as microalgas foram encontradas em todos os tratamentos, onde a maior abundância foi observada nos tratamentos em sistema de bioflocos, sendo estes superiores aos valores encontrados no sistema de água clara. Os bioflocos fornecem nutrientes para o crescimento das microalgas através da decomposição da matéria orgânica e atuam como fertilizante (nitrogênio e fosfato) em condições controladas, caso contrário, pode ocasionar domínio indesejado de microalgas filamentosas e cianobactérias (Hargreaves 2013; Holanda et al. 2021).

A técnica de biologia molecular “FISH” (Fluorescence *in situ* hybridization) usada no presente estudo foi eficaz para quantificar e identificar a diversidade de bactérias e a abundância das bactérias específicas através do uso de sondas com marcadores alvo, conforme estudos anteriores (Del’Duca et al. 2013; Hostins et al. 2017; Tanaka et al. 2016; Yokokawa and Nagata 2005). O presente estudo obteve os valores da abundância bacteriana total, abundância de *Bacillus subtilis* e abundância de bactérias ácido lácticas, quantificadas na água de cultivo e no intestino dos animais. Ambas as quantificações foram significativamente maiores nos tratamentos com sistema de bioflocos e especialmente no tratamento com via dupla de aplicação dos probióticos (BFT-PRA) na água e no intestino. A colonização do trato dos animais foi evidenciada neste estudo, onde foram encontrados bacilos e as bactérias ácido lácticas, com exceção dos grupos controle, o que justifica os baixos índices zootécnicos (Huyghebaert, Ducatelle, and Immerseel 2011; Knipe et al. 2021).

A comunidade microbiana é composta por diversos microrganismos que incluem uma grande quantidade de bactérias, que pertencem a diferentes grupos, onde encontramos bactérias heterotróficas, quimioautotróficas, fotossintéticas, probióticas e patogênicas, são consideradas os principais organismos nos sistemas de bioflocos (Cardona et al. 2016; Ebeling et al. 2006; Luis-Villaseñor et al. 2013; Ray et al. 2010). Autores afirmam a existência de uma intensiva interação entre o ambiente de cultivo e os organismos aquáticos cultivados, ou seja, o equilíbrio da comunidade bacteriana da água está diretamente relacionado com a colonização do intestino dos camarões (Moriarty 1998; Verschuere et al. 2000). A capacidade de colonização do trato intestinal

proporciona inúmeros benefícios ao hospedeiro, como a adesão, sobrevivência e multiplicação das bactérias no trato intestinal, competição com bactérias patogênicas, melhor absorção de nutrientes, estimulação do sistema imune, capacidade de secretar substâncias antagonistas e bacteriocinas (Amoah et al. 2019; González-Félix et al. 2018; Merrifield et al. 2011; Wang et al. 2022). No presente estudo observamos a colonização do trato intestinal em concordância com as condições encontradas na água de cultivo.

O uso de mix probiótico (multiespécies) é investigado por diversos autores atualmente, a preocupação com a interação entre as bactérias vem sendo descoberta e avaliada. Os bacilos muitas vezes são encontrados em maior abundância no ambiente de cultivo do que propriamente no intestino, no entanto, as bactérias ácido lácticas tendem a colonizar intestino e são capazes de suportar amplas variações de pH, salinidade e condições sem oxigênio (intestino), facilitando sua multiplicação (Decamp, Moriarty, and Lavens 2008; Kesarcodi-Watson et al. 2008; Mohapatra et al. 2012; Timmerman et al. 2004; Won et al. 2020). Os bioflocos contribuíram para maior abundância bacteriana em todos os tratamentos testados e o presente estudo também evidencia que a maior abundância bacteriana é encontrada na água quando comparada ao intestino, porém ambos estão em sincronia, resultados similares foram encontrados em sistema de bioflocos. Os bacilos foram capazes de colonizar o trato, assim como as bactérias ácido lácticas, as concentrações diferiram em relação ao método de aplicação, ao sistema de produção e a dose aplicada (Hu et al. 2017; Klaenhammer 1993; Nguyen Thi Truc et al. 2021).

Conclusões

A utilização do mix probiótico composto por multiésspecies (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) foi capaz de manter a qualidade da água em ambos os sistemas e tratamentos, proporcionou melhor desempenho zootécnico quando aplicado na ração e na água em sistema de bioflocos e quando aplicado na ração e na água em sistema de água clara proporcionou desempenho similar ao sistema de bioflocos. A maior abundância de microrganismos e bactérias foram encontradas no sistema de bioflocos quando o mix probiótico foi adicionado em duas vias de aplicação. Os bacilos e as bactérias ácido lácticas foram capazes de colonizar a água do cultivo e o trato intestinal dos camarões cultivados.

Referências Bibliográficas

- Abumourad, Iman, Mohammad M. N. Authman, and Osama Sharaf. 2013. Evaluation of *Lactobacillus Plantarum* as a Probiotic in Aquaculture: *Emphasis on Growth Performance and Innate Immunity*. Vol. 1.
- Algburi, Ammar, Anna Volski, Carla Cugini, Emily M. Walsh, Vladimir A. Chistyakov, Maria S. Mazanko, Anzhelica B. Bren, Leon M. T. Dicks, and Michael L. Chikindas. 2016. "Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus Amyloliquefaciens* B-1895." *Advance in Microbiology* (May):432–52.
- Aly, Salah Mesalhy, Yousef Abdel-Galil Ahmed, Ahlam Abdel-Aziz Ghareeb, and Moahmed Fathi Mohamed. 2008. "Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as Potential Probiotics, on the Immune Response and Resistance of Tilapia Nilotica (*Oreochromis Niloticus*) to Challenge Infections." *Fish and Shellfish Immunology* 25(1–2):128–36. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.013.
- Aminot, A., and M. Chaussepied. 1983. "Manuel Des Analyses Chimiques En Milieu Marin." *CNEXO, Brest*.
- Amjad, Khalid, Hans-Uwe Dahms, Chuan-Hsin Ho, Yu-Chen Wu, Feng-You Lin, and Hong-Thih Lai. 2022. "Probiotic Additions Affect the Biofloc Nursery Culture of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)." *Aquaculture* 560:738475. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738475>.
- Amoah, Kwaku, Qin-cheng Huang, Bei-ping Tan, Shuang Zhang, Shu-yan Chi, Qi-hui Yang, Hong-yu Liu, and Xiao-hui Dong. 2019. "Dietary Supplementation of Probiotic Bacteria, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, Improves the Growth Performance, Intestinal Morphology, Microflora, Immune Response, and Disease Confrontation of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *Fish and Shellfish Immunology*. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.029.
- AOAC, CA. 2005. "Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists International." *Official Methods: Gaithersburg, MD, USA*.
- Avnimelech, Yoram. 1999. "C / N Ratio as a Control Element in Aquaculture Systems." (June 1999):227–35. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00085-X.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, and F. Thingstad. 1983. "The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea." *Marine Ecology* 10:257–63.
- Bentzon-Tilia, Mikkel, Eva C. Sonnenschein, and Lone Gram. 2016. "Monitoring and Managing Microbes in Aquaculture – Towards a Sustainable Industry." *Microbial Biotechnology* 9(5):576–84. doi: 10.1111/1751-7915.12392.
- Bidhan, C. De, D. K. Meena, B. K. Behera, Pronob Das, P. K. Das Mohapatra, and A. P. Sharma. 2014. "Probiotics in Fish and Shellfish Culture: Immunomodulatory and Ecophysiological Responses." *Fish Physiology and Biochemistry* 40(3):921–71. doi: 10.1007/s10695-013-9897-0.
- Brown, M. R., S. W. Jeffrey, J. K. Volkman, and G. .. Dunstan. 1997. "Nutritional Properties of Microalgae for Mariculture." *Aquaculture* 151(1–4):315–31. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3.
- Burford, Michele A., Peter J. Thompson, Robins P. McIntosh, Robert H. Bauman, and Doug C. Pearson. 2003. "Nutrient and Microbial Dynamics in High-Intensity, Zero-Exchange Shrimp Ponds in Belize." *Aquaculture* 219(1–4):393–411. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00575-6.
- Cardona, Emilie, Bénédicte Lorgeoux, Liet Chim, Jean Goguenheim, Hervé Le Delliou, and Chantal Cahu. 2016. "Biofloc Contribution to Antioxidant Defence Status,

- Lipid Nutrition and Reproductive Performance of Broodstock of the Shrimp *Litopenaeus stylirostris*: Consequences for the Quality of Eggs and Larvae.” *Aquaculture* 452:252–62. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.003.
- Cienfuegos-Martínez, Kathia, María del Carmen Monroy-Dosta, Aida Hamdan-Partida, Martha Patricia Hernández-Vergara, José Felix Aguirre-Garrido, and Jaime Bustos-Martínez. 2022. “Effect of the Probiotic *Lactococcus lactis* on the Microbial Composition in the Water and the Gut of Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Cultivate in Biofloc.” *Aquaculture Research* 53(11):3877–89. doi: 10.1111/are.15889.
- Cienfuegos-Martínez, Kathia, María del Carmen Monroy-Dosta, Aida Hamdan-Partida, Martha Patricia Hernández-Vergara, Daniel Becerril-Cortés, and Evelyn López-García. 2020. “A Review of the Use of Probiotics in Freshwater Prawn (*Macrobrachium* Sp.) Culture in Biofloc Systems.” *Latin American Journal of Aquatic Research* 48(4):518–28. doi: 10.3856/vol48-issue4-fulltext-2464.
- Cottrell, Matthew T., and David L. Kirchman. 2003. “Contribution of Major Bacterial Groups to Bacterial Biomass Production (Thymidine and Leucine Incorporation) in the Delaware Estuary.” *Limnology and Oceanography* 48(1 I):168–78. doi: 10.4319/lo.2003.48.1.0168.
- Decamp, Olivier, David J. W. Moriarty, and Patrick Lavens. 2008. “Probiotics for Shrimp Larviculture: Review of Field Data from Asia and Latin America.” *Aquaculture Research* 39(4):334–38. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x.
- Defoirdt, Tom, Patrick Sorgeloos, and Peter Bossier. 2011. “Alternatives to Antibiotics for the Control of Bacterial Disease in Aquaculture.” *Current Opinion in Microbiology* 14(3):251–58. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.004.
- Del’Duca, Alessandro, Dionéia Evangelista Cesar, and Paulo César Abreu. 2015. “Bacterial Community of Pond’s Water, Sediment and in the Guts of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Juveniles Characterized by Fluorescent in Situ Hybridization Technique.” *Aquaculture Research* 46(3):707–15. doi: 10.1111/are.12218.
- Del’Duca, Alessandro, Dionéia Evangelista Cesar, Cláudio Galuppo Diniz, and Paulo César Abreu. 2013. “Evaluation of the Presence and Efficiency of Potential Probiotic Bacteria in the Gut of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Using the Fluorescent in Situ Hybridization Technique.” *Aquaculture* 388–391(1):115–21. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.019.
- Demanèche, Sandrine, Hervé Sanguin, John Poté, Elisabeth Navarro, Dominique Bernillon, Patrick Mavingui, Walter Wildi, Timothy M. Vogel, and Pascal Simonet. 2008. “Antibiotic-Resistant Soil Bacteria in Transgenic Plant Fields.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(10):3957–62. doi: 10.1073/pnas.0800072105.
- Ebeling, James M., Michael B. Timmons, and J. J. Bisogni. 2006. “Engineering Analysis of the Stoichiometry of Photoautotrophic, Autotrophic, and Heterotrophic Removal of Ammonia–Nitrogen in Aquaculture Systems.” *Aquaculture* 257(1–4):346–58. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.019.
- Ekasari, Julie, Deasy Angela, Setiyo Hadi Waluyo, Taufiq Bachtiar, Enang Harris Surawidjaja, Peter Bossier, and Peter De Schryver. 2014. “The Size of Biofloc Determines the Nutritional Composition and the Nitrogen Recovery by Aquaculture Animals.” *Aquaculture* 426–427:105–11. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.023.
- El-Saadony, Mohamed T., Abdelrazeq M. Shehata, Mahmoud Alagawany, Abdel-Moneim E. Abdel-Moneim, Dina A. Selim, Mohamed Abdo, Asmaa F. Khafaga,

- Khaled A. El-Tarabily, Nahed A. El-Shall, and Mohamed E. Abd El-Hack. 2022. "A Review of Shrimp Aquaculture and Factors Affecting the Gut Microbiome." *Aquaculture International* 30(6):2847–69. doi: 10.1007/s10499-022-00936-1.
- El-Sayed, Abdel-Fattah M. 2021. "Use of Biofloc Technology in Shrimp Aquaculture: A Comprehensive Review, with Emphasis on the Last Decade." *Reviews in Aquaculture* 13(1):676–705. doi: 10.1111/raq.12494.
- Emerenciano, Mauricio Gustavo Coelho, Luis Rafael Martínez-Córdova, Marcel Martínez-Porchas, and Anselmo Miranda-Baeza. 2017. "Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture." in *Water Quality*. InTech.
- Emerenciano, Maurício G. C., Artur N. Rombenso, Felipe d. N. Vieira, Mateus A. Martins, Greg J. Coman, Ha H. Truong, Tansyn H. Noble, and Cedric J. Simon. 2022. "Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding." *Animals* 12(3):236. doi: 10.3390/ani12030236.
- Farzanfar, Ali. 2006. "The Use of Probiotics in Shrimp Aquaculture." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48(2):149–58. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x.
- Furtado, Plínio S., Michelle M. S. Fugimura, José María Monserrat, Diego M. Souza, Luciano de O. Garcia, and Wilson Wasielesky. 2015. "Acute Effects of Extreme PH and Its Influences on the Survival and Biochemical Biomarkers of Juvenile White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 48(6):417–29. doi: 10.1080/10236244.2015.1086539.
- Furtado, Plinio S., Luis H. Poersch, and Wilson Wasielesky. 2014. "The Effect of Different Alkalinity Levels on *Litopenaeus vannamei* Reared with Biofloc Technology (BFT)." *Aquaculture International* 23(1):345–58. doi: 10.1007/s10499-014-9819-x.
- Furtado, Plínio S., Luís H. Poersch, and Wilson Wasielesky. 2011. "Effect of Calcium Hydroxide, Carbonate and Sodium Bicarbonate on Water Quality and Zootechnical Performance of Shrimp *Litopenaeus vannamei* Reared in Bio-Flocs Technology (BFT) Systems." *Aquaculture* 321(1–2):130–35. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.08.034.
- Gaona, C. a P., L. H. Poersch, D. Krummenauer, and G. K. Foes. 2011. "The Effect of Solids Removal on Water Quality , Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* in a Biofloc Technology Culture System." *International Journal of Recirculating Aquaculture* 12(June 2011):54–73.
- Gatesoupe, F. J. 2016. "Probiotics and Other Microbial Manipulations in Fish Feeds." Pp. 319–28 in *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Elsevier.
- Giang, Truong, Huynh Shao, Yang Hu, Chiu Shia, Chiu Quoc, Phu Truong, and Hung Liu. 2019. "Bacterial Population in Intestines of White Shrimp , *Litopenaeus vannamei* Fed a Synbiotic Containing *Lactobacillus plantarum* and *Galactooligosaccharide*." (September 2018):1–11. doi: 10.1111/are.13951.
- Giri, S. S., V. Sukumaran, S. S. Sen, and P. K. Jena. 2014. "Effects of Dietary Supplementation of Potential Probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 Singularly or in Combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the Growth, Immunity and Disease Resistance of *Labeo Rohita*." *Aquaculture Nutrition* 20(2):163–71. doi: 10.1111/anu.12062.
- Glöckner, Frank Oliver, Rudolf Amann, Albin Alfreider, Jakob Pernthaler, Roland Psenner, Karlheinz Trebesius, and Karl Heinz Schleifer. 1996. "An in Situ Hybridization Protocol for Detection and Identification of Planktonic Bacteria."

- Systematic and Applied Microbiology* 19(3):403–6. doi: 10.1016/S0723-2020(96)80069-5.
- González-Félix, Mayra L., Delbert M. Gatlin, Perla Urquidez-Bejarano, Carolina de la Reé-Rodríguez, Lyra Duarte-Rodríguez, Filiberto Sánchez, Andrea Casas-Reyes, Fernando Y. Yamamoto, Adrián Ochoa-Leyva, and Martin Perez-Velazquez. 2018. “Effects of Commercial Dietary Prebiotic and Probiotic Supplements on Growth, Innate Immune Responses, and Intestinal Microbiota and Histology of *Totoaba Macdonaldi*.” *Aquaculture* 491:239–51. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.03.031.
- Guimarães, Mateus Cardoso, Isabel M. Cerezo, Miguel Frederico Fernandez-Alarcon, Mariene Miyoko Natori, Luciana Yuri Sato, Camila A. T. Kato, Miguel Angel Moriñigo, Silvana Tapia-Paniagua, Danielle de Carla Dias, Carlos Massatoshi Ishikawa, Maria José T. Ranzani-Paiva, Luara Lucena Cassiano, Erna Elisabeth Bach, Patrícia B. Clissa, Daniele P. Orefice, and Leonardo Tachibana. 2022. “Oral Administration of Probiotics (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*) in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Vaccinated and Challenged with *Streptococcus agalactiae*.” *Fishes* 7(4). doi: <https://doi.org/10.3390/fishes7040211>.
- Gullian, Mariel, Fabiano Thompson, and Jenny Rodriguez. 2004. “Selection of Probiotic Bacteria and Study of Their Immunostimulatory Effect in *Penaeus vannamei*.” *Aquaculture* 233(1–4):1–14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.09.013.
- Hancz, Csaba. 2022. “Application of Probiotics for Environmentally Friendly and Sustainable Aquaculture: A Review.” *Sustainability* 14(22):15479. doi: 10.3390/su142215479.
- Hargreaves, John A. 2013. “Biofloc Production Systems for Aquaculture.” (4503):1–12.
- Hendam, Basma M., Mohammad Bodrul Munir, Moaheda E. H. Eissa, Ehab El-Haroun, Hien van Doan, Thian Hai Chung, and El-Sayed Hemdan Eissa. 2023. “Effects of Water Additive Probiotic, *Pediococcus acidilactici* on Growth Performance, Feed Utilization, Hematology, Gene Expression and Disease Resistance against *Aspergillus flavus* of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).” *Animal Feed Science and Technology* 303:115696. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2023.115696.
- Holanda, Mariana, Camila Besold, Ferran Llario Sempere, Paulo César Abreu, and Luis Poersch. 2021. “Treatment of Effluents from Marine Shrimp Culture with Biofloc Technology: Production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanobacteria) and Nutrient Removal.” *Journal of the World Aquaculture Society* (June):jwas.12840. doi: 10.1111/jwas.12840.
- Holt, Corey C., David Bass, Grant D. Stentiford, and Mark van der Giezen. 2021. “Understanding the Role of the Shrimp Gut Microbiome in Health and Disease.” *Journal of Invertebrate Pathology* 186:107387. doi: 10.1016/j.jip.2020.107387.
- Hostins, Bárbara, Gabriele Lara, Olivier Decamp, Dionéia E. Cesar, and Wilson Wasielesky. 2017. “Efficacy and Variations in Bacterial Density in the Gut of *Litopenaeus vannamei* Reared in a BFT System and in Clear Water Supplemented with a Commercial Probiotic Mixture.” *Aquaculture* 480:58–64. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.036.
- Hostins, Barbara, Wilson Wasielesky, Olivier Decamp, Peter Bossier, and Peter De Schryver. 2019. “Managing Input C/N Ratio to Reduce the Risk of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) Outbreaks in Biofloc Systems – A Laboratory Study.” *Aquaculture* 508(April):60–65. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.04.055.
- Hu, Xiaojuan, Yucheng Cao, Guoliang Wen, Xiaoyang Zhang, Yu Xu, Wujie Xu, Yunna Xu, and Zhuojia Li. 2017. “Effect of Combined Use of *Bacillus* and

- Molasses on Microbial Communities in Shrimp Cultural Enclosure Systems.” *Aquaculture Research* 48(6):2691–2705. doi: 10.1111/are.13101.
- Huang, Zhijian, Shenzheng Zeng, Jinbo Xiong, Dongwei Hou, Renjun Zhou, Chengguang Xing, Dongdong Wei, Xisha Deng, Lingfei Yu, Hao Wang, Zhixuan Deng, Shaoping Weng, Satapornvanit Kriengkrai, Daliang Ning, Jizhong Zhou, and Jianguo He. 2020. “Microecological Koch’s Postulates Reveal That Intestinal Microbiota Dysbiosis Contributes to Shrimp White Feces Syndrome.” *Microbiome* 8(1):32. doi: 10.1186/s40168-020-00802-3.
- Huerta-Rábago, José Alberto, Marcel Martínez-Porchas, Anselmo Miranda-Baeza, Mario Nieves-Soto, Martha Elisa Rivas-Vega, and Luis Rafael Martínez-Córdova. 2019. “Addition of Commercial Probiotic in a Biofloc Shrimp Farm of *Litopenaeus vannamei* during the Nursery Phase: Effect on Bacterial Diversity Using Massive Sequencing 16S rRNA.” *Aquaculture* 502:391–99. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.12.055.
- Huyghebaert, Gerard, Richard Ducatelle, and Filip Van Immerseel. 2011. “An Update on Alternatives to Antimicrobial Growth Promoters for Broilers.” *Veterinary Journal* 187(2):182–88. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.03.003.
- Ichijo, Tomoaki, Nobuyasu Yamaguchi, Katsuji Tani, and Masao Nasu. 2010. “Oligonucleotide Probes for Phylogenetic Detection of Waterborne Bacteria.” *Journal of Health Science* 56(3):321–25. doi: 10.1248/jhs.56.321.
- Jastaniah, Samyah D., Bothaina A. Alaidaroos, Manal E. Shafi, Rabab M. Aljarari, Yasmin M. Abd El-Aziz, Mohammad Bodrul Munir, Moaheda E. H. Eissa, Ammar AL-Farga, El-Sayed Hemdan Eissa, and Radwa M. Said. 2023. “Dietary *Pediococcus acidilactici* Improved the Growth Performance, Feed Utilization, Gut Microbiota, and Disease Resistance against *Fusarium solani* in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*.” *Aquaculture International* (0123456789). doi: 10.1007/s10499-023-01318-x.
- Jory, Darryl E., Tomás R. Cabrera, Durwood M. Dugger, Daniel Fegan, Phillip G. Lee, L. Lawrence, Christopher J. Jackson, Robins P. McIntosh, Julio Castañeda, Biocepts International, Hboi Aquaculture Park, N. Old Dixie Hwy, and Ft Pierce. 2001. “A Global Review of Shrimp Feed Management : Status and Perspectives.” *Aquaculture* 104–52.
- Ju, Zhi Yong, Ian Forster, Lytha Conquest, Warren Dominy, Wenhao Cedric Kuo, and Floyd David Horgen. 2008. “Determination of Microbial Community Structures of Shrimp Floc Cultures by Biomarkers and Analysis of Floc Amino Acid Profiles.” *Aquaculture Research* 39(2):118–33. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x.
- Kesarcodi-Watson, Aditya, Heinrich Kaspar, M. Josie Lategan, and Lewis Gibson. 2008. “Probiotics in Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms of Action and Screening Processes.” *Aquaculture* 274(1):1–14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.
- Kesselring, Jutta C., Christina Gruber, Benedict Standen, and Silvia Wein. 2019. “Continuous and Pulse-Feeding Application of Multispecies Probiotic Bacteria in Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*.” *Journal of the World Aquaculture Society* 50(6):1123–32. doi: 10.1111/jwas.12640.
- Keysami, Mehran Avakh, and Masoumeh Mohammadpour. 2013. “Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila* Infection Resistance in Juvenile Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man).” *Aquaculture International* 21(3):553–62. doi: 10.1007/s10499-012-9588-3.
- Khanjani, Mohammad Hossein, Alireza Mohammadi, and Maurício Gustavo Coelho Emerenciano. 2022. “Microorganisms in Biofloc Aquaculture System.”

- Aquaculture Reports* 26(May):101300. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101300.
- Khanjani, Mohammad Hossein, Moslem Shari, and Coelho Emerenciano. 2024. "Review Article Bio Floc Technology (BFT) in Aquaculture : What Goes Right , What Goes Wrong ? A Scientific-Based Snapshot." 2024.
- Klaenhammer, Todd R. 1993. "Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews* 12(1–3):39–85. doi: 10.1016/0168-6445(93)90057-G.
- Knipe, Hazel, Ben Temperton, Anke Lange, David Bass, and Charles R. Tyler. 2021. "Probiotics and Competitive Exclusion of Pathogens in Shrimp Aquaculture." *Reviews in Aquaculture* 13(1):324–52. doi: 10.1111/raq.12477.
- Kongnum, Khanitta, and Tipparat Hongpattarakere. 2012. "Effect of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Digestive Tract of Wild Shrimp on Growth and Survival of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Challenged with *Vibrio harveyi*." *Fish and Shellfish Immunology* 32(1):170–77. doi: 10.1016/j.fsi.2011.11.008.
- Krummenauer, Dariano, Silvio Peixoto, Ronaldo Oliveira Cavalli, Luis Henrique Poersch, and Wilson Wasielesky. 2011. "Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities." *Journal of the World Aquaculture Society* 42(5):726–33. doi: 10.1111/j.1749-7345.2011.00507.x.
- Krummenauer, Dariano, Tzachi Samocha, Luis Poersch, Gabriele Lara, and Wilson Wasielesky. 2014. "The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* , in BFT System." *Journal of the World Aquaculture Society* 45(1):3–14. doi: 10.1111/jwas.12093.
- Kuhn, David D., Addison L. Lawrence, Gregory D. Boardman, Susmita Patnaik, Lori Marsh, and George J. Flick. 2010. "Evaluation of Two Types of Bioflocs Derived from Biological Treatment of Fish Effluent as Feed Ingredients for Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *Aquaculture* 303(1–4):28–33. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.03.001.
- Kumar, Vikash, Suvra Roy, Dharmendra Kumar Meena, and Uttam Kumar Sarkar. 2016. "Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration." *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture* 24(4):342–68. doi: 10.1080/23308249.2016.1193841.
- Kyselková, Martina, Jan Kopecký, Michele Frapolli, Geneviève Défago, Markéta Ságová-Marečková, Geneviève L. Grundmann, and Yvan Moëgne-Loccoz. 2009. "Comparison of Rhizobacterial Community Composition in Soil Suppressive or Conducive to Tobacco Black Root Rot Disease." *The ISME Journal* 3(10):1127–38. doi: 10.1038/ismej.2009.61.
- Lalloo, R., S. Ramchuran, D. Ramduth, J. Görgens, and N. Gardiner. 2007. "Isolation and Selection of *Bacillus spp.* as Potential Biological Agents for Enhancement of Water Quality in Culture of Ornamental Fish." *Journal of Applied Microbiology* 103(5):1471–79. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x.
- Lara, Gabriele Rodrigues, Luís Henrique Poersch, and Wilson Wasielesky. 2021. "The Quantity of Artificial Substrates Influences the Nitrogen Cycle in the Biofloc Culture System of *Litopenaeus vannamei*." *Aquacultural Engineering* 94(February):102171. doi: 10.1016/j.aquaeng.2021.102171.
- Lin, Yong-Chin, and Jiann-Chu Chen. 2003. "Acute Toxicity of Nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles at Different Salinity Levels." *Aquaculture* 224(1–4):193–201. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00220-5.
- Lin, Yong Chin, and Jiann Chu Chen. 2001. "Acute Toxicity of Ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone Juveniles at Different Salinity Levels." *Journal of*

- Experimental Marine Biology and Ecology* 259(1):109–19. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00227-1.
- Llario, Falco, Sebastián-Frasquet, Escrivá, Rodilla, and Poersch. 2019. “The Role of *Bacillus Amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* During the Maturation of a Biofloc System.” *Journal of Marine Science and Engineering* 7(7):228. doi: 10.3390/jmse7070228.
- Luis-Villaseñor, Irasema E., Ángel I. Campa-Córdova, Nolberta Huerta-Aldaz, Antonio Luna-González, José M. Mazón-Suástegui, and Francisco Flores-Higuera. 2013. “Effect of Beneficial Bacteria on Larval Culture of Pacific Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*.” *African Journal of Microbiology Research* 7(27):3471–78. doi: 10.5897/AJMR12.1360.
- Luis-Villaseñor, Irasema E., Domenico Voltolina, Juan M. Audelo-Naranjo, María R. Pacheco-Marges, Víctor E. Herrera-Espericueta, and Emilio Romero-Beltrán. 2015. “Effects of Biofloc Promotion on Water Quality, Growth, Biomass Yield and Heterotrophic Community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Experimental Intensive Culture.” *Italian Journal of Animal Science* 14(3):332–37. doi: 10.4081/ijas.2015.3726.
- Martins, Tatiana G., Clarisse Odebrecht, Luciano V. Jensen, Marcelo Gm D’Oca, and Wilson Wasielesky. 2016. “The Contribution of Diatoms to Bioflocs Lipid Content and the Performance of Juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT Culture System.” *Aquaculture Research* 47(4):1315–26. doi: 10.1111/are.12592.
- Meier, Harald, Rudolf Amann, Wolfgang Ludwig, and Karl Heinz Schleifer. 1999. “Specific Oligonucleotide Probes for in Situ Detection of a Major Group of Gram-Positive Bacteria with Low DNA G+C Content.” *Systematic and Applied Microbiology* 22(2):186–96. doi: 10.1016/S0723-2020(99)80065-4.
- Merrifield, D. L., G. Bradley, G. M. Harper, R. T. M. Baker, C. B. Munn, and S. J. Davies. 2011. “Assessment of the Effects of Vegetative and Lyophilized *Pediococcus acidilactici* on Growth, Feed Utilization, Intestinal Colonization and Health Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*).” *Aquaculture Nutrition* 17(1):73–79. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x.
- Miranda-Baeza, Anselmo, Mariela Nolasco-López, Martha Elisa Rivas-Vega, José Alberto Huerta-Rábago, Luis Rafael Martínez-Córdova, and Marcel Martínez-Porchas. 2020. “Short-term Effect of the Inoculation of Probiotics in Mature Bioflocs: Water Quality Parameters and Abundance of Heterotrophic and Ammonia-oxidizing Bacteria.” *Aquaculture Research* 51(1):255–64. doi: 10.1111/are.14371.
- Mohapatra, S., T. Chakraborty, A. K. Prusty, P. Das, K. Paniprasad, and K. N. Mohanta. 2012. “Use of Different Microbial Probiotics in the Diet of Rohu, *Labeo rohita* Fingerlings: Effects on Growth, Nutrient Digestibility and Retention, Digestive Enzyme Activities and Intestinal Microflora.” *Aquaculture Nutrition* 18(1):1–11. doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00866.x.
- Moriarty, D. J. W. 1998. “Control of Luminous *Vibrio* Species in Penaeid Aquaculture Ponds.” *Aquaculture* 164(1–4):351–58. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00199-9.
- Moriarty, David J. W. 1997. “The Role of Microorganisms in Aquaculture Ponds.” *Aquaculture* 151(1–4):333–49. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01487-1.
- Nayak, Sukanta K. 2021. “Multifaceted Applications of Probiotic *Bacillus* Species in Aquaculture with Special Reference to *Bacillus subtilis*.” *Reviews in Aquaculture* 13(2):862–906.
- Nguyen Thi Truc, Linh, Tuu Nguyen Thanh, To Tran Thi Hong, Day Pham Van, Minh Vo Thi Tuyet, Nghia Nguyen Trong, Minh Phan Cong, Diep Cao Ngoc, and Phu

- Truong Quoc. 2021. "Effects of Feed Mixed with Lactic Acid Bacteria and Carbon, Nitrogen, Phosphorus Supplied to the Water on the Growth and Survival Rate of White Leg Shrimp (*Penaeus vannamei*) Infected with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Caused by *Vibrio parahaemolyticus*." *Biology* 10(4):280. doi: 10.3390/biology10040280.
- Ninawe, A. S., and Joseph Selvin. 2009. "Probiotics in Shrimp Aquaculture: Avenues and Challenges." *Critical Reviews in Microbiology* 35(1):43–66. doi: 10.1080/10408410802667202.
- Pandiyan, Priyadarshini, Deivasigamani Balaraman, Rajasekar Thirunavukkarasu, Edward Gnana Jothi George, Kumaran Subaramanian, Sakthivel Manikkam, and Balamurugan Sadayappan. 2013. "Probiotics in Aquaculture." *Drug Invention Today* 5(1):55–59. doi: 10.1016/j.dit.2013.03.003.
- Panigrahi, A., R. R. Das, M. R. Sivakumar, A. Saravanan, C. Saranya, N. S. Sudheer, K. P. Kumaraguru Vasagam, P. Mahalakshmi, S. Kannappan, and G. Gopikrishna. 2020. "Bio-Augmentation of Heterotrophic Bacteria in Biofloc System Improves Growth, Survival, and Immunity of Indian White Shrimp *Penaeus indicus*." *Fish & Shellfish Immunology* 98:477–87. doi: 10.1016/j.fsi.2020.01.021.
- Ponce-Palafox, Jesus, Carlos A. Martinez-Palacios, and Lindsay G. Ross. 1997. "The Effects of Salinity and Temperature on the Growth and Survival Rates of Juvenile White Shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931." *Aquaculture* 157(1–2):107–15. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00148-8.
- Ramu, Dhanasekar, Santhosh Sigamani, Hemalatha Venkatachalam, Panneerselvam Bommannan, and Dhandapani Ramamurthy. 2017. "The Role of Probiotics in the Control of Bacterial Diseases and Biodegradation of Organic Matter in Shrimp (*Penaeus vannamei*) Culture Ponds of South India." *Journal of Coastal Life Medicine* 5(7):293–98. doi: 10.12980/jclm.5.2017J7-32.
- Ray, Andrew J., Gloria Seaborn, John W. Leffler, Susan B. Wilde, Alisha Lawson, and Craig L. Browdy. 2010. "Characterization of Microbial Communities in Minimal-Exchange, Intensive Aquaculture Systems and the Effects of Suspended Solids Management." *Aquaculture* 310(1–2):130–38. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.10.019.
- Reis, Wellica G., Wilson Wasielesky, Paulo C. Abreu, Hellyjúnior Brandão, and Dariano Krummenauer. 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(April):19–29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.04.067.
- Rengpipat, Sirirat, Wannipa Phianphak, Somkiat Piyatiratitivorakul, and Piamsak Menasveta. 1998. "Effects of a Probiotic Bacterium on Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Survival and Growth." *Aquaculture* 167(3–4):301–13. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00305-6.
- Salzman, Nita H., Hendrik de Jong, Yvonne Paterson, Hermie J. M. Harmsen, Gjalte W. Welling, and Nicolaas A. Bos. 2002. "Analysis of 16S Libraries of Mouse Gastrointestinal Microflora Reveals a Large New Group of Mouse Intestinal Bacteria" *Microbiology* 148(11):3651–60. doi: 10.1099/00221287-148-11-3651.
- De Schryver, P., R. Crab, T. Defoirdt, N. Boon, and W. Verstraete. 2008. "The Basics of Bio-Flocs Technology: The Added Value for Aquaculture." *Aquaculture* 277(3–4):125–37. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.02.019.
- De Souza, Diego Moreira, Sabrina Medeiros Suita, Fabio Pereira Leivas Leite, Luis Alberto Romano, Wilson Wasielesky, and Eduardo Luis Cupertino Ballester. 2012. "The Use of Probiotics during the Nursery Rearing of the Pink Shrimp

- Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a Zero Exchange System.” *Aquaculture Research* 43(12):1828–37. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02992.x.
- Strickland, J. D. H., and T. R. Parsons. 1972. “A Practical Handbook of Seawater Analysis.” *Bulletin Fisheries Research Board of Canada* 167(2nd edition). doi: 10.25607/OBP-1791.
- Das Susmita, Mondal Kausik, and Salma Haque. 2017. “A Review on Application of Probiotic, Prebiotic and Synbiotic for Sustainable Development of Aquaculture.” *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(2):422–29.
- Tanaka, Reiji, Hiroyuki Mitsuya, Mizuki Aoki, Taeko Miyazaki, Masashi Ootsubo, and Peter Bossier. 2016. “In Situ Enumeration and Localization of the Probiotic *Pediococcus* Sp. Strain Ab1 in the Gut of Abalone *Haliotis Gigantea*.” *Fisheries Science* 82(3):481–89. doi: 10.1007/s12562-016-0981-0.
- Timmerman, H. M., C. J. M. Koning, L. Mulder, F. M. Rombouts, and A. C. Beynen. 2004. “Monostrain, Multistrain and Multispecies Probiotics—A Comparison of Functionality and Efficacy.” *International Journal of Food Microbiology* 96(3):219–33. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012.
- UNESCO. 1983. *Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring*. Paris, France.
- Utermöhl, Hans. 1958. “Zur Vervollkommnung Der Quantitativen Phytoplankton-Methodik.” *Internationale Vereinigung Für Theoretische Und Angewandte Limnologie: Mitteilungen* 9(1):1–38. doi: 10.1080/05384680.1958.11904091.
- Verschuere, Laurent, Geert Rombaut, Patrick Sorgeloos, and Willy Verstraete. 2000. “Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4):655–71.
- Wang, Jiajing, Zhenchao Wu, Seng Wang, Xin Wang, Dongming Zhang, Qiuju Wang, Lili Lin, Guiqin Wang, Zhixin Guo, and Yuke Chen. 2022. “Inhibitory Effect of Probiotic *Bacillus* spp. Isolated from the Digestive Tract of *Rhynchocypris lagowskii* on the Adhesion of Common Pathogenic Bacteria in the Intestinal Model.” *Microbial Pathogenesis* 169:105623. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105623>.
- Wasielesky, Wilson, Heidi Atwood, Al Stokes, and Craig L. Browdy. 2006. “Effect of Natural Production in a Zero Exchange Suspended Microbial Floc Based Super-Intensive Culture System for White Shrimp *Litopenaeus vannamei*.” *Aquaculture* 258(1–4):396–403. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.030.
- Wasielesky, Wilson, Aline Bezerra, Luis Poersch, Flávia Banderó Hoffling, and Dariano Krummenauer. 2020. “Effect of Feeding Frequency on the White Shrimp *Litopenaeus vannamei* during the Pilot-scale Nursery Phase of a Superintensive Culture in a Biofloc System.” *Journal of the World Aquaculture Society* 51(5):1175–91. doi: 10.1111/jwas.12694.
- Wasielesky, Wilson, Charles Froes, Geraldo Fóes, Dariano Krummenauer, Gabriele Lara, and Luis Poersch. 2013. “Nursery of *Litopenaeus vannamei* Reared in a Biofloc System: The Effect of Stocking Densities and Compensatory Growth.” *Journal of Shellfish Research* 32(3):799–806. doi: 10.2983/035.032.0323.
- Wee, Wendy, Noor Khalidah Abdul Hamid, Khairiyah Mat, Raja Ili Airina Raja Khalif, Nor Dini Rusli, Mohammad Mijanur Rahman, Muhammad Anamul Kabir, and Lee Seong Wei. 2024. “The Effects of Mixed Prebiotics in Aquaculture: A Review.” *Aquaculture and Fisheries* 9(1):28–34. doi: 10.1016/j.aaf.2022.02.005.
- Widanarni, Deby Yuniasari, Sukenda, and Julie Ekasari. 2010. “Nursery Culture Performance of *Litopenaeus vannamei* with Probiotics Addition and Different C/N Ratio Under Laboratory Condition.” *HAYATI Journal of Biosciences* 17(3):115–

19. doi: 10.4308/hjb.17.3.115.
- Won, Seonghun, Ali Hamidoghli, Wonsuk Choi, Jinho Bae, Won Je Jang, Seunghan Lee, and Sungchul C. Bai. 2020. "Evaluation of Potential Probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *Microorganisms* 8(2):281. doi: 10.3390/microorganisms8020281.
- Wyk, Peter Van, and John Scarpa. 1999. "Water Quality Requirements and Management." *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems, Florida* 141–62.
- Yokokawa, Taichi, and Toshi Nagata. 2005. "Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments." *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):6799–6807. doi: 10.1128/AEM.71.11.6799-6807.2005.
- Zan, Zhongjie, Kun Chen, Haoyi Wang, Zhuoran Han, and Jingfeng Sun. 2023. "Effects of a Multistrain Probiotic on the Growth, Immune Function and Intestinal Microbiota of the Tongue Sole *Cynoglossus semilaevis*." *Aquaculture* 575:739813. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739813>.
- Zar, Jerrold H. 1999. "Biostatistical Analysis." *Pearson Education India*.
- Zokaeifar, Hadi, José Luis Balcázar, Che Roos Saad, Mohd Salleh Kamarudin, Kamaruzaman Sijam, Aziz Arshad, and Naghmeh Nejat. 2012. "Effects of *Bacillus subtilis* on the Growth Performance, Digestive Enzymes, Immune Gene Expression and Disease Resistance of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*." *Fish and Shellfish Immunology* 33(4):683–89. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.027.

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO ENTRE ENGORDA SEMI-INTENSIVA E SUPERINTENSIVA DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Penaeus vannamei*: AVALIAÇÃO DO USO DE MIX PROBIÓTICO NOS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Artigo submetido a revista *Boletim do Instituto de Pesca*

Resumo

Os probióticos têm se destacado como uma estratégia sustentável para otimizar o desempenho zootécnico dos camarões e melhor manejo da qualidade de água. São microrganismos amplamente reconhecidos por seus efeitos benéficos sobre o hospedeiro. O presente trabalho possui duas fases de engorda, semi-intensiva (20 cam m⁻²) e superintensiva (300 cam m⁻²), ambas com duração de 63 dias. Foram testados mix de bactérias probióticas comercial composto por *Bacillus subtilis* (3,4x10⁹ UFC g⁻¹), *Lactobacillus plantarum* (1,2x10⁹ UFC g⁻¹) e *Pediococcus acidilactici* (1,2x10⁹ UFC g⁻¹). Os tratamentos consistem em Engorda 1 com PROB (adição de probióticos) e CTL (sem adição de probióticos), os tratamentos na Engorda 2 são diferentes vias de aplicação dos probióticos em sistema de água clara (AC-CTL, AC-PR, AC-PA, AC-PRA) e BFT (BFT-CTL, BFT-PR, BFT-PA, BFT-PRA). Resultados encontrados no experimento de engorda semi-intensiva para qualidade da água foram estatisticamente iguais para todos os parâmetros avaliados e mantiveram-se dentro dos níveis recomendados para a espécie. Houve diferença significativa para todos os parâmetros zootécnicos quando adicionados probióticos em comparação com grupo controle (sem adição de probióticos). Foram observadas diferenças na comunidade microbiana e na abundância bacteriana, onde foram encontrados maior diversidade de microrganismos com a adição de probióticos e colonização do trato intestinal pelas bactérias probióticas. Na engorda superintensiva foram encontradas diferenças para dados avaliados na qualidade de água, como pH, nitrito, nitrato, sólidos suspensos totais e turbidez. Valores encontrados para o desempenho zootécnico são superiores quando os probióticos são adicionados na água e na ração em sistema de bioflocos, foram encontrados maior diversidade de microrganismos e abundância bacteriana no sistema de bioflocos quando comparado ao sistema de água clara, porém no tratamento com adição dos probióticos em duas vias em água clara houve comportamento similar ao tratamento controle em sistema BFT. Foram encontrados diferentes microrganismos e maior abundância bacteriana em todos os tratamentos com bioflocos e capacidade de colonização do trato intestinal dos camarões

pelas bactérias probióticas utilizadas. As principais conclusões são a capacidade de melhora no desempenho zootécnico, manutenção da qualidade da água, aumento da diversidade de microrganismos e bactérias na água e no intestino dos camarões.

Abstract

Probiotics have emerged as a sustainable strategy to optimize the zootechnical performance of shrimp and to improve water quality management. These microorganisms are widely recognized for their beneficial effects on the host. The present study consisted of two grow-out phases: semi-intensive (20 shrimp m⁻²) and super-intensive (300 shrimp m⁻²), each lasting 63 days. A commercial probiotic mix comprising *Bacillus subtilis* (3.4×10⁹ CFU g⁻¹), *Lactobacillus plantarum* (1.2×10⁹ CFU g⁻¹), and *Pediococcus acidilactici* (1.2×10⁹ CFU g⁻¹) was tested. The treatments included Grow-out 1 with PROB (probiotic addition) and CTL (without probiotic addition), and treatments in Grow-out 2 evaluated different probiotic application methods in clear-water (AC-CTL, AC-PR, AC-PA, AC-PRA) and biofloc systems (BFT-CTL, BFT-PR, BFT-PA, BFT-PRA). The results from the semi-intensive grow-out experiment showed that water quality parameters were statistically similar across all treatments and remained within recommended levels for the species. Significant differences were observed for all zootechnical parameters, with probiotics improving performance compared to the control group (without probiotics). Differences were also observed in the microbial community and bacterial abundance, with a greater diversity of microorganisms and intestinal colonization by probiotic bacteria in treatments with probiotic addition. In the super-intensive grow-out experiment, significant differences were observed in water quality parameters, including pH, nitrite, nitrate, total suspended solids, and turbidity. Zootechnical performance was superior when probiotics were added to both water and feed in the biofloc system. A higher diversity of microorganisms and bacterial abundance was observed in the biofloc system compared to the clear-water system. However, the treatment with dual-route probiotic application in clear water showed a similar performance to the control treatment in the BFT system. Probiotic treatments across all biofloc systems demonstrated greater microbial diversity, bacterial abundance, and colonization of shrimp intestines by probiotic bacteria. The main conclusions highlight the ability of probiotics to improve zootechnical performance, maintain water quality, increase microbial diversity, and enhance bacterial abundance in water and shrimp intestines.

Introdução

A intensificação da aquicultura é impulsionada por uma crescente procura global por proteína animal aquática, levando a inovações que podem aumentar a produção e, ao mesmo tempo, reduzir os impactos ambientais (Wee et al., 2024). As vantagens da produção do *Penaeus vannamei*, sendo a espécie mais cultivada em todo o mundo são o seu alto valor de mercado, conversão alimentar eficiente e adaptabilidade a várias condições de criação, incluindo sistemas de alta densidade (Valenti et al., 2021). Os sistemas de aquicultura superintensivos, projetados para maximizar a produção de camarão em um espaço limitado, enfrentam desafios operacionais significativos, principalmente relacionados à proliferação de doenças, ao manejo da qualidade da água e à necessidade de práticas sustentáveis para evitar a degradação ambiental (Mohapatra et al., 2013; Ray et al., 2011; Verschuere et al., 2000).

Historicamente, os antibióticos foram amplamente utilizados na aquicultura para combater doenças infecciosas na tentativa de manter a saúde do camarão, mas as consequências não intencionais da resistência antimicrobiana e da contaminação ambiental levaram a restrições regulatórias e a um impulso para estratégias alternativas de gestão da saúde (Pereira et al., 2022; Resende et al., 2017). Isso levou a um interesse crescente em probióticos como uma solução promissora e ecologicamente correta para melhorar a saúde e a produtividade do camarão sem comprometer a integridade ambiental (Moriarty, 1998, 1997). O conceito de probióticos, definido como suplementos microbianos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, tem sido amplamente aplicado em várias criações de animais e agora está ganhando força na aquicultura (Verschuere et al., 2000).

Especificamente, os probióticos na aquicultura demonstraram potencial para regular a comunidade microbiana no trato gastrointestinal do camarão, melhorar a conversão alimentar e aumentar as respostas imunológicas, tornando-os uma alternativa viável aos tratamentos químicos tradicionais (Deng et al., 2022; Kumar et al., 2023; Zhu et al., 2023). Os probióticos oferecem vários mecanismos pelos quais contribuem para sistemas de aquicultura mais saudáveis e produtivos, podem competir diretamente com bactérias patogênicas por nutrientes e locais de colonização, reduzindo assim a incidência de surtos de doenças (Al-Dohail et al., 2011; Riquelme et al., 1996). Este efeito de exclusão competitiva é particularmente valioso em sistemas superintensivos onde a pressão de doenças é alta devido às altas densidades de estocagem dos camarões em áreas

reduzidas (Knipe et al., 2021; Wasielesky et al., 2013). Além disso, muitas cepas probióticas produzem compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, que inibem o crescimento de bactérias nocivas e estabilizam o ambiente microbiano dentro do sistema de cultivo de camarões (Abriouel et al., 2011; Huyghebaert et al., 2011; Sahoo et al., 2016).

Cepas de *Bacillus sp* e algumas bactérias ácido lácticas como *Lactobacillus sp* e *Pediococcus sp* podem ativar a produção de enzimas relacionadas ao sistema imunológico e moléculas de sinalização dentro do organismo dos camarões, fornecendo uma camada adicional de prevenção de doenças (Kesselring et al., 2019; Pillinger et al., 2022). A seleção cuidadosa das cepas probióticas é crucial para garantir sua segurança e eficácia, sendo assim, os efeitos dos probióticos podem variar dependendo da espécie de animal cultivado, da cepa probiótica, da dose, da via de administração e das condições de cultivo (Sha et al., 2016; van Hai and Fotedar, 2010; Wang et al., 2022).

Em sistemas de bioflocos, os probióticos fornecem uma camada adicional de benefícios ambientais ao contribuir para a manutenção da qualidade da água e melhora nas condições de saúde dos animais (Krummenauer et al., 2014a). A tecnologia de bioflocos envolve o uso de comunidades microbianas para reciclar nutrientes dentro do sistema, reduzindo assim a necessidade de troca de água e minimizando a produção de resíduos (Wasielesky et al., 2006). Os probióticos introduzidos em sistemas de produção com bioflocos melhoram esses processos microbianos, auxiliando na degradação da matéria orgânica e na conversão de metabólitos prejudiciais, como amônia e nitrito, em formas menos tóxicas, o que proporciona um ambiente de criação mais saudável para o camarão (Arias-Moscoso et al., 2018; Llarío et al., 2019). Ao promover uma comunidade microbiana equilibrada e benéfica, os probióticos ajudam a mitigar o risco de dominância de patógenos e a criar um ecossistema de aquicultura mais estável (Kasan et al., 2017).

Em geral, os probióticos podem ser aplicados diretamente na água, incorporados à ração ou administrados por meio de uma combinação de ambas as abordagens e cada método tem vantagens e limitações distintas, muitas vezes influenciadas por fatores como a qualidade da água, a idade dos animais, dimensões dos sistemas de produção dos camarões e as cepas probióticas específicas utilizadas (Kumar et al., 2016). Por exemplo, as aplicações probióticas diretamente na água são benéficas para efeitos ambientais imediatos, pois podem afetar diretamente o equilíbrio microbiano dentro do sistema de produção, auxiliando na melhoria da qualidade da água e no controle de biorremediação (Brito et al., 2016). Entretanto, a eficácia das aplicações diretamente na água pode ser

afetada por fatores ambientais como pH e temperatura, que podem alterar a viabilidade das bactérias probióticas (Adilah et al., 2022).

Por outro lado, as aplicações de probióticos com base na ração oferecem a vantagem de fornecer probióticos diretamente ao trato gastrointestinal do camarão, o que pode ser especialmente benéfico para a modulação imunológica e a absorção de nutrientes (Das Susmita and Haque, 2017). Pesquisas indicam que os probióticos administrados por meio da ração são mais adequados para estabelecer uma microbiota intestinal estável e benéfica, o que é fundamental para a saúde e o desempenho do crescimento do camarão em longo prazo (Kumar et al., 2016; Nayak, 2021). Entretanto, as aplicações baseadas em ração exigem uma formulação cuidadosa para garantir a viabilidade dos probióticos durante o processamento e o armazenamento da ração (Hancz, 2022). Além disso, estudos demonstraram que uma combinação de aplicações na água e na ração pode produzir efeitos sinérgicos, pois aborda simultaneamente os ambientes microbianos internos e externos, essa abordagem dupla foi associada a maiores taxas de sobrevivência, melhores métricas de crescimento e controle mais eficaz de patógenos em sistemas de aquicultura superintensivos (He et al., 2023; Ringø, 2020).

Objetivo Geral

Avaliar a eficiência do uso do probiótico mix comercial no cultivo superintensivo e semi-intensivo no cultivo do *Penaeus vannamei* na fase de engorda em diferentes sistemas e as interações com a qualidade da água, desempenho zootécnico, comunidade microbiana e abundância bacteriana.

Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do mix probiótico comercial na fase de engorda em sistema semi-intensivo em água clara na qualidade da água, desempenho zootécnico, composição da comunidade microbiana, composição e abundância bacteriana na água e intestino dos camarões.
- Avaliar a influência do mix probiótico comercial na fase de engorda em sistema superintensivo em água clara e BFT na qualidade da água, desempenho zootécnico, composição da comunidade microbiana, composição e abundância bacteriana na água e intestino dos camarões.

Material e Métodos

Condições experimentais

Os experimentos foram realizados na Estação Marinha de Aquicultura, do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, Brasil (32°110S; 52°100W). O primeiro experimento (Engorda 1 semi-intensiva) e o segundo experimento (Engorda 2 superintensiva) ambos tiveram duração de 63 dias (9 semanas). Camarões da espécie *Penaeus vannamei*, provenientes da Aquatec® (Rio Grande do Norte), foram obtidos em estágio de náuplio e passaram pela fase da larvicultura e berçário no Laboratório de Carcinocultura - FURG. Após esse período, as pós-larvas foram estocadas nas unidades experimentais de acordo com o design experimental de cada experimento. Ambos os experimentos foram realizados em uma sala experimental com controle de temperatura e fotoperíodo. Para controle de temperatura foram utilizados aquecedores de água submersos com termostatos (Stealth, ETP250, USA, 250W). O controle de luminosidade foi feito com temporizador analógico de luz, mantendo em 12 horas de escuro e 12h de claridade. O sistema de aeração era composto por soprador tipo *blower*, onde o oxigênio atmosférico era distribuído em cada unidade experimental através de duas mangueiras microperfuradas (Aerotubes®) de 30 cm. Os tanques foram preenchidos com água salgada (salinidade 30). Para desinfecção inicial da água, aplicou-se uma solução de hipoclorito de sódio (10ppm) e posterior aplicação de ácido ascórbico (1ppm) para neutralização dos resíduos de hipoclorito de sódio.

Delineamento experimental 1 (Engorda Semi-intensiva)

Foram estocados camarões com peso médio inicial de 0,54g ($\pm 0,20$), a densidade de estocagem de 20 cam m⁻², somando 200 animais por tanque, totalizando 1.200 animais em todo experimento. O experimento foi realizado em triplicata, foram utilizados seis (6) tanques de 5.000L de volume útil, com área de fundo de 10m⁻², sendo três tanques para cada tratamento. Os tratamentos foram distribuídos da seguinte maneira:

- **PROB** (Probióticos - adição probióticos na ração e na água);
- **CTL** (Controle - sem adição de probióticos).

A engorda semi-intensiva foi mantida em água clara durante todo período experimental, foram feitas renovações de 50% (2500L) 3 vezes por semana ou de acordo

com as concentrações de amônia e nitrito, simulando condições de cultivos semi-intensivos.

Delineamento experimental 2 (Engorda Superintensiva)

Foram estocados camarões com peso médio de 0,45g ($\pm 0,10$), a densidade de estocagem de 300 cam m^{-2} , somando 50 animais por tanque, totalizando 1.200 animais em todo experimento. O experimento foi realizado em triplicata, foram utilizados 24 (vinte e quatro) tanques de 150L de volume útil, com área de fundo de 0,49 m^{-2} . Os tratamentos foram divididos da seguinte maneira:

- Sistema água clara (AC):
 - AC-CTL (sem adição de probióticos)
 - AC-PR (adição de probióticos somente na ração)
 - AC-PA (adição de probióticos somente na água)
 - AC-PRA (adição de probióticos na ração e na água)
- Sistema de bioflocos (BFT):
 - BFT-CTL (sem adição de probióticos)
 - BFT-PR (adição de probióticos somente na ração)
 - BFT-PA (adição de probióticos somente na água)
 - BFT-PRA (adição de probióticos na ração e na água)

O sistema em água clara foi mantido com renovações de 50% (75L) 3 vezes por semana ou de acordo com as concentrações de amônia e nitrito.

No sistema de bioflocos foi utilizado inóculo de 10% (15L) de floco maduro de uma unidade de produção (concentrações de amônia e nitrito indetectáveis, nitrato (13,8 mg/l), fosfato (4,1 mg/l) e sólidos suspensos totais (438 mg/l) (Krummenauer et al., 2014b). Foram realizadas fertilizações orgânicas com melão de cana-de-açúcar de acordo com as concentrações de amônia (1 mg/l), para manter as relações C:N (6:1) (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006). Para reposição do volume por evaporação foram realizadas adições de água doce de clorada e para manutenção dos valores de pH e alcalinidade foram adicionadas doses de cal hidratada de acordo com decréscimo dos valores de pH e alcalinidade (Furtado et al., 2011).

Aplicação do mix probiótico e alimentação

O mix probiótico comercial é composto pelas seguintes bactérias e suas respectivas concentrações: *Bacillus subtilis* ($3,4 \times 10^9$ UFC g⁻¹), *Lactobacillus plantarum* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹) e *Pediococcus acidilactici* ($1,2 \times 10^9$ UFC g⁻¹). Foram aplicadas as dosagens recomendadas pelo fabricante, diariamente na ração (2g de probiótico/kg de ração) e na água foram utilizadas doses diárias de 1g/tonelada de água. Os probióticos foram misturados com água proveniente de cada unidade experimental, para serem aspergidas à ração e pipetados na água de cultivo, 5 dias da semana. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 17:00 h), utilizando ração comercial Active 40% PB (Guabi®) para fase de engorda (Jory et al., 2001).

Qualidade da água

Parâmetros como temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados duas vezes ao dia (08:00 e 17:00h) utilizando um aparelho multiparâmetro da marca YSI® modelo 556. A salinidade foi verificada semanalmente com o auxílio de um refratômetro óptico (ATC, RTP-20ATC, Brasil). Os níveis da amônia total (N-AT) e nitrito (N-NO₂-) foram analisados três vezes na semana (Strickland and Parsons, 1972; UNESCO, 1983), nitrato (N-NO₃-), fosfato (P-PO_{4.3}-) (Aminot and Chaussepied, 1983) e alcalinidade (AOAC, 2005) foram medidos semanalmente. Sólidos suspensos totais foram medidos semanalmente (Strickland and Parsons, 1972).

Desempenho Zootécnico

O crescimento dos camarões em todas as unidades experimentais foi acompanhado por meio de biometrias semanais, utilizando balança digital com precisão de 0,01g. Ao final do experimento, foram avaliados os seguintes parâmetros: conversão alimentar aparente (C.A.A.): alimento oferecido/incremento de biomassa. Ganho de peso semanal (GPS): (peso médio final – peso médio inicial) /semanas. Sobrevivência: ((n° indivíduos despescados / n° indivíduos estocados) x 100. Biomassa final: (peso médio final x n° indivíduos despescados). Produtividade: (biomassa final / volume unidade experimental).

Análise da comunidade microbiana

Foram coletadas amostras de água (20 ml) ao final do período experimental, para quantificação e classificação dos microrganismos presentes na água. As amostras foram fixadas em formalina a 4% (concentração final) e mantidas em frascos âmbar para

posterior contagem e identificação dos principais grupos de microrganismos presentes. Os microrganismos foram classificados em diferentes grupos: flagelados, ciliados, rotíferos, nematoides e microalgas, foi usado um microscópio invertido Olympus IX51 com ampliação final de 200x, no qual alíquotas de 2,1 ml de amostra foram colocadas em uma câmara de sedimentação e 30 campos foram contados aleatoriamente (Utermöhl, 1958). As contagens foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aplicados à Aquicultura (LEMAQUI) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Análise de Hibridização in situ Fluorescente (FISH)

Foram coletadas amostras finais de água de cada unidade experimental e coletados intestinos dos camarões, ambos fixados em paraformaldeído a 2% (concentração final) e estocadas sob refrigeração para posterior realização da análise de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para identificação de bactérias dos gêneros *Bacillus spp* e *Lactobacillus spp* (Tabela 1). Previamente ao início do protocolo de FISH (Cottrell and Kirchman, 2003; Del’Duca et al., 2013), amostras de intestino que foram pesadas previamente e sonificadas (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics Materials®) com amplitude de 110.7 µm por 60s (três vezes). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 500 g por cinco minutos e o sobrenadante retirado, repetindo esta etapa duas vezes com adição de água ultrapura para lavagem do conteúdo. As três porções de sobrenadante foram colocadas em um mesmo frasco, novamente centrifugadas e só então filtradas em filtros brancos de policarbonato (Nuclepore® 0,2 µm) e mantidas refrigeradas a 4° C até a realização do protocolo de hibridização. As amostras de água foram filtradas diretamente em filtros brancos de policarbonato (Nuclepore® 0,2 µm).

Posteriormente as amostras foram avaliadas através de microscopia de epifluorescência, utilizando sondas de oligonucleotídeos dirigidos ao rRNA para identificar e quantificar os grupos das bactérias alvo do estudo. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo Cy3. Sondas do mesmo grupo de bactérias foram misturadas para a hibridização. Adicionado a cada sonda específica foi usado DAPI, para determinação da abundância bacteriana total. Um controle negativo (NON) foi utilizado com uma sonda sem nenhum marcador específico para bactérias, servindo como um teste de eficiência do processo de hibridização. A abundância de bactérias foi obtida pela contagem direta com aumento de 1000x utilizando um microscópio de epifluorescência (Olympus® BX-60), equipado com os filtros: Chroma U-N41007, U-MWU2, U-MWB2

e U-MWG2, no Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos (LEBIOMM) da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

Tabela 7 - Sondas de oligonucleotídeos para identificação de diferentes grupos bacterianos usados neste estudo. Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo Cy3.

Sonda	Especificidade	Sequência (5'-3')	%FA*	Referência
NON	Controle negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	(Yokokawa and Nagata, 2005)
Bacil1	<i>Bacillus</i>	GCCGCCTTTCAATTTTCGAAC	35	(Ichijo et al., 2010)
Bmy843	<i>Bacillus</i>	CTTCAGCACTCAGGTTCG	35	(Salzman et al., 2002)
Bsub	<i>B. subtilis</i>	CGTTCAAACAACCATCCGG	35	(Kyselková et al., 2009)
BsubC	<i>B. subtilis</i> grupo	AAGCCACCTTTTATGTTTGA	35	(Kyselková et al., 2009)
Lacto15	<i>Lactobacillus</i>	CCGTCAACCCTTGAACAGTT	30	(Demanèche et al., 2008)
Lacto39	<i>Lactobacillus</i>	TCTGTTTAGTTCCGCTCGTTC	30	(Demanèche et al., 2008)
LGC354A	Firmicutes	TGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier et al., 1999)
LGC354B	Firmicutes	CGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier et al., 1999)
LGC354C	Firmicutes	CGGAAGATTCCCTACTGC	35	(Meier et al., 1999)

*Porcentagem de formamida (FA) na solução de hibridização *in situ*.

Análise estatística

Parâmetros de qualidade da água, desempenho zootécnico, abundância bacteriana, densidade total das bactérias por grupos específicos e contagem diferencial de hemócitos foram submetidos a análise de variância de uma via, levando em consideração os pressupostos de homocedasticidade e normalidade através dos testes Levene e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. O teste de Tukey foi aplicado quando diferenças significativas foram detectadas ($p < 0,05$), os dados de sobrevivência, microrganismos e densidades de bactérias foram transformados (arcoseno x 0,5) antes da análise (Zar, 1999).

Resultados Engorda 1 Semi-intensiva

Qualidade da água

Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos para todos os parâmetros de qualidade da água avaliados, como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, salinidade, amônia, nitrito, nitrato, fosfato, sólidos suspensos totais e turbidez (Tabela 2).

Tabela 8 – Parâmetros de qualidade da água (média±desvio padrão) nos tratamentos: Probióticos (PROB) e Controle (CTL) ao longo dos 63 dias de experimento em engorda semi-intensiva.

Parâmetros	PROB	CTL
Temperatura (°C)	27,41±0,43	27,32±0,18
O ₂ D (mg L ⁻¹)	6,19±0,22	6,22±0,20
pH	7,91±0,05	7,96±0,03
Amônia (N-AT mg L ⁻¹)	0,56±0,26	0,44±0,26
Nitrito (N-NO ₂ - mg L ⁻¹)	2,34±2,81	1,99±2,12
Nitrato (N-NO ₃ - mg L ⁻¹)	5,11±1,53	4,49±2,00
Fosfato (P-PO ₄ ⁻³ mg L ⁻¹)	0,63±0,10	0,62±0,07
Salinidade	30,67±1,02	30,48±1,03
Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	156,85±6,20	156,30±10,52
SST (mg L ⁻¹)	56,85±22,54	46,86±26,04
Turbidez (NTU)	11,30±2,26	9,56±2,90

Os valores médios observados variaram entre: temperatura (27,32–27,41°C), oxigênio dissolvido (6,19–6,22 mg L⁻¹) e pH (7,91–7,96). Valores médios de amônia (0,44–0,56 mg L⁻¹) (a), nitrito (1,99–2,34 mg L⁻¹) (b) e nitrato (4,49–5,11 mg L⁻¹) (c) apresentados na Figura 1. Valores de fosfato (0,62–0,63 mg L⁻¹), salinidade (30,48–30,67), alcalinidade (156,30–156,85 mg CaCO₃ L⁻¹), sólidos suspensos totais (46,86–56,85 mg L⁻¹) (a) e turbidez (9,56–11,30 NTU) (b) (Figura 2).

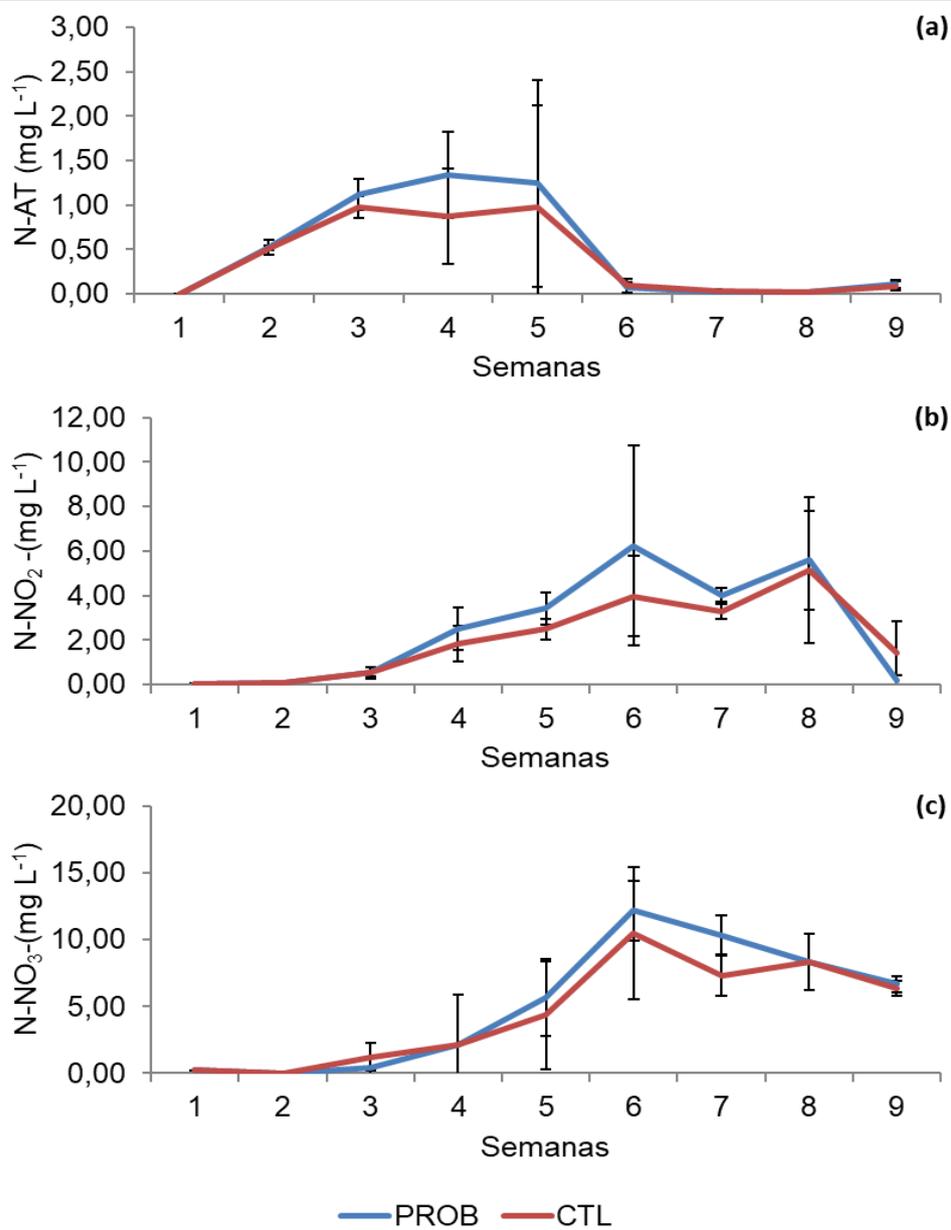


Figura 8 – Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (N-AT) (a), nitrito (N-NO₂) (b) e nitrato (N-NO₃) (c) ao longo de nove semanas durante a fase de engorda semi-intensiva do *P. vannamei*, nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

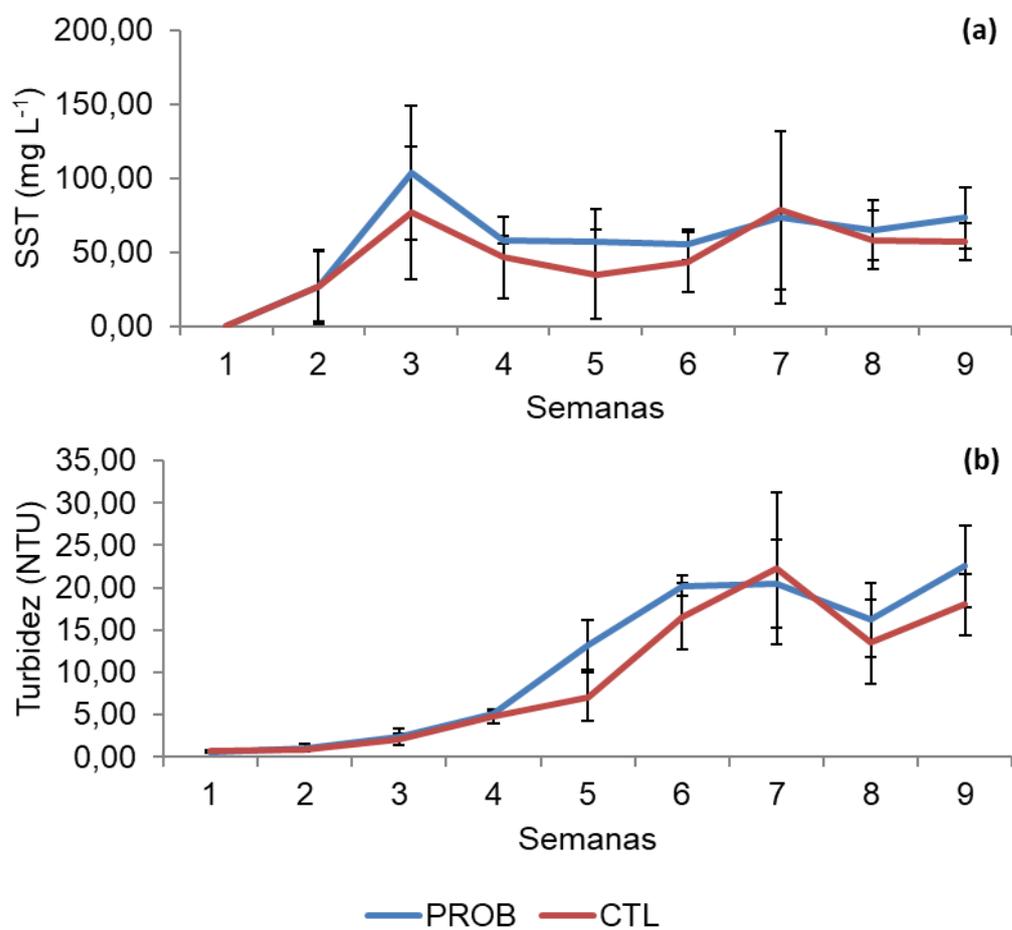


Figura 9 – Variação temporal de sólidos suspensos totais (SST) (a) e turbidez (NTU) (b) ao longo de nove semanas durante a fase de engorda semi-intensiva do *P. vannamei*, nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

Desempenho Zootécnico

Os resultados médios do desempenho zootécnico do *P. vannamei* ao final do período experimental de 63 dias mostram que diferenças foram observadas nos parâmetros: o peso final foi maior em PROB (15,17 g) comparado a CTL (11,01 g), assim como a sobrevivência (76,50% em PROB contra 60,00% em CTL). O coeficiente de conversão alimentar (CAA) foi mais eficiente em PROB (2,38) do que em CTL (3,26), e o ganho de peso semanal (GPS) foi maior em PROB (1,63 g/sem) em relação a CTL (1,17 g/sem). Além disso, a biomassa final foi superior em PROB (2,32 kg) em comparação a CTL (1,32 kg), e a produtividade foi maior no tratamento PROB (0,44 kg/m³) do que em CTL (0,24 kg/m³) (Tabela 3).

Tabela 9 – Desempenho zootécnico (média±desvio padrão) do *P. vannamei* ao final do período experimental de 63 dias na engorda semi-intensiva nos tratamentos Probióticos (PROB) e Controle (CTL).

Desempenho Zootécnico	PROB	CTL
Peso inicial (g)	0,54±0,20	0,54±0,20
Peso final (g)	15,17±0,70 ^a	11,01±0,47 ^b
Sobrevivência (%)	76,50±1,41 ^a	60,00±9,90 ^b
CAA	2,38±0,07 ^a	3,26±0,21 ^b
GPS (g/sem)	1,63±0,08 ^a	1,17±0,05 ^b
Biomassa final (kg)	2,32±0,06 ^a	1,32±0,16 ^b
Produtividade (kg m ³)	0,44±0,01 ^a	0,24±0,03 ^b

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos após ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey. CAA = conversão alimentar aparente, GPS = ganho de peso semanal.

Composição da comunidade microbiana

Os dados mostram diferenças significativas na abundância de microrganismos entre os tratamentos PROB e CTL. Para os flagelados, o tratamento PROB apresentou maior abundância ($8,43E+04$) em comparação ao CTL ($2,36E+03$). Os ciliados também foram mais abundantes no PROB ($2,48E+04$) em relação ao CTL ($7,00E+02$). Em relação aos rotíferos, foram encontrados em menor abundância no PROB ($9,91E+03$) e ausentes no CTL (0). O mesmo ocorreu com os nematóides, presentes no PROB ($4,08E+03$) e ausentes no CTL (0). Para as microalgas, o tratamento PROB também apresentou maior abundância ($2,26E+04$) em comparação ao CTL ($2,31E+03$). Esses resultados indicam que o uso de probióticos promoveu maior diversidade e quantidade de organismos em comparação ao controle (Figura 3).

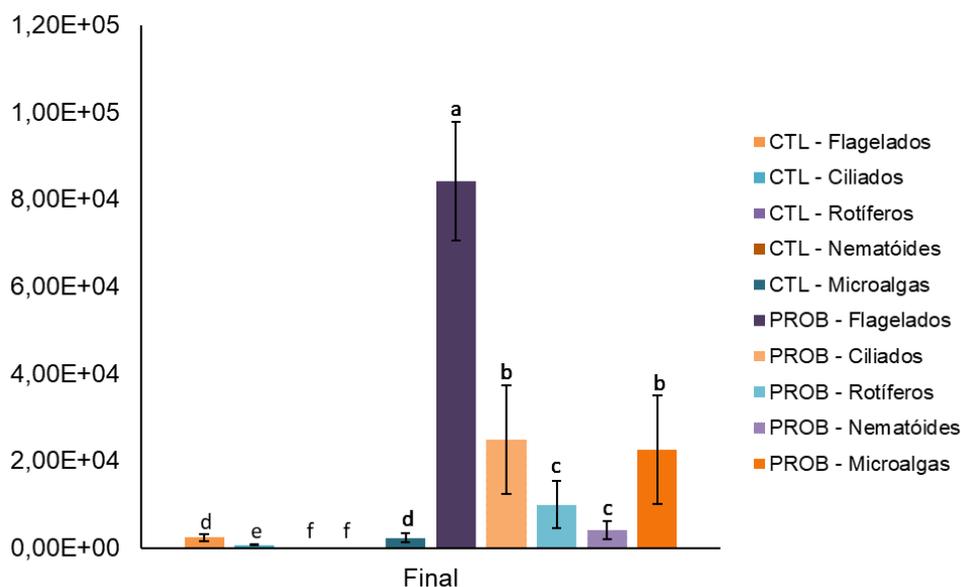


Figura 10 – Composição da comunidade de microrganismos (média±desvio padrão) encontrados ao final do experimento da fase de engorda semi-intensiva do *P. vannamei*, em todos os tratamentos.

Abundância bacteriana

O tratamento com probióticos (PROB) apresentou maior concentração de bactérias probióticas totais (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) na água e no intestino dos camarões em comparação ao grupo controle (CTL), com diferenças significativas entre ambos os tratamentos. No grupo PROB, a concentração de bactérias na água foi superior à encontrada no intestino, enquanto no CTL não houve diferença significativa entre os compartimentos analisados, ambos apresentando valores mínimos de bactérias probióticas (Figura 4).

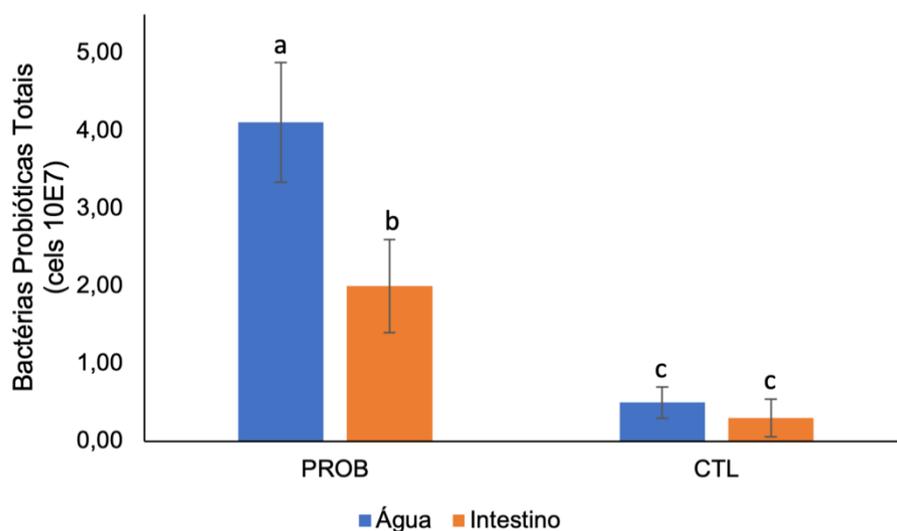


Figura 11 – Abundância total das bactérias probióticas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) ao final do experimento da fase de engorda semi-intensiva do *P. vannamei* nos diferentes tratamentos nas condições de presença na água de cultivo e no intestino dos camarões. Médias e desvio padrão são mostrados no gráfico.

Resultados Engorda 2 Superintensiva

Qualidade da água

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para os parâmetros de qualidade da água avaliados, como temperatura, oxigênio dissolvido, alcalinidade, amônia, fosfato e salinidade. Para os parâmetros de pH, nitrito, nitrato, sólidos suspensos totais e turbidez foram encontradas diferenças significativas entre os

sistemas água clara e bioflocos, porém não foram encontradas entre os tratamentos testados (Tabela 4).

Os maiores valores médios encontrados para temperatura foram 29,59°C (AC-CTL) e os menores foram 28,33°C (BFT-CTL), para o oxigênio dissolvido foram 6,03mg/L (AC-PR) e 5,80mg/L (BFT-PR), para dados de pH foram 7,93 (AC-CTL) e 7,49 (BFT-PA), alcalinidade foram 133,89 mgCaCO₃/L (AC-PA) e 112,22 mgCaCO₃/L (BFT-PRA) e salinidade 33,83 (BFT-CTL) e 31,74 (AC-PA) (Tabela 4).

Tabela 10 – Parâmetros de qualidade da água (média±desvio padrão) nos diferentes tratamentos, ao longo dos 63 dias de experimento em engorda superintensiva.

Parâmetros	AC-CTL	AC-PA	AC-PR	AC-PRA	BFT-CTL	BFT-PA	BFT-PR	BFT-PRA
Temperatura	29,59 ±0,65	28,81 ±0,88	28,93 ±0,67	28,69 ±0,52	28,64 ±0,53	28,33 ±0,49	28,60 ±0,55	28,51 ±0,66
O ₂ D	5,96 ±0,12	6,01 ±0,15	6,03 ±0,16	5,97 ±0,12	5,95 ±0,17	5,91 ±0,11	5,80 ±0,13	5,88 ±0,22
pH	7,93 ±0,03 ^a	7,91 ±0,03 ^a	7,91 ±0,04 ^a	7,90 ±0,08 ^a	7,63 ±0,18 ^b	7,49 ±0,13 ^b	7,54 ±0,10 ^b	7,58 ±0,09 ^b
Alcalinidade	133,53 ±11,67	133,89 ±12,96	130,56 ±12,96	130,93 ±14,87	114,63 ±114,63	114,89 ±16,92	116,67 ±16,99	112,22 ±15,53
Amônia	0,46 ±0,38	0,40 ±0,36	0,36 ±0,26	0,42 ±0,35	0,14 ±0,18	0,24 ±0,35	0,15 ±0,25	0,15 ±0,10
Nitrito	4,58 ±4,80 ^a	3,61 ±3,11 ^a	2,96 ±2,77 ^a	4,36 ±3,96 ^a	0,17 ±0,12 ^b	0,16 ±0,08 ^b	0,17 ±0,12 ^b	0,18 ±0,14 ^b
Nitrato	4,74 ±3,10 ^b	5,15 ±3,89 ^b	5,81 ±3,82 ^b	5,37 ±3,42 ^b	34,19 ±14,38 ^a	30,74 ±13,99 ^a	32,74 ±15,93 ^a	33,37 ±14,67 ^a
Fosfato	0,41 ±0,27	0,41 ±29	0,44 ±0,28	0,40 ±0,23	0,98 ±0,14	0,95 ±0,20	0,91 ±0,29	0,91 ±0,15
Salinidade	32,56 ±1,19	31,74 ±1,02	31,93 ±1,17	32,59 ±1,28	33,83 ±2,01	32,90 ±1,55	33,12 ±1,62	32,93 ±1,77
SST	89,07 ±37,29 ^b	94,96 ±49,90 ^b	109,70 ±45,29 ^b	100,41 ±43,01 ^b	384,96 ±162,66 ^a	374,07 ±156,53 ^a	363,26 ±155,12 ^a	354,96 ±161,53 ^a
Turbidez	46,67 ±31,26 ^b	62,94 ±42,25 ^b	73,57 ±48,74 ^b	62,40 ±41,80 ^b	204,53 ±131,93 ^a	181,19 ±74,68 ^a	169,01 ±101,60 ^a	187,16 ±107,81 ^a

Letras diferentes na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os sistemas água clara (AC) e bioflocos (BFT), após ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey.

Os maiores valores encontrados para amônia (a) foram 0,46mg/L (AC-CTL), nitrito (b) 4,58mg/L (AC-CTL), nitrato (c) 34,19mg/L (BFT-CTL), e fosfato 0,98mg/L (BFT-CTL). Já os menores valores para amônia foram 0,14mg/L (BFT-CTL), nitrito 0,16mg/L (BFT-PA), nitrato 4,74mg/L (AC-CTL) e fosfato 0,40mg/L (AC-PRA) (Figura 5). Para os sólidos suspensos totais (SST) foram encontrados maiores valores 384,96mg/L

(BFT-CTL) e turbidez 204,53 NTU (BFT-CTL). Os menores valores para SST (a) foram 89,07mg/L (AC-CTL) e turbidez (b) 46,67 NTU (AC-CTL) (Figura 6).

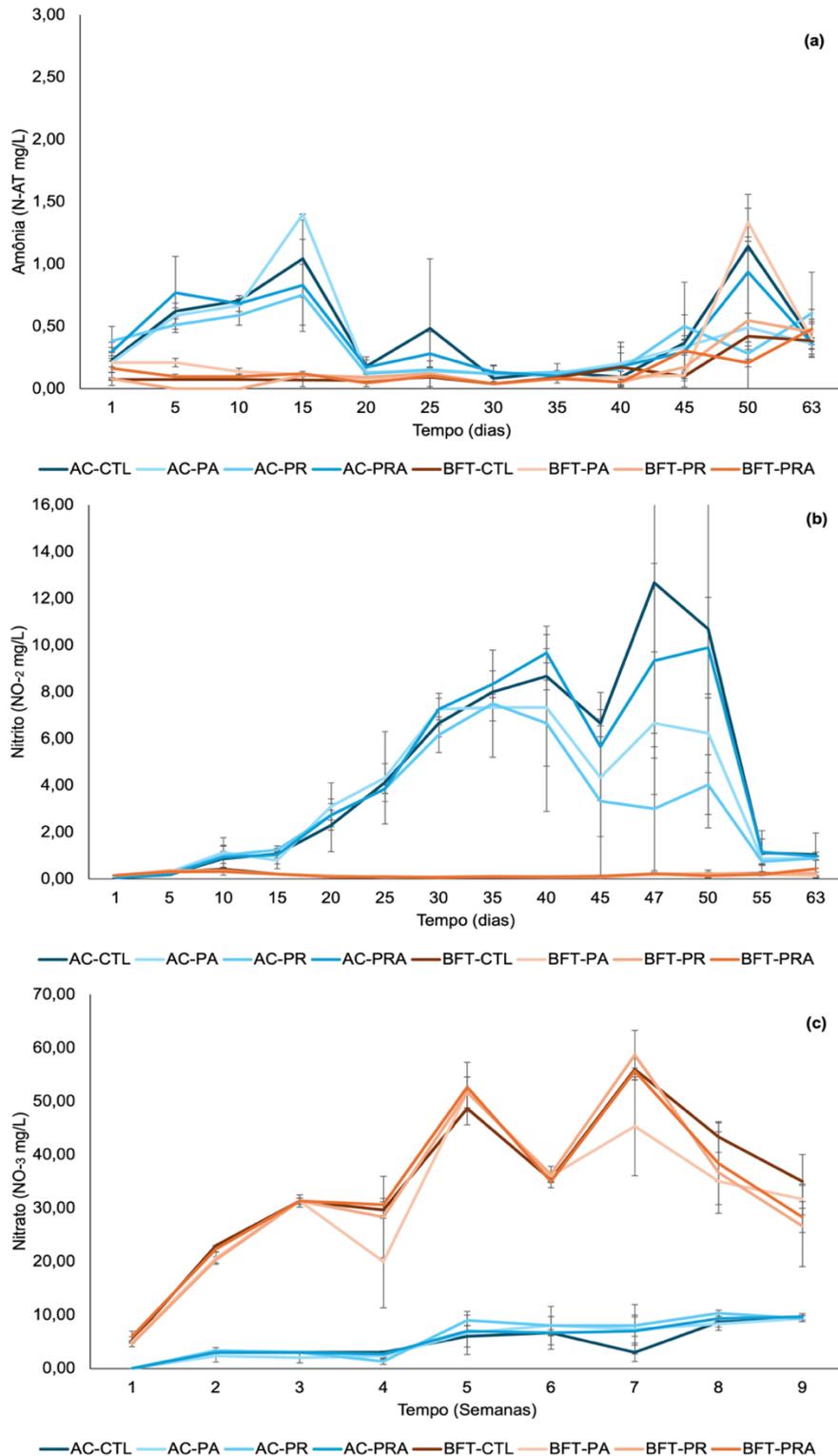


Figura 12 Variação temporal de nitrogênio amoniacal total (N-AT) (a), nitrito (N-NO₂) (b) e nitrato (N-NO₃) (c) ao longo de nove semanas durante a fase de engorda superintensiva do *P. vannamei*, nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

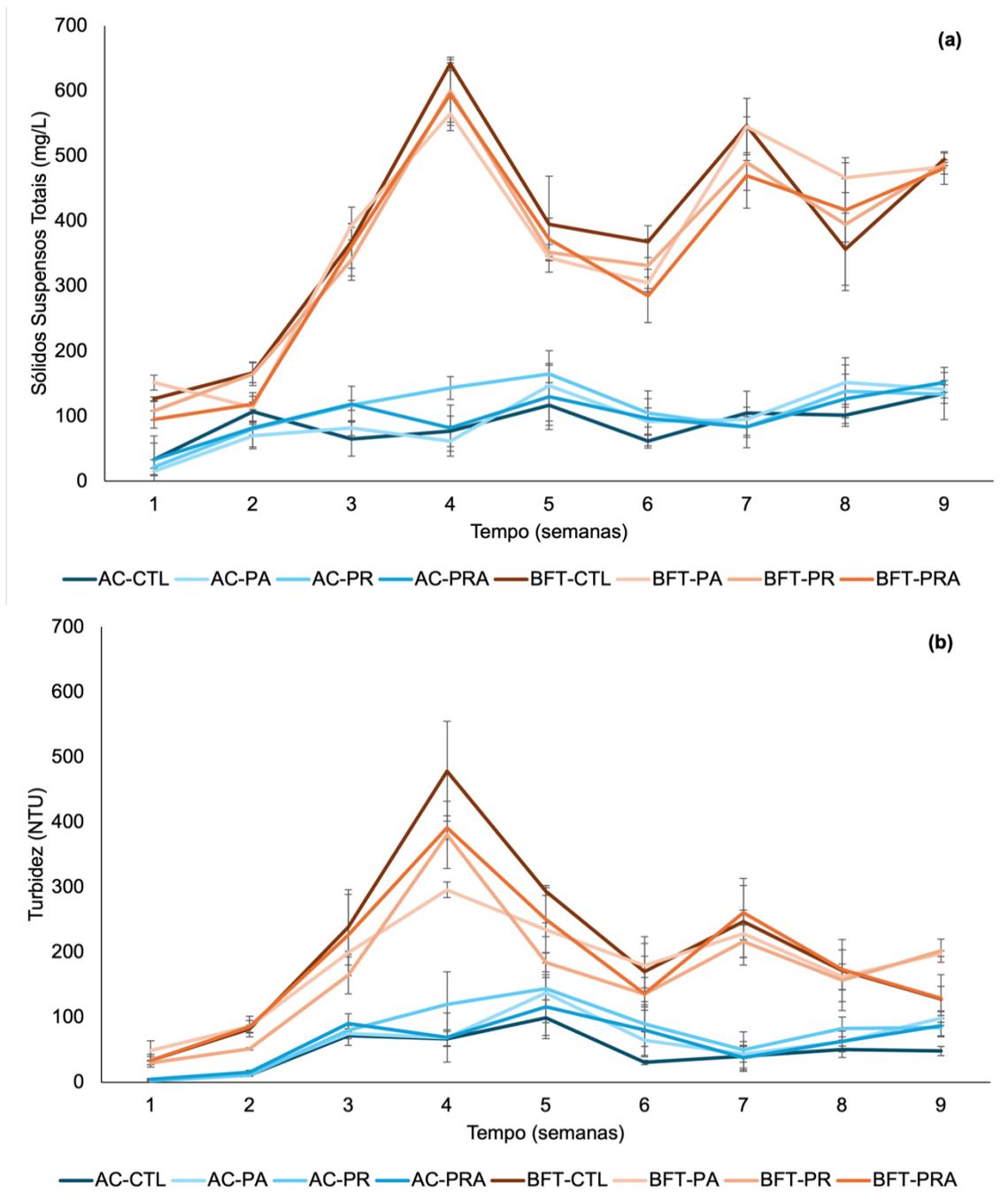


Figura 13 - Variação temporal de sólidos suspensos totais (SST) (a) e turbidez (NTU) (b) ao longo de nove semanas durante a fase de engorda superintensiva do *P. vannamei*, nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

Desempenho Zootécnico

Tabela 5 - Desempenho zootécnico (média±desvio padrão) do *P. vannamei* ao final do período experimental de 63 dias na engorda superintensiva nos diferentes tratamentos. Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos após ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey. CAA = conversão alimentar aparente, GPS = ganho de peso semanal.

Desempenho Zootécnico	AC-CTL	AC-PA	AC-PR	AC-PRA	BFT-CTL	BFT-PA	BFT-PR	BFT-PRA
Peso inicial (g)	0,45±0,10	0,45±0,10	0,45±0,10	0,45±0,10	0,45±0,10	0,45±0,10	0,45±0,10	0,45±0,10
Peso final (g)	4,16±0,19 ^e	4,68±0,43 ^d	4,64±0,39 ^d	6,09±0,68 ^c	6,13±0,03 ^c	7,80±0,21 ^b	8,68±0,28 ^a	9,21±0,11 ^a
Sobrevivência (%)	60,00±3,14 ^b	88,89±6,29 ^a	91,11±12,57 ^a	94,44±7,68 ^a	94,99±1,57 ^a	97,78±0,09 ^a	98,89±1,57 ^a	99,91±0,02 ^a
CAA	4,81±0,58 ^a	2,68±0,48 ^b	2,62±0,16 ^b	1,86±0,06 ^c	1,83±0,04 ^c	1,37±0,09 ^d	1,21±0,06 ^d	1,12±0,05 ^d
GPS (g/semana)	0,41±0,02 ^d	0,47±0,05 ^d	0,47±0,04 ^d	0,63±0,03 ^c	0,64±0,05 ^c	0,82±0,02 ^b	0,91±0,03 ^a	0,97±0,02 ^a
Biomassa final (g)	112,51±11,05 ^d	187,78±30,27 ^c	189,19±10,11 ^c	257,59±7,91 ^b	260,71±5,59 ^b	343,11±9,43 ^a	386,26±18,55 ^a	414,38±4,74 ^a
Produtividade e (kg/m ²)	0,75±0,07 ^e	1,25±0,20 ^d	1,26±0,07 ^d	1,72±0,05 ^c	1,74±0,04 ^c	2,29±0,06 ^b	2,58±0,12 ^a	2,76±0,03 ^a

O maior peso final foi registrado em BFT-PRA (9,21g) e o menor em AC-CTL (4,16g). A maior sobrevivência foi observada em BFT-PRA (99,91%), enquanto a menor ocorreu em AC-CTL (60,00%). Em termos de eficiência alimentar, o menor valor de CAA foi encontrado em BFT-PRA (1,12) e o maior em AC-CTL (4,81). O maior ganho de peso semanal (GPS) foi registrado em BFT-PRA (0,97g/semana) e o menor em AC-CTL (0,41g/semana). A biomassa final também foi superior em BFT-PRA (414,38g), enquanto AC-CTL apresentou o menor valor (112,51g). Por fim, a produtividade mais alta foi alcançada em BFT-PRA (2,76 kg/m²) e a mais baixa em AC-CTL (0,75 kg/m²). De maneira geral, os tratamentos BFT, especialmente BFT-PRA, destacaram-se por seu desempenho superior em todos os parâmetros, enquanto AC-CTL apresentou os piores resultados.

Composição da comunidade microbiana

No caso dos flagelados (a), os sistemas de bioflocos (especialmente BFT-PRA e BFT-PA) apresentaram as maiores abundâncias, enquanto os sistemas de água clara

mantiveram níveis significativamente menores. Para os ciliados (b), os tratamentos BFT-PRA e BFT-PA também se destacaram, apresentando maiores abundâncias, seguidos pelos tratamentos BFT-PR e AC-PRA, enquanto AC-CTL e BFT-CTL tiveram os menores valores. Nos rotíferos (c), todos os tratamentos com bioflocos apresentaram maior concentração em relação aos sistemas de água clara, onde não foram encontrados. Os nematoides (d) seguiram um padrão similar, com os tratamentos BFT-PRA, BFT-PR e BFT-PA apresentando maiores abundâncias, enquanto os sistemas de água clara assim como os rotíferos, também não foram encontrados. Por fim, as microalgas (e), os tratamentos BFT-PA e BFT-PRA exibiram as maiores concentrações, seguidos pelo AC-PRA e BFT-PR, enquanto AC-CTL e BFT-CTL apresentaram as menores abundâncias. Os dados indicam que os sistemas de bioflocos, especialmente quando combinados com probióticos na ração e na água, promovem maior abundância de microrganismos em comparação aos sistemas de água clara (Figura 7).

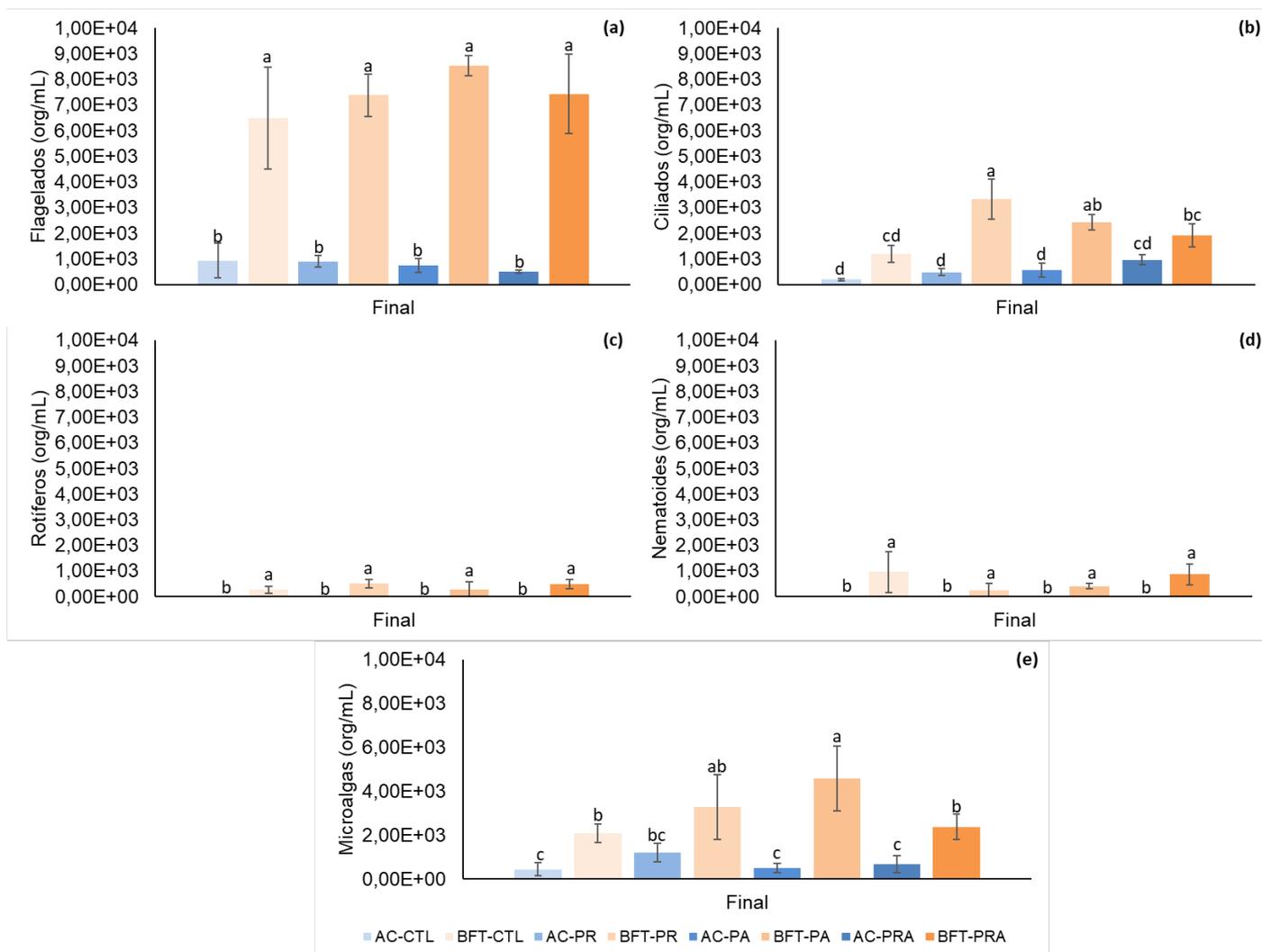


Figura 14 - Composição da comunidade de microrganismos (média±desvio padrão) encontrados ao final do experimento da fase de engorda superintensiva do *P. vannamei*, em todos os tratamentos.

Abundância bacteriana

O tratamento água clara sem adição de probióticos (AC-CTL) apresentou os menores valores em ambos (água e intestino), enquanto os maiores valores foram observados no tratamento bioflocos com duas vias de aplicação dos probióticos (BFT-PRA) na água e no intestino. Nos sistemas de água clara (AC), a adição de probióticos apenas na água (AC-PA) ou na ração (AC-PR) resultou em níveis intermediários. Já a combinação de probióticos na ração e na água (AC-PRA) aumentou significativamente a abundância bacteriana. Nos sistemas de bioflocos (BFT), os tratamentos com probióticos (BFT-PR, BFT-PA, e BFT-PRA) apresentaram maior abundância bacteriana em

comparação ao controle (BFT-CTL), com diferenças variando entre os compartimentos e destacando o BFT-PRA como o mais eficaz (Figura 8a).

A abundância de *Bacillus subtilis* nos tratamentos avaliados demonstra que o tratamento AC-CTL apresentou as menores concentrações em ambos (água e intestino). Entre os sistemas de água clara (AC), os tratamentos AC-PR, AC-PA e AC-PRA apresentaram valores similares com uma leve superioridade no intestino em relação à água em AC-PA. Nos sistemas de bioflocos (BFT), os tratamentos com probióticos (BFT-PR, BFT-PA e BFT-PRA) apresentaram maior abundância de *Bacillus subtilis* em comparação ao controle (BFT-CTL), com o BFT-PRA se destacando como o tratamento mais eficaz, exibindo os maiores valores na água e no intestino. Esses resultados indicam que a aplicação de probióticos em sistemas de bioflocos, especialmente quando combinada na ração e na água, foi a mais eficiente para aumentar a presença de *Bacillus subtilis* (Figura 8b).

O tratamento AC-CTL e o BFT-CTL apresentaram os menores valores em ambos os compartimentos. Nos sistemas de água clara (AC), os tratamentos AC-PR e AC-PA tiveram níveis baixos enquanto o AC-PRA apresentou as maiores concentrações, com valores significativamente superiores em água e intestino. Nos sistemas de bioflocos (BFT), os tratamentos BFT-PR, BFT-PA e BFT-PRA exibiram maiores concentrações de bactérias ácido lácticas em comparação ao controle (BFT-CTL). O tratamento BFT-PRA destacou-se com as maiores abundâncias em ambos os compartimentos, sem diferenças estatísticas entre água e intestino, sendo comparável ao AC-PRA. Esses resultados indicam que a adição de probióticos, especialmente em sistemas combinados (ração e água), é eficaz para aumentar a abundância de bactérias ácido lácticas (Figura 8c).

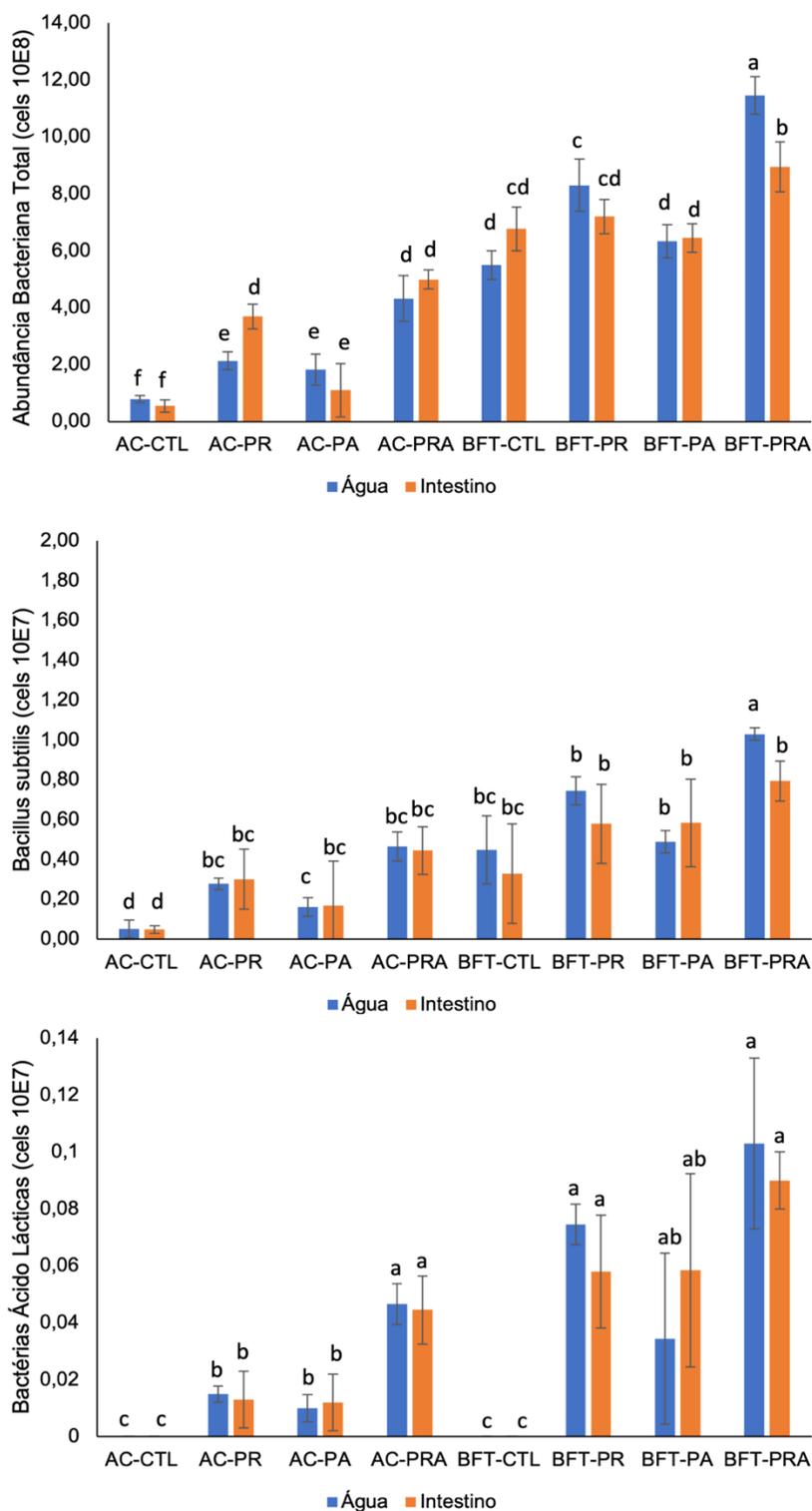


Figura 15 - Abundância total das bactérias em Dapi (a), *Bacillus subtilis* (b) e bactérias ácido lácticas (c) na água e no intestino ao final do experimento da fase de engorda superintensiva do *P. vannamei* nos diferentes tratamentos. Médias e desvio padrão são mostrados nos gráficos.

Discussão

Os parâmetros de qualidade da água como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, salinidade, alcalinidade, amônia, nitrito, nitrato, fosfato, sólidos suspensos totais e turbidez, em ambos os sistemas de água clara (AC) e bioflocos (BFT) mantiveram-se dentro dos níveis recomendados para a espécie *P. vannamei* (Khanjani et al., 2024). O uso dos probióticos manteve a qualidade da água mais estável no sistema de bioflocos quando comparado com a água clara, principalmente o nitrito, que na água clara expressou picos maiores e mais duradouros, alcançando níveis de toxicidade que afetaram negativamente o desempenho zootécnico dos animais (Lin and Chen, 2003). Quanto à troca de água, para manter a qualidade da água nos sistemas de água clara altas taxas de renovações foram feitas, simulando produções semi-intensivas com essas características. Os sistemas semi-intensivos requerem cerca de 50% de renovação, enquanto no sistema superintensivo não há troca de água, caracterizando um sistema fechado (Cuzon et al., 2004).

Em ambas as diferentes fases de engorda foram observadas as vantagens do uso das bactérias probióticas expressadas pelos índices zootécnicos, onde o peso final (g), sobrevivência, produtividade, biomassa final e taxa de conversão alimentar sempre apresentam valores médios superiores quando comparado com controle, sem adição de probióticos. Diversos estudos mostram a eficácia do uso de probióticos para melhor aprimoramento do desempenho zootécnico dos camarões, manutenção da qualidade da água, resistência em condições de estresse e competição contra bactérias patogênicas (Amjad et al., 2022; Midhun Sebastian Jose et al., 2023; Omar et al., 2024; Tarnecki et al., 2019).

As duas vias de aplicação das bactérias probióticas no sistema com água clara na engorda superintensiva apresentou melhores índices zootécnicos, como peso final, sobrevivência, CAA, biomassa final e produtividade, igualando-se ao tratamento controle em sistema de bioflocos, ou seja, as doses duplicadas maximizaram a eficácia dos probióticos. Estudos com formas variadas de aplicação dos probióticos demonstram os pontos positivos e negativos, onde são dependentes das condições de produção, tipo de alimento, escala de produção (Hancz, 2022; Kumar et al., 2016).

O padrão de dominância de protozoários, como flagelados, ciliados e rotíferos, foi amplamente observado no tratamento PROB em comparação ao controle. Além disso, o tratamento PROB favoreceu o desenvolvimento do "microbial loop", aumentando a

diversidade e a abundância de microrganismos benéficos, enquanto o controle apresentou valores significativamente inferiores e ausência de certos organismos, como rotíferos e nematoides. Esse comportamento é reportado em estudos que avaliaram a comunidade de microrganismos em diferentes condições de cultivo (Pimentel et al., 2024; Reis et al., 2019).

Em condições de cultivo em sistema de BFT, as bactérias heterotróficas e os protozoários são organismos essenciais capazes de utilizar o nitrogênio proveniente da matéria orgânica continuamente adicionada aos sistemas (Sigeo 2005). Os tratamentos BFT apresentaram uma maior dominância de protozoários e outros microrganismos em comparação aos tratamentos AC. A adição de carbono orgânico nos sistemas BFT estimulou a atividade microbiana, promovendo o crescimento de flagelados, ciliados, rotíferos, nematoides e microalgas. Por outro lado, os tratamentos AC apresentaram menor abundância e diversidade desses microrganismos, evidenciando diferenças significativas entre os sistemas analisados. A abundância desses microrganismos permite uma fonte natural e suplementar de alimento disponível aos camarões (Khanjani et al., 2022; Onianwah and Stanley, 2018).

No sistema semi-intensivo, a densidade de bactérias por mililitro é encontrada próximo de 10^4 , enquanto no sistema intensivo, essa densidade é significativamente maior, alcançando 10^8 , devido à presença dos bioflocos, bactérias e microrganismos (Cuzon et al., 2004). No presente estudo observou-se valores médios inferiores de bactérias quando comparamos diferentes sistemas, porém o uso de bactérias probióticas aumentou consideravelmente as concentrações de bactérias na água e no intestino dos camarões quando comparados ao tratamento sem adição de probióticos. A proteção contra patógenos é inexistente no sistema semi-intensivo, enquanto no sistema intensivo há um nível elevado de proteção, devido à maior atividade microbiológica (Nisar et al., 2022).

Quando as bactérias probióticas são adicionadas no sistema de bioflocos ocorre uma maior abundância bacteriana total, seguido da adição em água clara, indicando o efeito positivo da adição de probióticos nos sistemas e por último os grupos controle sem adição dos probióticos que apresentam valores muito inferiores. Sendo assim, os tratamentos sem adição de probióticos, apresentaram as menores abundâncias bacterianas, refletindo a importância dos probióticos na intensificação e manutenção da qualidade microbiológica nesses sistemas. Estudos em diferentes condições de cultivo e com organismos aquáticos diferentes corroboram esses resultados (Alvanou et al., 2023; Deng et al., 2022; Holt et al., 2021; Hostins et al., 2017).

Bacilos e bactérias ácido lácticas são capazes de colonizar o ambiente de cultivo e o intestino dos animais, através da adesão ao epitélio intestinal, formação de biofilme, modulação do sistema imune, melhora na digestibilidade dos nutrientes e competição contra patógenos (Guimarães et al., 2022; Sabo et al., 2018). Nas diferentes condições testadas no presente estudo foram comprovadas a presenças das bactérias probióticas no intestino e na água de cultivo. Os bacilos atuaram diretamente na colonização da água de cultivo e as bactérias ácido lácticas foram encontradas tanto na água como no intestino dos animais. A colonização do trato intestinal está diretamente relacionada com o ambiente de cultivo e suas condições, onde a habilidade de colonização de cada bactéria ocorre de acordo com os nutrientes disponíveis, temperatura, salinidade e meios de aplicação (Aly et al., 2008; Ringø, 2020; Won et al., 2020).

Conclusões

O uso de probióticos é fundamental para melhor desempenho zootécnico dos camarões, desenvolvimento dos diversos microrganismos e abundância bacteriana. Os tratamentos com via dupla de aplicação ou com aplicação apenas na ração apresentaram melhor desempenho em todos os parâmetros zootécnicos e demonstraram vantagens na sucessão de protozoários e maior presença de bactérias na água e no intestino dos camarões.

Referências Bibliográficas

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N. Ben, Galvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol. Rev. 35, 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Adilah, R.N., Chiu, S.-T., Hu, S.-Y., Ballantyne, R., Happy, N., Cheng, A.-C., Liu, C.-H., 2022. Improvement in the probiotic efficacy of *Bacillus subtilis* E20-stimulates growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via encapsulation in alginate and coated with chitosan. Fish Shellfish Immunol. 125, 74–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.002>
- Al-Dohail, M.A., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M., 2011. Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. Aquac. Res. 42, 196–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02606.x>
- Alvanou, M. V., Feidantsis, K., Staikou, A., Apostolidis, A.P., Michaelidis, B., Giantsis, I.A., 2023. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics Utilization in Crayfish Aquaculture and Factors Affecting Gut Microbiota. Microorganisms 11, 1232. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051232>
- Aly, S.M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*)

- to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest.
- Amjad, K., Dahms, H.-U., Ho, C.-H., Wu, Y.-C., Lin, F.-Y., Lai, H.-T., 2022. Probiotic additions affect the biofloc nursery culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 560, 738475.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738475>
- AOAC, C., 2005. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International. Off. Methods Gaithersburg, MD, USA.
- Arias-Moscoso, J.L., Espinoza-Barrón, L.G., Miranda-Baeza, A., Rivas-Vega, M.E., Nieves-Soto, M., 2018. Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water exchange. *Aquac. Reports* 11, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.06.001>
- Avnimelech, Y., 1999. C / N ratio as a control element in aquaculture systems 227–235.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- Brito, L.O., Chagas, A.M., da Silva, E.P., Soares, R.B., Severi, W., Gálvez, A.O., 2016. Water quality, *Vibrio* density and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) in an integrated biofloc system with red seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville). *Aquac. Res.* 47, 940–950. <https://doi.org/10.1111/are.12552>
- Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* 48, 168–178.
<https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.1.0168>
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513–551.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.022>
- Das Susmita, M.K., Haque, S., 2017. A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. *J. Entomol. Zool. Stud.* 5, 422–429.
- Del’Duca, A., Cesar, D.E., Diniz, C.G., Abreu, P.C., 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent *in situ* hybridization technique. *Aquaculture* 388–391, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>
- Demanèche, S., Sanguin, H., Poté, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., Simonet, P., 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3957–3962.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0800072105>
- Deng, Y., Verdegem, M.C.J., Eding, E., Kokou, F., 2022. Effect of rearing systems and dietary probiotic supplementation on the growth and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae. *Aquaculture* 546, 737297.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737297>
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346–358.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Furtado, P.S., Poersch, L.H., Wasielesky, W., 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture* 321, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.034>

- Guimarães, M.C., Cerezo, I.M., Fernandez-Alarcon, M.F., Natori, M.M., Sato, L.Y., Kato, C.A.T., Morínigo, M.A., Tapia-Paniagua, S., Dias, D. de C., Ishikawa, C.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Cassiano, L.L., Bach, E.E., Clissa, P.B., Orefice, D.P., Tachibana, L., 2022. Oral Administration of Probiotics (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*) in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Vaccinated and Challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fishes* 7. <https://doi.org/10.3390/fishes7040211>
- Hancz, C., 2022. Application of Probiotics for Environmentally Friendly and Sustainable Aquaculture: A Review. *Sustainability* 14, 15479. <https://doi.org/10.3390/su142215479>
- He, X., Abakari, G., Tan, H., LIU, W., Luo, G., 2023. Effects of different probiotics (*Bacillus subtilis*) addition strategies on a culture of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology (BFT) aquaculture system. *Aquaculture* 566, 739216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739216>
- Holt, C.C., Bass, D., Stentiford, G.D., van der Giezen, M., 2021. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *J. Invertebr. Pathol.* 186, 107387. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107387>
- Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D.E., Wasielesky, W., 2017. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. *Aquaculture* 480, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036>
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., Immerseel, F. Van, 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>
- Ichijo, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M., 2010. Oligonucleotide Probes for Phylogenetic Detection of Waterborne Bacteria. *J. Heal. Sci.* 56, 321–325. <https://doi.org/10.1248/jhs.56.321>
- Jory, D.E., Cabrera, T.R., Dugger, D.M., Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, L., Jackson, C.J., McIntosh, R.P., Castañeda, J., International, B., Park, H.A., Hwy, N.O.D., Pierce, F., 2001. a Global Review of Shrimp Feed Management : Status and Perspectives. *Aquaculture* 104–152.
- Kasan, N.A., Ghazali, N.A., Ikhwanuddin, M., Ibrahim, Z., 2017. Isolation of potential bacteria as inoculum for biofloc formation in pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* culture ponds. *Pakistan J. Biol. Sci.* 20, 306–313. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.306.313>
- Kesselring, J.C., Gruber, C., Standen, B., Wein, S., 2019. Continuous and pulse-feeding application of multispecies probiotic bacteria in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 50, 1123–1132. <https://doi.org/10.1111/jwas.12640>
- Khanjani, M.H., Mohammadi, A., Emerenciano, M.G.C., 2024. Water quality in biofloc technology (BFT): an applied review for an evolving aquaculture. *Aquac. Int.* 32, 9321–9374. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01618-w>
- Khanjani, M.H., Mohammadi, A., Emerenciano, M.G.C., 2022. Microorganisms in biofloc aquaculture system. *Aquac. Reports* 26, 101300. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101300>
- Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., Tyler, C.R., 2021. Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Rev. Aquac.* 13, 324–352. <https://doi.org/10.1111/raq.12477>
- Krummenauer, D., Poersch, L., Romano, L.A., Lara, G.R., Encarnação, P., Wasielesky, W., 2014a. The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc Culture

- System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. J. Appl. Aquac. 26, 370–379. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.965575>
- Krummenauer, D., Samocha, T., Poersch, L., Lara, G., Wasielesky, W., 2014b. The Reuse of Water on the Culture of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT System. J. World Aquac. Soc. 45, 3–14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Kumar, R., Huang, M.-Y., Chen, C.-L., Wang, H.-C., Lu, H.-P., 2023. Resilience and probiotic interventions to prevent and recover from shrimp gut dysbiosis. Fish Shellfish Immunol. 139, 108886. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108886>
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K., Sarkar, U.K., 2016. Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. Rev. Fish. Sci. Aquac. 24, 342–368. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1193841>
- Kyselková, M., Kopecký, J., Frapolli, M., Défago, G., Ságová-Marečková, M., Grundmann, G.L., Moëne-Loccoz, Y., 2009. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. ISME J. 3, 1127–1138. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.61>
- Lin, Y.-C., Chen, J.-C., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture 224, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00220-5)
- Llario, Falco, Sebastiá-Frasquet, Escrivá, Rodilla, Poersch, 2019. The Role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* During the Maturation of a Biofloc System. J. Mar. Sci. Eng. 7, 228. <https://doi.org/10.3390/jmse7070228>
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1999. Specific Oligonucleotide Probes for in situ Detection of a Major Group of Gram-positive Bacteria with low DNA G+C Content. Syst. Appl. Microbiol. 22, 186–196. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80065-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80065-4)
- Midhun Sebastian Jose, Arun, D., Neethu, S., Radhakrishnan, E.K., Jyothis, M., 2023. Probiotic *Paenibacillus polymyxa* HGA4C and *Bacillus licheniformis* HGA8B combination improved growth performance, enzymatic profile, gene expression and disease resistance in *Oreochromis niloticus*. Microb. Pathog. 174, 105951. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105951>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., Mohanta, K.N., 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). 97, 405–430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164, 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
- Moriarty, D.J.W., 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151, 333–349. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01487-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01487-1)
- Nayak, S.K., 2021. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquaculture with special reference to *Bacillus subtilis*. Rev. Aquac. <https://doi.org/10.1111/raq.12503>
- Nisar, U., Peng, D., Mu, Y., Sun, Y., 2022. A Solution for Sustainable Utilization of Aquaculture Waste: A Comprehensive Review of Biofloc Technology and Aquamimicry. Front. Nutr. 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.791738>
- Omar, A.A., Marzouk, M.S., Mahfouz, N.B., Massoud, A.M., Shukry, M., Farrag, F., Zayed, M.M., Abd Alaziz, M.A., Moustafa, E.M., 2024. Effects of the putative probiotics *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus subtilis* on white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, immune response, gut histology, water quality,

- and growth performance. *Open Vet. J.* 14, 144–153.
<https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i1.13>
- Onianwah, I.F., Stanley, H.O., 2018. Microorganisms in Aquaculture Development. *Glob. Adv. Res. J. Microbiol.* 7, 127–131.
- Pereira, W.A., Mendonça, C.M.N., Urquiza, A.V., Marteinsson, V.P., LeBlanc, J.G., Cotter, P.D., Villalobos, E.F., Romero, J., Oliveira, R.P.S., 2022. Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. *Microorganisms* 10, 1705. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091705>
- Pillinger, M., Weber, B., Standen, B., Schmid, M.C., Kesselring, J.C., 2022. Multi-strain probiotics show increased protection of intestinal epithelial cells against pathogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 560, 738487. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738487>
- Pimentel, O.A.L.F., Wasielesky, W., Sena, R.P.O., Ramiro, B.D.O., Bezerra, A., Krummenauer, D., 2024. Microbial community composition, nitrification process, and growth of *Penaeus vannamei* in a synbiotic nursery system inoculated with different probiotic microorganisms. *Aquaculture* 592, 741254. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741254>
- Ray, A.J., Dillon, K.S., Lotz, J.M., 2011. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. *Aquac. Eng.* 45, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.09.001>
- Reis, W.G., Wasielesky, 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.067>
- Resende, J.A., Borges, M.L., Pacheco, K.D., Ribeiro, I.H., Cesar, D.E., Silva, V.L., Diniz, C.G., Apolônio, A.C.M., 2017. Antibiotic resistance in potentially bacteriocinogenic probiotic bacteria in aquaculture environments. *Aquac. Res.* 48, 2113–2119. <https://doi.org/10.1111/are.13047>
- Ringø, E., 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquac. Fish.* 5, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.12.001>
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., Ishida, Y., 1996. Isolation of a native bacterial strain the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Artic. J. Shellfish Res.*
- Sabo, S. da S., Lopes, A.M., Santos-Ebinuma, V. de C., Rangel-Yagui, C. de O., Oliveira, R.P. de S., 2018. Bacteriocin partitioning from a clarified fermentation broth of *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in aqueous two-phase systems with sodium sulfate and choline-based salts as additives. *Process Biochem.* 66, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.018>
- Sahoo, T.K., Jena, P.K., Patel, A.K., Seshadri, S., 2016. Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review. *Aquac. Res.* 47, 1013–1027. <https://doi.org/10.1111/are.12556>
- Salzman, N.H., de Jong, H., Paterson, Y., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Bos, N.A., 2002. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* 148, 3651–3660. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3651>
- Sha, Y., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Qi, C., Wang, L., 2016. Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatant. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1736–1745.

- <https://doi.org/10.4014/jmb.1603.03078>
- Sigee DC., 2005. Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. John Wiley & Sons LTD, p 544
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bull. Fish. Res. Board Canada 167. <https://doi.org/10.25607/OBP-1791>
- Tarnecki, A.M., Wafapoor, M., Phillips, R.N., Rhody, N.R., 2019. Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. Sci. Rep. 9, 4892. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39316-w>
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring, Manual and Guides 12. Paris, France.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Mitteilungen 9, 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>
- Valenti, W.C., Barros, H.P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G.W., Cavalli, R.O., 2021. Aquaculture in Brazil: past, present and future. Aquac. Reports 19, 100611. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>
- van Hai, N., Fotedar, R., 2010. A review of probiotics in shrimp aquaculture. J. Appl. Aquac. <https://doi.org/10.1080/10454438.2010.500597>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 655–671.
- Wang, J., Wu, Z., Wang, S., Wang, X., Zhang, D., Wang, Q., Lin, L., Wang, G., Guo, Z., Chen, Y., 2022. Inhibitory effect of probiotic *Bacillus spp.* isolated from the digestive tract of *Rhynchocypris Lagowskii* on the adhesion of common pathogenic bacteria in the intestinal model. Microb. Pathog. 169, 105623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105623>
- Wasielisky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>
- Wasielisky, W., Froes, C., Fôes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L., 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* Reared in a Biofloc System: The Effect of Stocking Densities and Compensatory Growth. J. Shellfish Res. 32, 799–806. <https://doi.org/10.2983/035.032.0323>
- Wee, W., Abdul Hamid, N.K., Mat, K., Khalif, R.I.A.R., Rusli, N.D., Rahman, M.M., Kabir, M.A., Wei, L.S., 2024. The effects of mixed prebiotics in aquaculture: A review. Aquac. Fish. 9, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2022.02.005>
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W.J., Lee, S., Bai, S.C., 2020. Evaluation of Potential Probiotics *Bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Microorganisms 8, 281. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020281>
- Yokokawa, T., Nagata, T., 2005. Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6799–6807. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6799-6807.2005>
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis. Pearson Educ. India.
- Zhu, Y., Li, W., Zhang, M., Zhong, Z., Zhou, Z., Han, J., Zhang, C., Yang, J., Wu, Y., Shu, H., 2023. Screening of host gut-derived probiotics and effects of feeding probiotics on growth, immunity, and antioxidant enzyme activity of hybrid grouper

Conclusões gerais

Os resultados obtidos ao longo dos três capítulos desta tese demonstram, de forma consistente, a eficácia da aplicação de bactérias probióticas no cultivo do *Penaeus vannamei* em diferentes sistemas e fases de cultivo. No primeiro capítulo, foi evidenciado que tanto *Bacillus subtilis* quanto as bactérias ácido-lácticas (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) são capazes de crescer em salinidade de 30‰ e temperatura de 30°C e que a adição de *B. subtilis* na ração e na água proporciona os melhores resultados zootécnicos, com ganhos significativos em peso final e produtividade. O uso do mix probiótico também demonstrou ação antagonista contra patógenos e contribuição para a manutenção do sistema imunológico dos camarões.

No segundo capítulo, verificou-se que a aplicação do mix probiótico em sistemas de bioflocos, especialmente por via dupla (ração e água), resultou em maior abundância microbiana, melhor desempenho zootécnico e colonização efetiva tanto da água quanto do intestino dos camarões. Além disso, a aplicação em duas vias em sistema de água clara apresentou desempenho semelhante ao observado no tratamento bioflocos sem adição de probióticos, evidenciando a adaptabilidade e a eficiência da formulação probiótica.

O terceiro capítulo reforçou a importância do uso de probióticos para o aprimoramento do desempenho zootécnico, aumento da diversidade microbiana e abundância bacteriana. Tratamentos com aplicação dupla ou exclusiva na ração resultaram nos melhores índices de crescimento e saúde dos animais, com impactos positivos também sobre a sucessão de protozoários e a colonização do trato intestinal pelos probióticos.

De forma geral, os resultados desta tese confirmam que o uso estratégico de probióticos é uma ferramenta eficaz, viável e sustentável para promover a saúde, o desempenho e a estabilidade dos sistemas aquícolas, contribuindo significativamente para a intensificação segura da produção de camarões marinhos.

Perspectivas futuras

Com base nos resultados desta pesquisa, futuras investigações poderão se concentrar no aprofundamento dos mecanismos de ação dos probióticos em nível molecular, especialmente no que se refere à modulação da expressão gênica relacionada à imunidade e ao metabolismo dos camarões. A caracterização da microbiota associada aos diferentes tratamentos, por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), poderá elucidar com maior precisão as interações entre microrganismos benéficos, patógenos e o hospedeiro. Outras perspectivas incluem o desenvolvimento de formulações probióticas customizadas para fases específicas do cultivo, bem como a integração com outras biotecnologias, como prebióticos, simbióticos ou nanoencapsulamentos, visando otimizar a liberação e estabilidade dos microrganismos. Por fim, estudos em escala comercial e análises de viabilidade econômica serão fundamentais para consolidar o uso de probióticos como uma prática rotineira e tecnicamente recomendada na aquicultura intensiva e sustentável.