



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

DANYELA CARLA ELIAS SOARES

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E VIABILIDADE BACTERIOLÓGICA
DE PRODUTOS PROBIÓTICOS UTILIZADOS NA CARCINICULTURA

FORTALEZA

2023

DANYELA CARLA ELIAS SOARES

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E VIABILIDADE BACTERIOLÓGICA DE
PRODUTOS PROBIÓTICOS UTILIZADOS NA CARCINICULTURA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Manejo de ecossistemas para a produção biológica

Orientadora: Prof. Dra. Oscarina Viana de Sousa

Coorientadora: Prof. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S653a Soares, Danyela Carla Elias.
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E VIABILIDADE BACTERIOLÓGICA DE PRODUTOS PROBIÓTICOS UTILIZADOS NA CARCINICULTURA / Danyela Carla Elias Soares. – 2023.
145 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa .
Coorientação: Profa. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva.
1. Camarão cultivado. 2. Biotecnologia. 3. Bactérias benéficas. 4. Bactérias nitrificantes. I. Título.
CDD 551.46
-

DANYELA CARLA ELIAS SOARES

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA, SEGURANÇA E VIABILIDADE BACTERIOLÓGICA DE
PRODUTOS PROBIÓTICOS UTILIZADOS NA CARCINICULTURA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Manejo de ecossistemas para a produção biológica

Orientadora: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa

Coorientadora: Profa. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva

Data da defesa: 08/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Presidente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Esaú Aguiar Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Fátima Cristiane Teles De Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, que me conceda forças para superar
cada dificuldade ao longo desta trajetória, e ao
meu filho Gael, que é minha motivação diária
para seguir em frente,

AGRADECIMENTOS

Esse título é a soma do carinho e dedicação de muitas pessoas. A realização deste trabalho não seria possível sem a colaboração de muitos que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua execução. Sou eternamente grata a Deus por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas que me ajudaram a realizar este sonho.

Primeiramente, a Deus, por todo amor e cuidado, e pela força que me permitiu alcançar esta etapa, me fortalecendo ao ponto de superar as dificuldades seguindo em frente, concluindo este projeto de forma satisfatória.

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio, que possibilitou a execução e o desenvolvimento deste estudo. Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, Antonio Evilázio e Antonia Nilza, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos e objetivos. Obrigada por estar ao meu lado com apoio e amor absoluto em todos os momentos, por confiarem em mim, apoiarem minhas decisões e fazer dos meus sonhos e objetivos também os de vocês. Aos meus irmãos, Dayane, Denis e Dryeli, que, independentemente da distância, estão sempre presentes. Obrigada pela força e apoio incondicional. Nunca estive sozinho, pois vocês sempre estiveram comigo.

Ao meu filho Gael, que ainda não compreende o que é uma tese, obrigada pelo carinho e amor incondicional. Que eu possa sempre ser motivo de orgulho para você. Ao meu marido Ricardo, obrigada por compartilhar esse sonho. Sua ajuda nos experimentos foi fundamental. Que cada conquista a partir daqui seja um reflexo do nosso esforço conjunto e do amor que nos une.

Agradeço à minha orientadora, Professora Oscarina Viana de Sousa, pela sensibilidade, apoio incondicional e compreensão que sempre e em qualquer momento me ofereceu. Além da orientação, agradeço a confiança e por ser essa excelente amiga e profissional. Sou muito grata por toda a experiência que adquiri. Uma profissional genial e um ser humano incrível! Obrigada por me acolher com tanto carinho em seu laboratório. Sem a sua ajuda essa caminhada seria muito mais difícil. Serei eternamente grata por todo o apoio. Você é minha inspiração.

Agradeço aos membros da banca examinadora – aos professores Rodrigo Maggioni e Esaú Aguiar, e às professoras Gleire Rodrigues e Cristiane Teles – pela disponibilidade e pelas valiosas sugestões e colaborações para este trabalho.

Às amigas Jade Abreu e Jéssica Lucinda, que cada uma em uma fase desse processo, foram fundamentais na execução dos testes laboratoriais desse trabalho, sempre atenciosas e dispostas a ajudar tanto no laboratório quanto fora dele. Obrigada, além da execução dos testes e dos ensinamentos em microbiologia, pela amizade e paciência que tiveram comigo sempre. A amizade de vocês se tornou muito importante para mim. Obrigada por tudo.

À Cristiane Teles, obrigada pelo encorajamento, paciência, compreensão e constante disponibilidade, que foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Muito obrigada por todo apoio e amizade.

À Marina Torres e Profa. Gleire Menezes pelas palavras sábias em todos os momentos e pela ajuda sempre prestada. Obrigada por serem sempre tão solícitas em compartilhar conhecimentos e informações sempre que precisei. Meu muito obrigada.

À Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) e ao professor Júnior Bessa pelas instalações físicas do Setor de Aquicultura para realização dos experimentos finais. Aos alunos Cayky, Victor, André e ao técnico de campo Samuel que me auxiliaram nos experimentos *in vivo* sendo fundamentais nesta etapa.

Ao Instituto de Ciências do Mar e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais pela infraestrutura e pelos ensinamentos transmitidos ao longo dessa caminhada. Um agradecimento especial à secretária da PPGCMT, Isabela Agadir Abreu, pela sua atenção, incentivo e torcida desde a seleção, mas sobretudo pelo apoio durante essa fase final, na gestão dos procedimentos administrativos que possibilitou que tudo se tornasse possível.

A todos os integrantes e ex-integrantes do LAMAP, sou grata pelo acolhimento. É uma honra ter convivido com tantas pessoas incríveis e recebido a ajuda de vocês. em vocês, certamente, não conseguiria. E um agradecimento em especial, a técnica de laboratório Anna Luísa Brito que me ajudou nas análises no laboratório e que compartilhou comigo esses meus vários momentos de desespero durante esses anos.

A todos, sem exceção, o meu muito obrigada.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

RESUMO

O estudo teve como objetivo verificar a eficácia de diferentes probióticos comerciais utilizados na carcinicultura, avaliando sua viabilidade, segurança e efeito sob diversas condições ambientais, além de sua contribuição para a melhoria da qualidade da água, eficiência zootécnica e sanidade dos animais. O estudo foi dividido em dois capítulos, compreendendo quatro etapas. No primeiro capítulo, a primeira etapa consistiu em um levantamento de informações por meio de entrevistas com produtores de camarão sobre o uso e manejo de probióticos comerciais, abordando perfis de uso e efeitos no desempenho dos cultivos. Na segunda etapa, os principais probióticos comerciais mencionados pelos produtores nas entrevistas foram avaliados quanto a viabilidade dos agentes bioativos e segurança dos produtos. No segundo capítulo, terceira etapa, bactérias autóctones do ambiente de cultivo foram isoladas e selecionadas para formação de consórcios probióticos. Na quarta e última etapa, foram testados *in vivo* o efeito desses consórcios e dos produtos comerciais no desempenho zootécnico do camarão marinho *P. vannamei* e na qualidade de água do cultivo. Os resultados do primeiro capítulo confirmam que alterações nos protocolos de aplicação e as diferentes estratégias no uso dos probióticos interferem sobre os parâmetros de cultivo, especialmente a sobrevivência dos animais. Embora estejam dentro dos limites estabelecidos na legislação brasileira, os produtos probióticos analisados apresentaram quantidades inferiores às declaradas nos rótulos. Dos produtos testados, apenas dois atenderam ao número de células bacterianas declaradas. Além disso, foi comprovada a ausência de cepas indicadas pelo fabricante em um dos produtos, o que provavelmente reduziu sua eficácia e seus benefícios para o cultivo e o bem-estar dos animais. Todos os probióticos comerciais analisados apresentaram alta variabilidade de desempenho quando expostos a diferentes salinidades do meio. No capítulo 2, a partir dos isolados bacterianos autóctones com potencial probiótico foram elaborados dois consórcios bacterianos para aplicação em testes *in vivo*. A escolha dos grupos bacterianos para cada consórcio baseou-se nos benefícios necessários aos organismos cultivados, resultando na seleção de dois consórcios de cepas autóctones com potencial probiótico: um composto por *Bacillus* e outro por bactérias oxidadoras. O isolamento e a seleção de linhagens probióticas autóctones contribuíram para o aumento do desempenho em crescimento, sobrevivência e biomassa, além de promover melhorias na qualidade da água de cultivo. Nos testes *in vivo*, verificou-se diferença significativa no peso médio, ganho de peso semanal, sobrevivência e produtividade em kg/ha dos camarões cultivados. Entre os dois probióticos autóctones testados, o P6, formulado com bactérias oxidadoras, demonstrou maior eficácia no desempenho

zootécnico e na qualidade da água, seguido pelo probiótico comercial P3, composto por *Bacillus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae*. com sabedoria para maximização de seus efeitos combinados e aproveitamento máximo dos seus benefícios. As bactérias isoladas para os dois consórcios microbianos apresentaram propriedades probióticas *in vitro*, como capacidade de inibir patógenos e resistência a estresses; contudo, apenas uma delas superou os probióticos comerciais nos testes *in vivo*, com efeitos significativos sobre sobrevivência, crescimento e nos parâmetros de qualidade de água.

Palavras-chave: Camarão cultivado; Biotecnologia; Bactérias benéficas; Bactérias nitrificantes

ABSTRACT

The study aimed to assess the effectiveness of different commercial probiotics used in shrimp farming, evaluating their viability, safety, and impact under various environmental conditions, as well as their contribution to water quality improvement, zootechnical efficiency, and animal health. The study was divided into two chapters comprising four stages. In the first chapter, the initial stage involved gathering information through interviews with shrimp producers on the use and management of commercial probiotics, focusing on usage profiles and effects on culture performance. In the second stage, the primary commercial probiotics mentioned by producers were assessed for the viability of bioactive agents and product safety. In the second chapter, stage three involved isolating and selecting indigenous bacteria from the culture environment to form probiotic consortia. In the fourth and final stage, the effects of these consortia and commercial products on the zootechnical performance of the marine shrimp *P. vannamei* and water quality were tested *in vivo*. The results of the first chapter confirm that variations in application protocols and different probiotic usage strategies influence culture parameters, especially animal survival. Although the products were within the limits established by Brazilian regulations, the probiotics analyzed presented lower quantities than those declared on the labels. Of the tested products, only two met the declared bacterial cell count. Additionally, the absence of manufacturer-indicated strains was confirmed in one product, likely reducing its effectiveness and benefits for animal welfare and cultivation. All commercial probiotics analyzed showed high performance variability when exposed to different environmental salinities. In chapter 2, two bacterial consortia with probiotic potential were developed from indigenous bacterial isolates for *in vivo* application. The selection of bacterial groups for each consortium was based on the desired benefits for the cultured organisms, resulting in two consortia with probiotic potential: one composed of *Bacillus* species and the other of oxidizing bacteria. The isolation and selection of indigenous probiotic strains contributed to enhanced growth, survival, and biomass performance, in addition to improving water quality. In the *in vivo* tests, significant differences were observed in the average weight, weekly weight gain, survival, and productivity (kg/ha) of the cultivated shrimp. Among the two indigenous probiotics tested, P6, formulated with oxidizing bacteria, demonstrated higher efficacy in zootechnical performance and water quality, followed by the commercial probiotic P3, composed of *Bacillus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, and *Saccharomyces cerevisiae*. The isolated bacteria for the two microbial consortia demonstrated *in vitro* probiotic properties, such as pathogen inhibition and stress resistance. However, only one strain surpassed

the commercial probiotics in the *in vivo* tests, showing significant effects on survival, growth, and water quality parameters.

Keywords: Cultured shrimp; Biotechnology; Beneficial bacteria; Nitrifying bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas para desenvolvimento e seleção de um probiótico.....	31
Figura 2 - Localização da área de estudo e distribuição dos estabelecimentos analisados segundo o município de localização ao longo do litoral nordestino.....	43
Figura 3 – Figura 3 - Distribuição do número de estabelecimentos de acordo com a forma de aplicação do probiótico nos cultivos de camarão.....	50
Figura 4 – Frequência de citação de marcas comerciais de probióticos pelos produtores entrevistados	51
Figura 5 – Estratégias de aplicação de produtos probióticos adotadas pelos produtores.....	55
Figura 6 – Relação entre o manejo de ativação do probiótico empregado e a sobrevivência de cultivo registradas nos empreendimentos avaliados.....	56
Figura 7 - Comparação de contagens bacterianas viáveis nos produtos probióticos testados.....	61
Figura 8 – Percentual por grupo bacteriano isolado das culturas das bactérias encontradas nos diferentes probióticos comerciais estudados.....	65
Figura 9 – Crescimento bacteriano dos diferentes probióticos em diferentes concentrações de salinidade estudadas no tempo 0 e 72 h.	67
Figura 10 – Percentual de crescimento nas diferentes salinidades para os grupos <i>Bacillus</i> e oxidadoras.	94
Figura 11 – Percentual de amostras classificadas de acordo com caracterização fenotípica em produtoras (positivo) e não produtoras de biofilme (negativo).	96
Figura 12 – Distribuição das cepas de acordo com os fenótipos de virulência expressos para os diferentes grupos.....	98
Figura 13 – Percentual de resistência das estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das bactérias oxidadoras testadas frente aos antimicrobianos (Ácido nalidíxico e Cloranfenicol)	100
Figura 14 – Perfil de atividade antagonismo contra os patógenos testados para os diferentes grupos.....	102
Figura 15 - Acompanhamento da viabilidade em Log UFC/mL dos dois probióticos autóctones elaborados em cada fase do desenvolvimento dos produtos.	106
Figura 16 - Concentração de Clorofila a e Feofitina a no cultivo do camarão <i>P. vannamei</i> com adição de probióticos.....	109
Figura 17 - Densidade dos organismos fitoplanctônicos (%) entre os diferentes tipos de probióticos utilizados no estudo.....	111
Figura 18 - Concentrações de amônia, nitrito e nitrato registradas na água de cultivo do camarão <i>Penaeus vannamei</i> durante o estudo de avaliação do uso de probióticos.....	113

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Contagem das bactérias viáveis nos produtos probióticos testados.....	48
Equação 2 - Equação utilizada para o cálculo do rendimento da recuperação bacteriana.....	85
Equação 3 - Peso médio final (g)	89
Equação 4 - Ganho de peso	89
Equação 5 - Ganho de peso semanal.....	89
Equação 6 - Biomassa final (g)	89
Equação 7 - Taxa de crescimento específico (%).....	89
Equação 8 - Sobrevivência (%).....	89
Equação 9 - Produtividade (Kg/ha)	89
Equação 10 - Fator de conversão alimentar (FCA)	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes espécies de bactérias probióticas utilizados na aquicultura e seus benefícios.....	25
Tabela 2 - Caracterização dos produtos comerciais probióticos utilizados no estudo com gentes ativos e suas concentrações (UFC/g) indicativos do rotulo.....	45
Tabela 3 - Classificação das fazendas de camarão que participaram do estudo de acordo com o porte do empreendimento.....	49
Tabela 4 – Identificação dos principais probióticos comerciais utilizados pelos produtores entrevistados.....	52
Tabelas 5 – Principais informações compartilhadas entre os produtores sobre os produtos probióticos.....	53
Tabela 6 - Associação entre o uso de probióticos com o percentual de sobrevivência registrada nos empreendimentos.....	54
Tabela 7 – Comparação das reivindicações de conteúdo apresentadas nos rótulos dos produtos comerciais com os resultados das contagens bacterianas viáveis para cada probiótico testado.....	62
Tabela 8 – Distribuição total dos microrganismos encontrados nos probióticos comerciais de acordo com a observação por microscopia.....	64
Tabela 9 - Características limnológicas da água coletada na fazenda de cultivo de camarão marinho para o desenvolvimento do probiótico autóctone.....	73
Tabela 10 – Composição de meios seletivos para quantificação dos grupos de bactérias participantes do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos.....	75
Tabelas 11 – Agentes antimicrobianos e diâmetros de zona interpretativa para teste de sensibilidade a antibióticos por difusão de disco.....	81
Tabela 12 – Parâmetros de balanço iônico da água utilizado no experimento.....	86
Tabela 13 – Caracterização das rações comerciais utilizadas no experimento.....	87
Tabela 14 – Média das contagens das populações bacterianas analisadas.....	91
Tabela 15 – Caracterização microbiana da amostra de água da fazenda de cultivo de camarão.....	92
Tabela 16 – Número de isolados tolerantes às diferentes condições de pH, temperatura e salinidade.....	93
Tabela 17 – Padrão de comportamento frente a antimicrobianos nas bactérias isoladas em amostra de água de um sistema fechado de cultivo de camarão marinho.....	100
Tabela 18 – Caracterização das bactérias selecionadas para a formação dos consórcios.....	104
Tabela 19 – Comparação dos resultados das contagens bacterianas viáveis (UFC/ml) para cada fase do desenvolvimento do probiótico.....	105
Tabela 20 - Descrição das variáveis físico-químicas (média±DP) para os parâmetros de temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido.....	108
Tabela 21 - Descrição dos parâmetros de desempenho zootécnico entre os tratamentos (média±DP).....	114

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. HIPÓTESE	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
4.1. Probióticos na Aquicultura: avanços e modo de ação	23
4.2. Estratégias de administração dos probióticos	26
4.3. Desenvolvimento de produtos probióticos	28
4.4. Desempenho dos probióticos no cultivo de camarão	32
4.4.1. Desempenho de crescimento e taxa de sobrevivência	33
4.4.2. Melhor aproveitamento de nutrientes	33
4.4.3. Qualidade de água.....	34
4.4.4. Sanidade dos animais.....	36

DESENHO METODOLOGICO.....	39
---------------------------	----

Capítulo I - Probióticos comerciais na carcinicultura - Análise de viabilidade bacteriológica, conteúdo microbiano e eficácia em condições comerciais de cultivo.

5. INTRODUÇÃO	40
6. MATERIAL E MÉTODOS	43
6.1. Entrevistas	43
6.1.1 Delineamento de pesquisa	43
6.1.2 Análise de dados	44
6.2. Avaliação dos Probióticos comerciais.....	45
6.2.1 Delineamento experimental	45
6.2.2 Análises Microbiológicas	46
6.2.3 Processamento das amostras	46
6.2.4. Isolamento e identificação das colônias microbianas	47
6.2.5. Análise de dados	48
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
7.1. Entrevistas	49
7.2. Experimentos <i>in vitro</i>	58
7.2.1. Avaliação da rotulagem dos produtos	58
7.2.2. Viabilidade e quantificação microbiana.....	60
7.2.3. Composição das bactérias dos produtos probióticos comerciais	63
7.2.4. Viabilidades dos probióticos comerciais em diferentes salinidades	66
8. CONCLUSÕES	69

Capítulo II - Efeito dos probióticos autóctones e comerciais bactérias sobre o desempenho produtivo do camarão marinho *P. vannamei* e na melhoria na qualidade de água do cultivo.

9. INTRODUÇÃO	70
10. MATERIAL E MÉTODOS	72
10.1. Desenvolvimento de Probiótico autóctone	72
10.1.1. Coleta e processamento da amostra	72
10.1.2. Isolamento e identificação das colônias.....	76
10.1.3. Critérios empregados para a seleção de cepas probióticas	76
10.1.3.1. Testes de estabilidade a estresse.....	76
10.1.3.1.1. <u>Teste de Termorresistência</u>	76
10.1.3.1.2. <u>Teste de crescimento em diferentes pHs</u>	77

10.1.3.1.3. <u>Teste de crescimento em diferentes salinidades</u>	77
10.1.3.2. Caracterização fenotípica	77
10.1.3.2.1. <u>Teste de formação de exopolissacarídeos (EPS)</u>	77
10.1.3.2.2. <u>Teste de aderência em microplaca de poliestireno (TMC)</u>	78
10.1.3.3. Detecção da atividade enzimática	78
10.1.3.3.1. <u>Caseínase</u>	79
10.1.3.3.2. <u>Gelatinase</u>	79
10.1.3.3.3. <u>Amilase</u>	79
10.1.3.3.4. <u>Celulase</u>	80
10.1.3.3.5. <u>Hemólise</u>	80
10.1.3.4. Antibiograma	81
10.1.3.5. Testes de atividade antagonista.....	82
10.1.3.5.1. <u>Teste de antagonismo entre as cepas</u>	82
10.1.3.5.1.1. Técnica de estrias cruzadas (cross streak)	82
10.1.3.5.1.2. <u>Plugs de ágar</u>	83
10.1.3.5.2. <u>Teste de antagonismo contra patógenos</u>	83
10.1.4. Formação dos consórcios bacterianos probióticos	83
10.1.4.1. Determinação da densidade bacteriana	84
10.1.4.2. Liofilização.....	84
10.1.4.3. Viabilidade das células após liofilização	85
10.1.5 Análise de dados	85
10.2. Experimento <i>In vivo</i>	86
10.2.1. Delineamento experimental	86
10.2.2. Manejo alimentar	87
10.2.3. Parâmetros físico-químicos	88
10.2.4. Desempenho zootécnico	88
10.2.5. Análise de dados	90
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
11.1. Probióticos autóctones	91
11.1. 1. Quantificação e Isolamento das bactérias do cultivo	91
11.1. 2. Critérios empregados para a seleção de cepas probiótica	92
11.1.2.1. Testes de estabilidade a estresse	92
11.1.2.2. Caracterização fenotípica	96
11.1.2.3. Detecção da atividade enzimática	97
11.1.2.4. Antibiograma	99
11.1.2.5. Testes de atividade antagonista	101
11.1.3. Formação dos consórcios bacterianos probióticos	103
11.1.4. Viabilidade e rendimento dos consórcios formados	105
11.2. Experimento <i>In vivo</i>	107
10.2.1. Qualidade de água	107
10.2.2. Desempenho Zootécnico	114
12. CONCLUSÕES	117
13. CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	141
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	143
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	145

1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura se desenvolveu consideravelmente em diversos países, tornando-se cada vez mais competitiva e intensiva para atender à crescente demanda do mercado (SIEW *et al.*, 2023, MACUSI *et al.*, 2022). Esse processo levou à necessidade de intensificar o cultivo para aumentar a produtividade e escala (PANDIYAN *et al.*, 2013; PEDROZA FILHO; ROUTLEDGE, 2016). No entanto, com essa intensificação os camarões são expostos a condições estressantes devido à rápida deterioração da qualidade da água e do solo, o que favorece o surgimento de infecções bacterianas e virais, reduzindo significativamente a produtividade e causando grandes prejuízos econômicos (BOYD; TUCKER, 1998; TELLI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016; BANERJEE; RAY, 2017).

O controle de doenças na aquicultura baseava-se, convencionalmente, no uso de compostos químicos e antibióticos (PANDIYAN *et al.*, 2013; KNIPE *et al.*, 2021, MORUF; USMAN, 2023). Por muito tempo, os antibióticos foram a principal forma de combate a doenças em animais aquáticos cultivados (ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016; AMJAD *et al.*, 2022; AMIIN *et al.*, 2023). Contudo, seu uso como medida preventiva é questionável, pois gera consequências negativas, como o surgimento de bactérias resistentes, impacto ambiental e resíduos químicos nos tecidos dos animais, o que representa riscos à saúde humana (CABELLO, 2006; VIEIRA *et al.*, 2009; TELLI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016). Essa situação levou a fortes críticas sobre a segurança e eficácia desses produtos na aquicultura (OLIVEIRA *et al.*, 2002, MOURIÑO *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2022).

Na busca por soluções mais amigáveis ao meio ambiente, produtos com base biotecnológica vêm sendo empregados de forma preventiva na melhoria da qualidade da água e sanidade animal (ANJUGAM *et al.*, 2018; MIDHUN, *et al.*, 2019; ELUMALAI *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2021). Estes bioprodutos, denominados probióticos, são compostos por microrganismos individuais ou em consórcio que, ao serem administrados, agem no sistema digestivo para equilibrar a microbiota intestinal, promovendo melhor digestão, absorção de nutrientes e fortalecendo a imunidade do animal contra patógenos ambientais (GATESOUBE, 1999, SHEFAT, 2018, VOGLEY *et al.*, 2019, RINGØ, 2020).

Os organismos aquáticos têm uma relação estreita com o ambiente em que vivem, de forma que a saúde desse ambiente influencia diretamente o desempenho deles (KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008; BARBIERI *et al.*, 2016; KEWCHAROEN; SRISAPOOME, 2019). Deste modo, para alguns autores, o efeito do probiótico não está restrito somente aos animais no cultivo, mas também ao próprio ambiente, promovendo a remediação do sistema através da

manutenção das variáveis físico-químicas da água e, conseqüentemente, proporcionando o bem-estar dos animais cultivados (FARZANFAR, 2006; FLORES-VALENZUELA *et al.*, 2021; AMJAD *et al.*, 2022; AMIIN *et al.*, 2023). Os efeitos positivos dos probióticos incluem a maior decomposição de matéria orgânica, a redução de nitrogênio, fósforo e amônia, o que diminui a ocorrência de doenças, aumenta a sobrevivência dos animais e, conseqüentemente, a produção. (GATESOUBE, 1999, ZOKAEIFAR *et al.*, 2014; MADANI *et al.*, 2018; VOGLEY *et al.*, 2019, WON *et al.*, 2020).

Existem diversos produtos probióticos comerciais disponíveis no mercado para emprego na aquicultura (AKHTER *et al.*, 2015; MIANDARE *et al.*, 2016). Porém, a diversidade da microbiota nos ambientes de cultivo torna a seleção desses produtos complexa, o que gera dúvidas sobre a real eficácia de seus benefícios (MOURIÑO *et al.*, 2012). Para se obter a eficácia na aplicação desses, é essencial considerar previamente fatores como a concentração e o modo de ação das bactérias empregadas, a forma de aplicação, a estratégia de fornecimento, além de um profundo entendimento dos desafios ambientais e dos patógenos predominantes no cultivo. Nesse contexto, o uso de cepas probióticas isoladas de ambientes naturais pode representar um avanço no emprego dessa biotecnologia (CASTRO *et al.*, 2015; LAZADO; CAIPANG, 2014; ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016).

O uso de produtos especializados e com eficácia comprovada pode aumentar as chances de sucesso e evitar longos processos de testes quanto ao uso dos produtos microbianos. Assim, este estudo buscou verificar a eficácia de diferentes probióticos usados na aquicultura, avaliando sua viabilidade e segurança. O objetivo foi comparar seus efeitos em diversas condições ambientais e observar como contribuem para a melhoria da qualidade da água, eficiência no cultivo e saúde dos animais, em comparação aos probióticos autóctones.

2. HIPÓTESE

- As alterações nos protocolos e diferentes de aplicação de probióticos podem impactar negativamente no seu desempenho, reduzindo a eficácia para a melhoria da qualidade da água, eficiência zootécnica e sanidade dos animais.
- O uso de cepas probióticas autóctones do ambiente de cultivo pode oferecer melhores resultados diante dos desafios enfrentados nos cultivos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia de diferentes probióticos empregados na carcinicultura, analisando a viabilidade e segurança dos produtos, comparando o efeito dos probióticos comerciais e autóctones e sua contribuição para a melhoria da qualidade da água e da eficiência zootécnica.

3.2. Objetivos específicos

Capitulo I

- Avaliar se as práticas de uso e manejo dos probióticos adotadas pelos produtores influenciam os resultados de cultivo;
- Analisar o impacto de alterações nos protocolos de aplicação recomendados pelos fabricantes na eficácia dos probióticos;
- Verificar a conformidade dos probióticos comerciais com as informações e indicações dos rótulos;
- Examinar a viabilidade e estabilidade dos probióticos comerciais sob diferentes condições de ativação.

Capitulo II

- Isolar e caracterizar bactérias autóctones de águas de cultivo de camarão marinho com potencial probiótico;
- Desenvolver consórcios probióticos autóctones a partir de isolados bacterianos com interações harmônicas;
- Avaliar a eficácia de probióticos comerciais e autóctones na qualidade da água e no desempenho zootécnico dos camarões por meio de testes *in vivo*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O cultivo de camarão marinho, embora relativamente recente em comparação com outros segmentos da aquicultura, constitui o principal vetor de desenvolvimento de tecnologias e serviços para o setor aquícola mundial, favorecendo seu crescimento de forma acelerada em diversos países (NATORI *et al.*, 2011; ROCHA, 2014; TAHIM *et al.*, 2019, FAO, 2022). De acordo com dados da FAO (2023), a carcinicultura é uma das atividades aquícolas que mais se expandiu mundialmente nas últimas décadas, com uma taxa média de crescimento de 8,99% entre 2016 e 2020. Essa atividade concentra-se em países de costas tropicais da Ásia e América Latina, os quais respondem por 99,6% da produção mundial, com grande parte destinada à exportação (TAHIM *et al.*, 2019).

O camarão *Penaeus vannamei* é o mais cultivado mundialmente, representando 84,68% da produção de crustáceos em 2019, e a estimativa para 2023 indicava um recorde de 7,53 milhões de toneladas (FAO, 2022; XIMENES; VIDAL, 2023). No Brasil, em 2023, a produção aquícola bateu recorde com um aumento de 6,2%. A produção de camarão foi de 8,7 mil toneladas, gerando R\$ 102,5 milhões, destacando o crescimento e o potencial econômico do setor, com expectativa de expansão nos próximos anos (IBGE, 2023).

Na produção em larga escala, os camarões são expostos a condições estressantes, sobretudo devido a doenças e à deterioração das condições, o que leva a grandes prejuízos econômicos (BOYD; TUCKER, 1998; TELLI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016). Nas décadas de 1970 e 1980, antibióticos eram amplamente utilizados para controlar doenças na aquicultura (RIBEIRO *et al.*, 2008). No entanto, o uso excessivo desses produtos levou a seleção de microrganismos resistentes, propriedade que pode ser transferida para outras bactérias (CABELLO, 2006; ROMERO *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2016). Além disso, a administração de antibióticos modula a microbiota intestinal dos animais, que por sua vez exerce efeitos negativos sobre os humanos (RINGØ, 2020).

Diversas inovações foram desenvolvidas para aprimorar a produção na criação de camarões. Os probióticos, por exemplo, são bactérias benéficas que vivem no intestino do hospedeiro, promovendo saúde ao fortalecer o sistema imunológico e ajudar no desenvolvimento (KERRY *et al.*, 2018; JAHANGIRI; ESTEBAN, 2018). Essas bactérias são amplamente utilizadas na indústria de camarão e frequentemente aplicadas por meio de alimentos e suplementos (JAHANGIRI; ESTEBAN, 2018).

Füller (1989) definiu probióticos como microrganismos vivos usados como suplementos alimentares que trazem benefícios ao hospedeiro ao melhorar o equilíbrio da microbiota

intestinal. Esta definição enfatiza a importância de células vivas como um componente essencial do efeito probiótico. Posteriormente, Schrezenmeir e De Vrese (2001) ampliaram essa definição, sugerindo que o termo "probiótico" deveria ser usado para produtos que contenham microrganismos vivos em quantidade adequada e que modifiquem a microbiota das mucosas ao colonizar o sistema do hospedeiro, promovendo benefícios à sua saúde.

As definições de probióticos normalmente focam apenas em animais terrestres, sem observar o fato de que a microbiota intestinal de um organismo aquático, especialmente os criados em cativeiro, a microbiota intestinal está fortemente relacionada com a do ambiente no qual esse está inserido (MERRIFIELD *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015). Na aquicultura, essa relação entre microrganismos e o hospedeiro vai além do equilíbrio intestinal. Com isso em mente, Verschuere *et al.* (2000) definiram probióticos como suplementos microbianos vivos que beneficiam o hospedeiro ao alterar a comunidade microbiana tanto no organismo quanto em seu ambiente.

O uso contínuo de bactérias probióticas pode alterar a comunidade microbiana, promovendo o crescimento de bactérias benéficas e reduzindo patógenos oportunistas (SAAD, 2006). Isso resulta em respostas imunes melhores dos hospedeiros, maior resistência a doenças (NEWAJ-FYZUL; AUSTIN, 2015), menor estresse (WON *et al.*, 2020), além de melhorar o crescimento e a sobrevivência (VOGELEY *et al.*, 2019) e fornecer nutrientes essenciais aos animais (MADANI *et al.*, 2018).

4.1. Probióticos na Aquicultura: avanços e modo de ação

Apesar de relativamente recentes na aquicultura, estes produtos funcionais vêm ganhando popularidade entre os produtores, principalmente por melhorar a saúde e o desempenho zootécnico dos camarões cultivados, e pela possibilidade de complementar ou substituir os compostos quimioterápicos (VOGELEY *et al.*, 2019, RINGØ, 2020). Compreender seus mecanismos de ação e formas de uso é imprescindível para a correta aplicação destas tecnologias. Sua correta aplicação pode melhorar a eficiência produtiva do setor e ainda mitigar as ameaças ao meio ambiente e a diversidade biológica (DEVARAJA *et al.*, 2013, KUMAR *et al.*, 2016).

Os probióticos agem principalmente ao modificar a microbiota intestinal, favorecendo o equilíbrio e a saúde do hospedeiro, além de prevenir o crescimento de patógenos (GHADBAN, 2002; BUSANELLO, 2012). Eles proporcionam benefícios adicionais, tais como a exclusão de patógenos por competição, fornecimento de nutrientes, maior atividade enzimática, melhor

qualidade da água e fortalecimento da resposta imunológica do hospedeiro (BALCÁZAR *et al.*, 2006; MERRIFIELD *et al.*, 2010; LAZADO; CAIPANG, 2014; WU *et al.*, 2014; SHEFAT, 2018, VOGLEY *et al.*, 2019, RINGØ, 2020).

Diversas cepas bacterianas probióticas têm sido consideradas para uso na aquicultura como *Aeromonas* (IRIANTO; AUSTIN 2002), *Bacillus* (VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003; ADEL *et al.*, 2017b; WON *et al.*, 2020; RINGØ, 2020), *Enterococcus* (CHANG; LIU, 2002), *Lactocacillus* (JATOBÁ *et al.*, 2008, NIKOSKELAINEN *et al.*, 2001), *Vibrio alginolyticus* (AUSTIN *et al.*, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (VIDAL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019; VOGLEY *et al.*, 2019, *Enterococcus* (SHEFAT, 2018; RINGØ, 2020), *Lactobacillus* sp (KHAN; MAHMUD, 2015; KARTHIK; BHAVAN, 2018; ZUO *et al.*, 2019; RINGØ, 2020). Os diferentes microrganismos empregados possuem mecanismo de ação e características bastante variadas com relação a sua capacidade de promover diferentes benefícios ao hospedeiro e ao ambiente (MERRIFIELD *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015; BALCÁZAR *et al.*, 2016).

Um mecanismo de ação importante das bactérias probióticas é a competição por locais de adesão. Elas reduzem a carga bacteriana ao formar uma barreira contra patógenos, competindo por nutrientes e prevenindo a colonização de bactérias nocivas (CHABRILLON *et al.*, 2005; BUSANELLO, 2012; LAZADO; CAIPANG, 2014; AKHTER *et al.*, 2015). Além disso, os probióticos modulam as citocinas liberadas pelas células imunes inatas e adaptativas (LAZADO; CAIPANG, 2014), melhoram a digestibilidade dos alimentos por meio de enzimas como alginato-liases, amilases e proteases (VERSCHUERE *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2011) e aumentam a produção de nutrientes, como ácidos graxos e vitaminas, beneficiando a saúde dos animais e a qualidade da água (BALCÁZAR *et al.*, 2006; VINE; LEUKES; KAISER, 2006; SUGIMURA; HAGI; HOSHINO, 2011). Tais características auxiliam na eficiência alimentar e no ganho de peso dos camarões, sendo benefícios chave na aquicultura (PANDEY, NAIK, VAKIL, 2015).

A Tabela 1 reúne informações sobre as bactérias mais frequentemente citadas na literatura como agentes probióticos na carcinicultura e seus modos de ação.

Tabela 1 – Diferentes espécies de bactérias probióticas utilizados na aquicultura e seus benefícios.

Microrganismos	Espécies de camarão	Efeitos benéficos	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Won <i>et al.</i> (2020); Zokaeifar <i>et al.</i> (2014); Madani <i>et al.</i> (2018); Vogeley <i>et al.</i> (2019)
	<i>P. vannamei</i>	Resistência a doenças	Zokaeifar <i>et al.</i> (2014); Vogeley <i>et al.</i> (2019)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da resposta imune	Won <i>et al.</i> (2020); Vogeley <i>et al.</i> (2019); Zokaeifar <i>et al.</i> (2014); Madani <i>et al.</i> (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da atividade enzimática	Zokaeifar <i>et al.</i> (2014)
	<i>P. vannamei</i>	Melhora eficiência alimentar	Madani <i>et al.</i> (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Composição corporal	Madani <i>et al.</i> (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Imunidade aumentada e maior resistência contra <i>V. Harveyi</i>	Zokaeifar <i>et al.</i> (2012)
	<i>P. vannamei</i>	Proteção contra vibriose	Das <i>et al.</i> (2006)
	<i>P. vannamei</i>	Manutenção da qualidade de água	Hlordzi <i>et al.</i> (2020); Liu <i>et al.</i> (2022); Mehla <i>et al.</i> (2023)
	<i>P. vannamei</i>	Mortalidade reduzida	Liu <i>et al.</i> (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Madani <i>et al.</i> (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Melhora eficiência alimentar	Madani <i>et al.</i> (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Manutenção da qualidade de água	Hlordzi <i>et al.</i> (2020); Mehla <i>et al.</i> (2023)
	<i>P. vannamei</i>	Composição corporal	Madani <i>et al.</i> (2018)
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>P. vannamei</i>	Aumento da resposta imune	Won <i>et al.</i> (2020)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Won <i>et al.</i> (2020)
	<i>P. vannamei</i>	Resistência a doenças	Adel <i>et al.</i> (2017a)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Adel <i>et al.</i> (2017a)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>P. stylirostris</i>	Status antioxidante	Castex <i>et al.</i> (2010)
	<i>P. stylirostris</i>	Resistência a doenças	Castex <i>et al.</i> (2010)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Adel <i>et al.</i> (2017a)
	<i>P. vannamei</i>	Melhora eficiência alimentar	Adel <i>et al.</i> (2017a)
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>P. vannamei</i>	Melhora da imunidade, alteração da microbiota intestinal e resistentes avírus da síndrome da mancha branca	Li <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus sp</i>	<i>P. vannamei</i>	Imunoestimulante Manutenção da qualidade de água	Gullian <i>et al.</i> (2004) Cha <i>et al.</i> (2013); Mehla <i>et al.</i> (2023)
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>P. vannamei</i>	Aumento da resposta imune	Won <i>et al.</i> (2020); Adel <i>et al.</i> (2017b)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Won <i>et al.</i> (2020); Adel <i>et al.</i> (2017b)
	<i>M. japonicus</i>	Regulação da expressão gênica	Maeda <i>et al.</i> (2014); Ringø (2020);
	<i>M. japonicus</i>	Resistência a doenças	Maeda <i>et al.</i> (2014); Adel <i>et al.</i> (2017b); Ringø (2020);
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da atividade enzimática	Adel <i>et al.</i> (2017b)
<i>Bacillus circulans</i>	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Vogeley <i>et al.</i> (2019)

	<i>P. vannamei</i>	Resistência a doenças	Vogeley <i>et al.</i> (2019)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da resposta imune	Vogeley <i>et al.</i> (2019)
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>P. vannamei</i> <i>F. brasiliensis</i>	Manutenção da qualidade de água Resistência a doenças e aumento da sobrevivência	Mehla <i>et al.</i> (2023) Silva <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Camarões e peixe</i>	Aumento do Crescimento e sobrevivência e manutenção da qualidade de água	Dias <i>et al.</i> (2018)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>P. vannamei</i>	Resistência a doenças	Vidal <i>et al.</i> (2018); Wang <i>et al.</i> (2019)
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>P. monodon</i>	Aumento do Crescimento	Shefat (2018); Ringø (2020)
	<i>P. monodon</i>	Resistência a doenças	Shefat (2018); Ringø (2020)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Ringø (2020)
	<i>P. monodon</i>	Protege contra <i>V. harveyi</i> e <i>V. parahaemolítico</i>	Swain <i>et al.</i> (2009)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da sobrevivência	Swain <i>et al.</i> (2009); Ringø (2020)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da resposta imune	Swain <i>et al.</i> (2009); Ringø (2020)
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>P. vannamei</i>	Redução da carga bacteriana	Ringø (2020); Karthik <i>et al.</i> (2014); Karthik <i>et al.</i> (2015)
	<i>P. monodon</i>	Aumento do Crescimento	Ringø (2020)
	<i>P. monodon</i>	Aumento da sobrevivência	Ringø (2020)
	<i>P. monodon</i>	Resistência a doenças	Ringø (2020)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento do Crescimento	Ringø (2020); Zuo <i>et al.</i> (2019); Khan; Mahmud (2015); Karthik; Bhavan (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Aumento da atividade enzimática	Ringø (2020); Zuo <i>et al.</i> (2019); Karthik; Bhavan (2018)
	<i>P. vannamei</i>	Resistência a doenças	Ringø (2020); Zuo <i>et al.</i> (2019); Khan; Mahmud (2015)
	<i>M. rosenbergii</i>	Aumenta a sobrevivência, o crescimento e níveis de constituintes bioquímicos	Seenivasan <i>et al.</i> (2012)
<i>Streptomyces</i>	<i>P. monodon</i>	Aumento do crescimento melhora da qualidade de água	Das <i>et al.</i> (2006); Newaj-Fyzule <i>et al.</i> (2014)
<i>Streptococcus phocae</i>	<i>P. monodon</i>	Aumenta o crescimento dos animais e proteção contra infecção com <i>V. harveyi</i>	Swain <i>et al.</i> (2009)
<i>Arthrobacter</i>	<i>P. vannamei</i>	Altera microbiota intestinal	Li <i>et al.</i> (2009)

Fonte - Elaborado pelo autor

4.2. Estratégias de administração dos probióticos

Os benéficos dos probióticos no cultivo de camarão dependem de vários fatores, como condições de criação, método de aplicação, dosagem, cepa probiótica e espécie de camarão (SAAD, 2006; TOLEDO *et al.*, 2019). O modo de aplicação é essencial para a eficácia dos probióticos e pode ser feito diretamente na água, na ração ou em alimento vivo (FERREIRA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

Embora a alimentação seja a forma mais eficiente de administrar probióticos, eles também podem ser utilizados diretamente na água de cultivo, causando efeitos benéficos ao ambiente e ao hospedeiro (KENNEDY *et al.*, 1998; MORIARTY, 1998, ZHOU *et al.*, 2010, FONSECA *et al.*, 2020). Podem ainda ser aplicados em alimento artificial ou em organismos como rotíferos e artêmias na fase larval (MORIARTY, 1998; PICCHIETTI *et al.*, 2007; 2009).

Algumas cepas probióticas, como biocontroladoras e bioremediadoras, atuam principalmente no ambiente de cultivo, controlando patógenos e melhorando a qualidade da água e solo (VERSCHUERE *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2016). As biocontroladoras são antagônicas a patógenos e não colonizam o trato gastrointestinal, diminuindo a carga de bactérias patogênicas no ambiente de cultivo (solo e água). Já as cepas bioremediadoras irão remediar algum problema na água, seja transformando amônia em nitrato, mineralizando a matéria orgânica, melhorando assim os parâmetros de qualidade de água. Dessa forma, uma cepa pode apresentar mais de uma ação e atender a critérios simultaneamente, como, por exemplo, decompondo a matéria orgânica do ambiente e produzindo compostos que diminuam a carga de bactérias patogênicas na água e no solo, além de poder ainda colonizar o trato intestinal do animal (SILVA *et al.*, 2016).

A administração de probióticos na ração é um dos métodos mais utilizados na aquicultura. A administração do probiótico na ração é um dos métodos de administração mais empregados na aquicultura, onde há a incorporação direta do produto em ração peletizada, com a aplicação dos probióticos diretamente nos *pellets* de ração (ASSEFA; ABUNNA, 2018). A administração via ração é considerada uma forma prática e viável, sendo geralmente empregadas culturas microbianas liofilizadas (BIDHAN *et al.*, 2014). A ingestão de probióticos pode alterar a composição da microbiota intestinal, oferecendo um importante aporte de enzimas digestivas e fatores de crescimento, o que resulta em melhorias na utilização dos alimentos, exclusão de patógenos potenciais e maior resposta imunológica do hospedeiro (SAAD, 2006).

Uma vantagem deste método é que o camarão obtém uma variedade microrganismos necessários. No entanto, é necessário monitorar continuamente a viabilidade dos probióticos seja verificada para garantir que a quantidade mínima necessária esteja presente, visto que pode haver perdas nas previsões durante o processamento e armazenamento (TYMCZYSZYN *et al.*, 2012, BIDHAN *et al.*, 2014).

A administração de probióticos diretamente na água de cultivo também tem mostrado resultados positivos, contribuindo para a melhora da qualidade ambiental. Esse método ajuda a reduzir as concentrações de compostos nitrogenados e fosforados, melhora os intervalos físico-

químicos da água e inibe o crescimento de microrganismos patogênicos (BALCÁZAR *et al.*, 2006, SAHU *et al.*, 2008; SHEFAT, 2018). Contudo, uma desvantagem desse método é que não se pode garantir que o camarão absorva e utilize todos os microrganismos probióticos presentes na água (HAI, 2015). Para que os compostos bacterianos tenham uma forma eficaz na água, é necessário realizar aplicações constantes, já que as condições ambientais podem mudar periodicamente e afetar a microbiota do meio (MORINIGO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2012).

4.3. Desenvolvimento de produtos probióticos

A aquicultura tem se beneficiado nas últimas décadas do uso de diversos microrganismos probióticos. Os principais incluem bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), leveduras e microalgas (RAY *et al.*, 2012; ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016; HOSEINIFAR *et al.*, 2018, RINGØ *et al.*, 2020; CAIPANG *et al.*, 2020). Os microrganismos probióticos são obtidos de diversas fontes, como intestinos de animais saudáveis, água do ambiente de criação, sedimentos em tanques de cultivo, outros animais ou alimentos fermentados (SHEFAT, 2018; AMENYOGBE, 2023).

As etapas para o desenvolvimento de produtos probióticos envolvem diversos processos, iniciando com a coleta de amostras, seguida do isolamento e seleção de cepas microbianas. Em seguida, realizam-se avaliações *in vitro*, estudos sobre características fisiológicas e, por fim, a análise dos custos e da viabilidade econômica (VERSCHUERE *et al.*, 2000; KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008). Após essas etapas, o produto que apresentar resultados satisfatórios pode ser produzido comercialmente e utilizado. Teoricamente, o candidato probiótico que atender a mais dessas características deve ser considerado o mais apropriado para uso. No entanto, é indispensável que alguns testes *in vivo* sejam realizados antes de sua aplicação em larga escala (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

Os critérios para a escolha de novas estirpes probióticas compreendem características referentes à segurança, funcionalidade, resistência e aspectos tecnológicos das culturas utilizadas na composição do produto (SAARELA *et al.*, 2000). Para que um microrganismo seja considerado um potencial probiótico, ele deve ser seguro, não apenas para o animal cultivado e o ambiente em que vive, mas também para os seres humanos. Além disso, os microrganismos devem ser inócuos, não possuir genes de resistência a antibióticos e apresentar propriedades antimutagênicas. Devem ainda ser capazes de resistir à bile, ao processo de

inoculação na ração, e suportar o tempo de armazenamento e transporte (MOURINO *et al.*, 2008; BALCÁZAR *et al.*, 2008; LAZADO; CAIPANG, 2014; AKHTER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

O ponto inicial para seleção de cepas de interesse da aquicultura é o isolamento e caracterização de bactérias que sejam resistentes às variações dos parâmetros ambientais (CASTRO *et al.*, 2015) e que apresentem comprovada capacidade de colonizar o intestino do hospedeiro (SAAD, 2006). A seleção deve ser realizada com base nas características das bactérias e na sua resposta a testes específicos, como a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal do hospedeiro e de atuar como antagonistas contra cepas patogênicas de interesse (BALCÁZAR *et al.*, 2008; LAZADO; CAIPANG, 2014; AKHTER *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015).

A capacidade das bactérias aderir e colonizar a superfície, interferindo frequentemente na adesão de patógenos, é um dos principais critérios desejáveis na seleção de probióticos (BALCAZAR *et al.*, 2006; LAZADO; CAIPANG, 2014). Assim como o antagonismo bacteriano, no qual as interações microbianas desempenham um papel importante no equilíbrio entre microrganismos benéficos e potencialmente patogênicos (BALCÁZAR, 2002; BALCÁZAR, 2006; LOZUPONE *et al.*, 2012; PERBELIN *et al.*, 2019). O processo de exclusão competitiva ocorre através da produção de compostos inibitórios que são antagônicos em relação aos agentes patogênicos, o que impede o crescimento desses patógenos (BALCÁZAR, 2002; BALCÁZAR, 2006; CUTTING, 2011). É essencial que um probiótico seja tolerante à bile para conseguir sobreviver e se desenvolver no trato gastrointestinal do animal (BALCÁZAR *et al.*, 2008). Além disso, ele não deve ser hemolítico, pois a hemolisina é um fator de virulência comum entre os patógenos (OUWEHAND *et al.*, 2005, SANTIAGO *et al.*, 2013, REBOUÇAS *et al.*, 2017).

Embora seja improvável encontrar um probiótico que atenda a todas as características desejáveis, um candidato pode ser considerado promissor se ao menos algumas dessas características forem atendidas (AMENYOGBE, 2023). Entre os diferentes candidatos, os probióticos potenciais são escolhidos com base na sua atividade inibitória contra patógenos-alvo *in vitro* ou *in vivo* (GATESOUBE, 1999; VERSCHUERE *et al.*, 2000, BALCÁZAR *et al.*, 2007, 2008; HAI, 2015; HOSEINIFAR *et al.*, 2017; AMENYOGBE *et al.*, 2020).

O mercado oferece diferentes composições de cepas nos probióticos comerciais testados e utilizados em camarões (SILVA *et al.*, 2016). Entretanto, a principal problemática dos produtos comercialmente utilizados na carcinicultura é que, frequentemente, essas cepas são isoladas de animais terrestres ou de espécies que não são o alvo da suplementação ou aplicação,

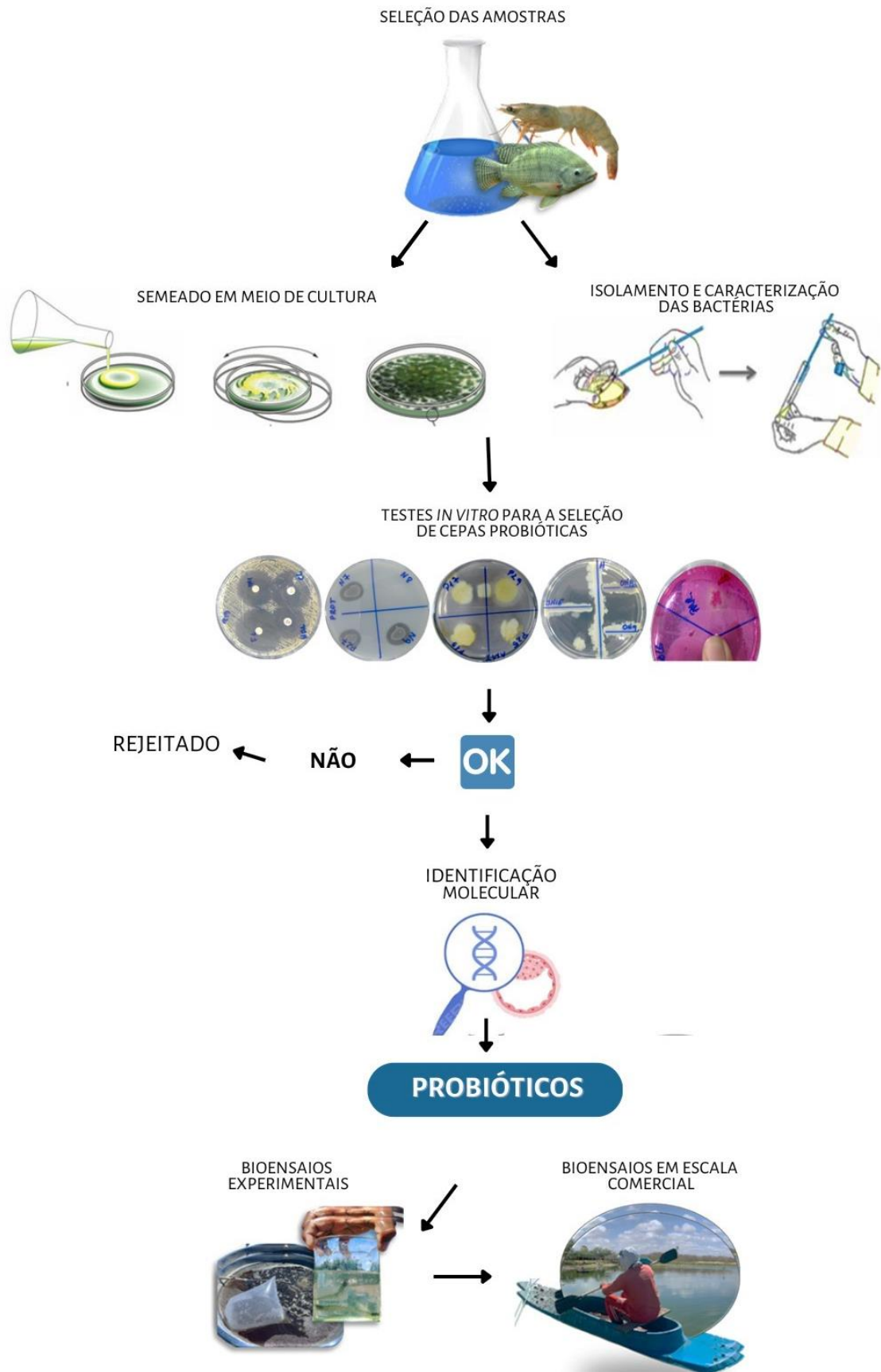
sendo assim cepas probióticas alóctones, e por isso apresentar resultados não esperados sendo considerados algumas vezes ineficazes (AKHTER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; GHOSH *et al.*, 2016).

Por outro lado, a utilização de microrganismos autóctones do hospedeiro oferece benefícios ampliados, pois esses microrganismos já possuem familiaridade com o ambiente, incluindo condições como salinidade e temperatura (ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016). Dessa forma, o uso de probióticos universais não é recomendado. Para alcançar maior eficiência e máximo potencial, as bactérias que compõem os probióticos devem ter especificidade para o hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2012; LAZADO; CAIPANG, 2014).

A caracterização e triagem de cepas probióticas têm sido tema de inúmeros artigos científicos nos últimos anos (NIKOSKELAINEN *et al.*, 2001; CHABRILLÓN *et al.*, 2005; BALCÁZAR *et al.*, 2008; AMENYOGBE *et al.*, 2023). O potencial para encontrar probióticos ideais é avaliado por meio de diversas etapas de triagem após o isolamento das cepas. A viabilidade destes produtos e a sua não patogenicidade critérios essenciais para comprovar sua segurança (UNTERKIRCHER *et al.*, 2012)

O desenvolvimento de probióticos adequados é uma tarefa complexa, que exige experimentos em grande escala, bem como ferramentas de monitoramento apropriadas e uma produção controlada (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2013; RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2016). As etapas necessárias para a obtenção de um probiótico estão ilustradas na Figura 1.

Figura 1 – Etapas para desenvolvimento e seleção de um probiótico.



Tanto cepas esporogênicas quanto não esporogênicas podem ser utilizadas como probióticos. Contudo, as bactérias esporulantes apresentam uma vantagem significativa: sua resistência a amplas faixas de temperatura e pH, características não observadas em outros tipos de bactérias (SILVA *et al.*, 2016).

Dentre as formas esporuladas, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são as cepas probióticas mais comuns utilizadas na aquicultura. A principal vantagem da utilização dessas bactérias está na facilidade de produção em larga escala e na incorporação em produtos comerciais. Isso ocorre porque sua capacidade de esporulação facilita sua inclusão em dietas e formulações comerciais (SILVA *et al.*, 2016; JESUS *et al.*, 2016). Além disso, cepas esporogênicas utilizadas como probióticos costumam ser mais resistentes a condições adversas, como o ambiente do trato digestivo. Elas sobrevivem ao trajeto através da barreira estomacal, uma propriedade que não pode ser garantida com probióticos fornecidos na forma vegetativa (SILVA *et al.*, 2016; JESUS *et al.*, 2016; ELSHAGHABEE *et al.*, 2017; KONURAY; ERGINKAYA, 2018).

No entanto, a maioria dos probióticos disponíveis atualmente são bactérias que não são formadores de esporos (JESUS *et al.*, 2016). Geralmente, as bactérias não esporogênicas apresentam menor resistência a condições adversas e tendem a não manter alta viabilidade após longos períodos de estocagem em temperatura ambiente e com baixa atividade de água (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017; KONURAY; ERGINKAYA, 2018). As bactérias mais comumente utilizadas pertencem ao gênero *Bifidobacterium* e à família *Lactobacillaceae*. Dentro deste grupo, as cepas do gênero *Lactobacillus* destacam-se por sua grande capacidade de colonizar o trato intestinal e pela produção de compostos com atividade antimicrobiana (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017; KONURAY; ERGINKAYA, 2018).

4.4. Desempenho dos probióticos no cultivo de camarão

Inicialmente o uso de probiótico na aquicultura era focado para melhoria do crescimento e sanidade dos animais, porém seu uso expandiu-se para atingir melhores níveis de qualidade de água, digestibilidade de nutrientes, agentes antiestressantes e promotores para aumento dos índices produtivos (MARTÍNEZ CRUZ *et al.*, 2012). Entre os agentes ativos mais frequentemente utilizados estão bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* (JATOBÁ *et al.*, 2008; WON *et al.*, 2020; ADEL *et al.*, 2017a) e *Bacillus* (WON *et al.*, 2020; ZOKAEIFAR *et al.*, 2014; MADANI *et al.*, 2018; VOGLEY *et al.*, 2019). Onde os primeiros são indicados para conferir melhores resultados zootécnicos, com melhora da conversão

alimentar, redução da mortalidade, aumento da resistência às condições de estresse, melhora da imunidade e saúde geral dos animais (MAEDA *et al.*, 2014, ADEL *et al.*, 2017, RINGØ, 2020), enquanto as espécies do gênero *Bacillus* atuam na manutenção dos parâmetros de qualidade de água (HLORDZI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022; MEHLA *et al.*, 2023)

4.4.1. Desempenho de crescimento e taxa de sobrevivência

O desempenho de crescimento é um parâmetro importante da carcinicultura devido ao custo e ao tempo envolvido no cultivo de camarões (TOLEDO *et al.*, 2019; RUDTANATIP *et al.*, 2019; KEWCHAROEN; SRISAPOOME, 2019).

Nimrat *et al.* (2012) investigaram os efeitos de diferentes composições de *Bacillus* spp sobre o crescimento e sobrevivência de estágios larvais e pós-larvais de *P. vannamei*. No estágio pós-larval, todos os tratamentos com probióticos apresentaram melhores resultados que o grupo controle, onde não houve a adição de probiótico. Esses autores também observaram diferenças, entre os próprios tratamentos com probióticos utilizados, para os valores de peso final, comprimento final e percentuais de ganho de peso e comprimento.

Pesquisas realizadas por Olmos *et al.* (2011) observaram melhoria no crescimento, conversão alimentar, sobrevivência e maior tolerância ao estresse. O mesmo comportamento com relação à sobrevivência foi observado por Buglione *et al.* (2008) em pós-larvas de *P. vannamei* que tiveram alimentação suplementada por *Lactobacillus plantarum* e apresentaram 87,86% de sobrevivência após teste de estresse salino em PL 20. Liu *et al.* (2010) afirmaram que a utilização de probióticos melhora a resistência ao estresse tanto em peixes quanto em camarões, em especial a espécie *P. vannamei*. Moriarty (1998; 1999) mostrou que a produção de camarões era elevada e consistente em viveiros onde foram utilizados probióticos e tecnologias de gerenciamento corretas, enquanto que viveiros não tratados ou tratados com antibióticos entravam em colapso devido a elevada incidência de doenças.

4.4.2. Melhor aproveitamento de nutrientes

Os animais aquáticos não possuem todas as enzimas essenciais necessárias para lidar com os desafios dietéticos. No entanto, a colonização do trato gastrointestinal por microrganismos probióticos que secretam várias enzimas digestivas e de degradação utilizando vários compostos nutricionais pode aumentar a utilização de carboidratos não digeríveis como fonte de energia, pois os probióticos quando presentes no intestino podem otimizar a utilização de nutrientes e minerais (CHO; KIM, 2013; ZHANG; ZHANG, 2013; FALCINELLI *et al.*,

2015; KIM *et al.*, 2018; WON *et al.*, 2020).

Bactérias probióticas são capazes de melhorar a digestibilidade aparente de proteínas, efeitos estes benéficos, os quais são relacionados ao aumento da atividade de proteases das próprias bactérias, bem como aumento da atividade de lipases (DE SCHRIJVER; OLLEVIER, 2000; AKHTER *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2021). Estudos afirmam e comprovam a eficácia de probióticos no desempenho de camarões (GHOSH *et al.*, 2016; TSAI; CHI; LIU, 2019).

Em trabalho realizado por Anjos e Araújo (2021) o probiótico foi eficaz na melhoria de desempenho do *M. amazonicum*, na qual influenciou no ganho de peso, aumento de comprimento, conversão alimentar e taxa de crescimento específico com adição do probiótico na água, na dieta ou em ambas. Os resultados sugerem que os probióticos facilitaram a digestão e absorção dos nutrientes provenientes da dieta em função das suas características funcionais, dentre estas, tolerância a variações de pH, tolerância a hidrólises, atividades antioxidantes e produção de antimicrobianos.

Probióticos, com cepas isoladas ou combinadas, podem melhorar a microbiota do seu hospedeiro, bem como os seus aspectos nutricionais e aproveitamento do alimento, acarretando, deste modo, na melhoria no desempenho (HAI, 2015). Nimrat *et al.* (2019) obtiveram melhor taxa de crescimento específico, ganho de peso e conversão alimentar utilizando diferentes espécies de *Bacillus* combinadas para *P. vannamei*. Ghosh *et al.* (2016) utilizando bactérias deste mesmo gênero combinadas com enzimas obtiveram resultados satisfatórios para ganho de peso de *M. rosenbergii*.

Os probióticos ajudam os camarões a atender às suas necessidades nutricionais (JUDKINS *et al.*, 2020), o que ajuda a proteger o organismo do estresse, da desnutrição e da morte (El-SAADONY *et al.*, 2022).

4.4.3. Qualidade de água

A gestão da água é uma prática importante para prevenir surtos de doenças e melhorar a produção em grande escala na aquicultura (CHA *et al.*, 2013). Não existem problemas sérios para a qualidade da água durante as fases iniciais da criação de organismos aquáticos. No entanto, com o progresso do cultivo os organismos crescem, levando a um rápido aumento na biomassa e a deterioração da qualidade da água, principalmente como resultado da acumulo de resíduos metabólicos dos organismos cultivados e decomposição de alimentos não utilizados (AMJAD *et al.*, 2022).

Existem diversas bactérias probióticas utilizados para controlar os microrganismos

patogênicos e melhorar a qualidade da água, como - *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodoseudomonas*, *Nitrosomonas* e *Acinetobacter* (IRIANTO; AUSTIN, 2002; HLORDZI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022; MEHLA *et al.*, 2023).

De acordo com alguns autores, um dos principais problemas enfrentados pela aquicultura é a elevação da concentração dos compostos nitrogenados (amônia, nitrito e nitrato) que quando não controlados podem vir a acarretar a mortalidade dos animais (KEWCHAROEN; SRISAPOOME, 2019; HLORDZI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022; MEHLA *et al.*, 2023). A adição de probióticos na aquicultura pode melhorar a qualidade da água, diminuindo os níveis nocivos de amônia e aumentando os níveis de nitritos e nitratos (AMIIN *et al.*, 2023). Além disso, inibe o desenvolvimento de diversos microrganismos patogênicos na água (AKHTER *et al.*, 2015; DAS *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2018; HLORDZI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022; MEHLA *et al.*, 2023).

Os *Lactobacillus* spp. são bactérias Gram-positivas e eficientes em transformar matéria orgânica em CO₂, assim como *Bacillus* spp. que são bactérias nitrificantes e reduzem as concentrações de nitrato, nitrito e amônia do meio aquático, sendo associadas ao melhoramento de qualidade da água, promovendo a melhoria da sobrevivência e a taxa de crescimento dos animais cultivados (GUO *et al.*, 2016; DAS *et al.*, 2017). Esses microrganismos têm um papel crucial na manutenção da qualidade da água, na gestão de resíduos, no aumento da produção e na ciclagem de nutrientes (HLORDZI *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2022; MEHLA *et al.*, 2023).

Foi demonstrado que a adição de probióticos ou bactérias externas, como bactérias nitrificantes ou *Lactobacillus* e *Bacillus* spp., afeta as concentrações de oxigênio dissolvido, pH, amônia e alcalinidade na água (NIMRAT *et al.*, 2012; KEWCHAROEN; SRISAPOOME, 2019; FLORES-VALENZUELA *et al.*, 2021). No cultivo de camarão o aumento da amônia pode ocorrer, sobretudo pelo excesso de material orgânico proveniente de ração não consumida, de fezes e de excreção de metabólitos promovem a eutrofização dos viveiros (KAMAL *et al.*, 2022). A amônia é tóxica e reduz a resposta do sistema imunológico podendo levar à morte dos animais aquáticos (VALENCIA-CASTAÑEDA *et al.*, 2018). Bactérias probióticas encontradas na água também competem por espaço com as bactérias patogênicas (KNIPE *et al.*, 2021).

Muitos investigadores avaliaram alguns microrganismos específicos como melhoradores biológicos da qualidade da água (IRIANTO; AUSTIN, 2002; SHARIFF *et al.*, 2001; NIMRAT *et al.*, 2012; VALENCIA-CASTAÑEDA *et al.*, 2018; ROBLES-PORCHAS *et al.*, 2020; FLORES-VALENZUELA *et al.*, 2021). Nimrat *et al.* (2012) em estudo para verificar a eficácia de formas mistas de probióticos *Bacillus* durante a criação do camarão *P. vannamei* verificaram que o número total de bactérias heterotróficas e *Bacillus* em pós-larvas de camarão

ou água de cultivo dos grupos tratados foi maior do que nos controles e os níveis de pH, amônia e nitrito dos camarões tratados diminuíram significativamente, em comparação aos controles. Esta investigação mostrou que a administração de probióticos *Bacillus* mistos melhorou significativamente o crescimento e a sobrevivência das pós-larvas, aumentou as bactérias benéficas no camarão e na água de cultivo e melhorou a qualidade da água para os níveis de pH, amônia e nitrito.

Bazar *et al.* (2021) observaram que os parâmetros da água dos tanques tratados com probióticos mantiveram melhores níveis de pH e de oxigênio dissolvido. Segundo os autores isto se deve ao efeito dos probióticos que favorecem a mineralização da matéria orgânica. Os nutrientes, nitrato-N, nitrito-N e amônia-N na água do viveiro, não seguiram o mesmo padrão, com variações que podem ser devido a interações biológicas ou químicas ou a uma combinação desses parâmetros. As concentrações de amônia e nitritos no viveiro controle foram ligeiramente superiores às dos viveiros experimentais.

Em estudo realizado por Flores-Valenzuela *et al.* (2021) para avaliar o *P. vannamei* criado em bioflocos com adição de cepas comerciais de bactérias nitrificantes e *Lactobacillus rhamnosus* também encontrou efeito positivo na adição de cepas probióticas no cultivo. Onde a adição de bactérias autóctones (nitrificantes e *Lactobacillus rhamnosus*) teve um efeito significativo na qualidade da água, nos parâmetros zootécnicos do camarão, bem como na abundância de bactérias heterotróficas e nitrificantes na água e redução de bactérias do gênero *Vibrio*.

4.4.4. Sanidade dos animais

Entre os benefícios do uso dos probióticos está a melhoria da imunidade dos animais. Algumas bactérias probióticas estão diretamente relacionadas com o estímulo à resposta imunológica por meio do aumento da eficiência da modulação do sistema imune inato, tendo como consequência o aumento da produtividade, pois auxiliam na absorção dos nutrientes, vitaminas e sais minerais (OMAR *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015).

Cabe destacar que, por não possuírem mecanismos de regulação imunológica secundária (memória imunológica), os crustáceos não possuem a capacidade de produzir anticorpos, possuindo apenas o sistema imune do tipo inato (BARRACCO *et al.*, 2014). Assim para estes animais o alimento torna-se ainda mais importante, pois sua defesa imunológica é fortalecida por uma adequada e consistente alimentação.

Visando a sanidade animal, os probióticos podem agir através da atividade antagônica

frente a patógenos, podendo competir por nutrientes, espaço e sítios de adesão (mucosa intestinal e carapaça), produção de enzimas extracelulares, que podem atuar como enzimas digestivas e auxiliar o processo metabólico do hospedeiro ou ter efeito inibitório sobre patógenos e, também promovendo a imunomodulação, onde o probiótico estimula a ação do sistema imune inato do hospedeiro quando confrontado com um patógeno (BANERJEE; RAY, 2017).

Deste modo, as preparações probióticas são consideradas potenciais substitutos dos antibióticos, uma vez que estes são responsáveis por 20% dos resíduos presentes no alimento, podendo gerar reações alérgicas, efeitos tóxicos diretos e seleção de bactérias resistentes (TELLI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016). Os probióticos podem ser usados em todas as fases durante o cultivo e são especialmente úteis nas fases larvais e iniciais de desenvolvimento (IBRAHEM, 2013).

Várias doenças encontradas em aquicultura são de origem bacteriana causadas por espécies como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Tenacibaculum* e *Shewanella* spp. (AMOAHA *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2019). Logo microrganismos que apresentam atividade antagonista frente a esses e outros patógenos também são de grande relevância para a seleção de estirpes probióticas, pois além de reduzirem a carga de patógenos por exclusão competitiva podem produzir enzimas que inibam seu crescimento (NINAWA; SELVIN, 2009; ZOKAEIFAR, *et al.*, 2012; MUSTAFA *et al.*, 2019; BUTT *et al.*, 2021).

Vidal *et al.* (2018) ao avaliar os efeitos de uma dieta suplementada com *Bacillus cereus* em pós-larvas de *Penaeus vannamei* cultivados em laboratório verificaram que os grupos desafiados com patógenos e sem uso de probióticos foram os que apresentaram menor ganho de peso. *Bacillus cereus* demonstrou uma alta capacidade de colonizar pós-larvas de camarão, causando uma diminuição significativa de patógenos, provavelmente pela secreção de substâncias antimicrobianas e/ou por exclusão competitiva, justificando seu uso como uma bactéria probiótica.

Wang *et al.* (2019) consideram que probióticos multiespécie tem capacidade de inibição de patógenos mais eficiente que probióticos formados com uma única estirpe e ponderam que estudos mais aprofundados a respeito da capacidade de adesão e de inibição de patógenos desses probióticos possam esclarecer a razão dessa diferença.

Segundo Petri (2000), as bactérias probióticas ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal constituindo uma barreira física para as bactérias patogênicas. Assim, a ingestão de probióticos pode modificar a composição da microbiota intestinal, por exclusão de potenciais

invasores. *Bacillus* spp. têm sido comumente utilizados contra bacterioses que acometem camarão marinho cultivado, proporcionando efeito benéfico sobre o hospedeiro, alterando a comunidade microbiana intestinal e melhorando índices zootécnicos.

Em 1998, fazendas marinhas de camarão da espécie *Penaeus monodon* localizadas na Indonésia sofriam com baixo índice de sobrevivência do crustáceo (16%) devido à infestação de *Vibrio harveyi* em suas águas. Quando foram adicionadas cepas de *Bacillus* em alta densidade, a taxa de sobrevivência dos camarões alcançou valores acima de 70% (MORIARTY, 1998). Wang *et al.* (2019) ao utilizarem uma mistura probiótica no nível de 10^8 UFC para suplementar a dieta, verificaram que a mistura melhorou significativamente o crescimento e o estado de saúde do camarão. O camarão alimentado com a dieta que continha a mistura probiótica teve maior sobrevida após a injeção com *V. alginolyticus*.

DESENHO METODOLOGICO

O estudo sobre avaliação da eficácia, segurança e viabilidade bacteriológica de produtos probióticos utilizados na Carcinicultura foi dividido em quatro etapas: Na primeira etapa, realizou-se uma entrevista com produtores para obter informações sobre o uso e manejo de probióticos, com o objetivo de identificar os perfis de uso, os resultados obtidos, além de identificar as marcas mais utilizadas pelos criadores da região; na segunda etapa, os produtos comerciais mais citados pelos produtores foram submetidos a testes *in vitro*; na terceira etapa, consórcios bacterianos com princípio probiótico foram desenvolvidos a partir de isolados ambientais; na quarta etapa testes *in vivo* para avaliar os efeitos dos produtos comerciais e dos consórcios bacterianos formulados em laboratório sobre o desempenho produtivo do camarão marinho *P. vannamei* e na melhoria da qualidade da água do cultivo.

CAPITULO 1 - Probióticos comerciais na carcinicultura - Análise de viabilidade bacteriológica, conteúdo microbiano e eficácia em condições comerciais de cultivo.

5. INTRODUÇÃO

A definição tradicional de probióticos descreve-os como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro ao equilibrar positivamente a sua microbiota e sua atividade no trato gastrointestinal (VOGELEY *et al.*, 2019; RINGØ, 2020). A fim de melhorar o rendimento de produção e incrementar as taxas de produtividade de cultivo, a aquicultura tem vivenciado um aumento na busca por alternativas preventivas e sustentáveis de controle das enfermidades (CABELLO, 2006; VIEIRA *et al.*, 2009; PANDIYAN *et al.*, 2013; VOGLEY *et al.*, 2019, RINGØ, 2020).

Os diferentes microrganismos utilizados em preparações probióticas possuem mecanismo de ação e características bastante variadas com relação a sua capacidade de promover benefícios ao hospedeiro e ao ambiente (MERRIFIELD *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015; BALCÁZAR *et al.*, 2016). Entre os agentes ativos mais frequentemente empregados na aquicultura como alternativas eficazes ao uso indiscriminado de antibióticos estão bactérias dos gêneros *Lactobacillus* (JATOBÁ *et al.*, 2008; WON *et al.*, 2020; ADEL *et al.*, 2017), *Bacillus* (WON *et al.*, 2020; ZOKAEIFAR *et al.* 2014; MADANI *et al.*, 2018; VOGLEY *et al.*, 2019), *Aeromonas* spp. (IRIANTO; AUSTIN, 2002), *Enterococcus* spp. (CHANG; LIU, 2002), *V. alginolyticus* (AUSTIN *et al.*, 1995, KNIPE *et al.*, 2021; MORUF; USMAN, 2023)

Para que uma preparação probiótica seja considerada viável, ela deve conter uma quantidade mínima de unidades formadoras de colônias (UFC) na faixa de 10^8 a 10^9 por dose, o que assegura os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006; GALLINA *et al.*, 2011). No entanto, diversos estudos sobre probióticos têm evidenciado inconsistências nas informações fornecidas pelos fabricantes. Essas incongruências são relatadas tanto para probióticos de uso humano (VANDENPLAS, 2015; GARCIA; FARIAS; LIMA, 2012) quanto para uso veterinário (WEESE, 2004; GHELARDI *et al.*, 2023). Estudos mais recentes destacam que muitos produtos disponíveis no mercado apresentam discrepâncias entre o conteúdo declarado e a quantidade fornecida, tanto em termos de composição microbiana quanto de viabilidade bacteriológica (KORONA-GLOWNIAK, 2019; MAZZANTIN *et al.*, 2021; BÓSQUEZ *et al.*, 2022)

Existem diversos produtos probióticos disponíveis no mercado para uso na aquicultura (AKHTER *et al.*, 2015; MIANDARE *et al.*, 2016). Os microrganismos ativos nesses

bioprodutos são administrados individualmente ou em consórcio. Entretanto, a diversidade da microbiota nos ambientes de cultivo torna a seleção desses agentes biológicos um processo complexo. Isso tem gerado fortes críticas quanto à sua eficácia no ambiente de aquicultura, dividindo opiniões e colocando em dúvida a efetividade de seus benefícios (MOURIÑO *et al.*, 2012; AKHTER *et al.*, 2015; AMIIN *et al.*, 2023).

A viabilidade e a estabilidade de culturas probióticas representam o principal desafio tecnológico para a produção desses produtos. Um dos requisitos que uma bactéria deve atender para ser considerada um candidato probiótico é a capacidade de se multiplicar e colonizar o ambiente ou tecidos-alvo, alcançando assim sua funcionalidade. As cepas bacterianas devem ser capazes de sobreviver as diferentes variáveis ambientais com a mesma viabilidade e estabilidade (MACEDO *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2015; ANDRIANI *et al.*, 2015).

Os ambientes onde a aquicultura é desenvolvida apresentam grande diversidade em relação às condições climáticas e de cultivo, especialmente na carcinicultura. A salinidade, por exemplo, varia significativamente dependendo da região, estação do ano e volume de precipitação, com amplitude que vai desde valores típicos de ambientes dulcícolas até níveis superiores aos das águas oceânicas, como ocorre em áreas salineiras (MORIARTY, 1998; 1999; ARANEDA *et al.*, 2008; REBOUÇAS *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2019). Os microrganismos probióticos elaborados para uso em cultivos de camarão marinho são expostos a condições ambientais totalmente distintas devendo manter a mesma eficácia. Contudo, os rótulos apresentados pelos fabricantes geralmente não especificam as condições ambientais ideais de uso, dificultando a otimização de seus benefícios.

Para maximizar a eficiência dos probióticos no cultivo de camarões, é fundamental compreender profundamente seus mecanismos de ação, métodos de aplicação e os fatores que determinam seu desempenho. Esses aspectos incluem a concentração e o modo de ação das bactérias empregadas, as estratégias de fornecimento e aplicação e o conhecimento detalhado dos desafios ambientais e patógenos específicos enfrentados durante o cultivo (MOURIÑO *et al.*, 2012; LAZADO; CAIPANG, 2014; CASTRO *et al.*, 2015; ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016).

Entre os obstáculos enfrentados pelos produtores, destacam-se a falta de especificidade na indicação dos produtos e a falta de clareza sobre as limitações de seu uso. Esse contexto frequentemente leva a extensos processos de experimentação, que acabam gerando descontentamento na busca por soluções eficazes. Além disso, o desrespeito às recomendações dos fabricantes, seja por desconhecimento técnico ou por práticas inadequadas, podem comprometer significativamente os resultados esperados, reforçando a necessidade de maior orientação e precisão na adoção dessas tecnologias.

Com base nesses desafios, a primeira etapa consistiu na realização de entrevistas com produtores da região, com o objetivo de compreender as práticas adotadas pelos criadores, identificar padrões no uso dos probióticos, avaliar os desafios enfrentados no manejo e aplicação desses produtos, além de mapear as marcas mais utilizadas. Essa abordagem visou traçar perfis de uso e analisar os resultados obtidos, proporcionando uma visão ampla e detalhada sobre a efetividade e os principais gargalos relacionados ao uso desses produtos, visando direcionar melhorias e otimizar sua eficácia no campo. A segunda etapa, os produtos comerciais mais citados nas entrevistas foram submetidos a testes *in vitro* para avaliar a composição bacteriana informada nos rótulos, a viabilidade dos microrganismos presentes e analisar o desempenho dos probióticos em condições simuladas de cultivo.

O objetivo principal deste estudo foi identificar os principais desafios relacionados ao uso de probióticos na carcinicultura brasileira e avaliar os produtos comumente utilizados no setor. Para isso, analisaram-se as informações presentes nos rótulos, a composição bacteriana e a viabilidade dos microrganismos sob diferentes condições de cultivo, com o propósito de verificar sua eficácia e adequação às práticas adotadas na aquicultura nacional.

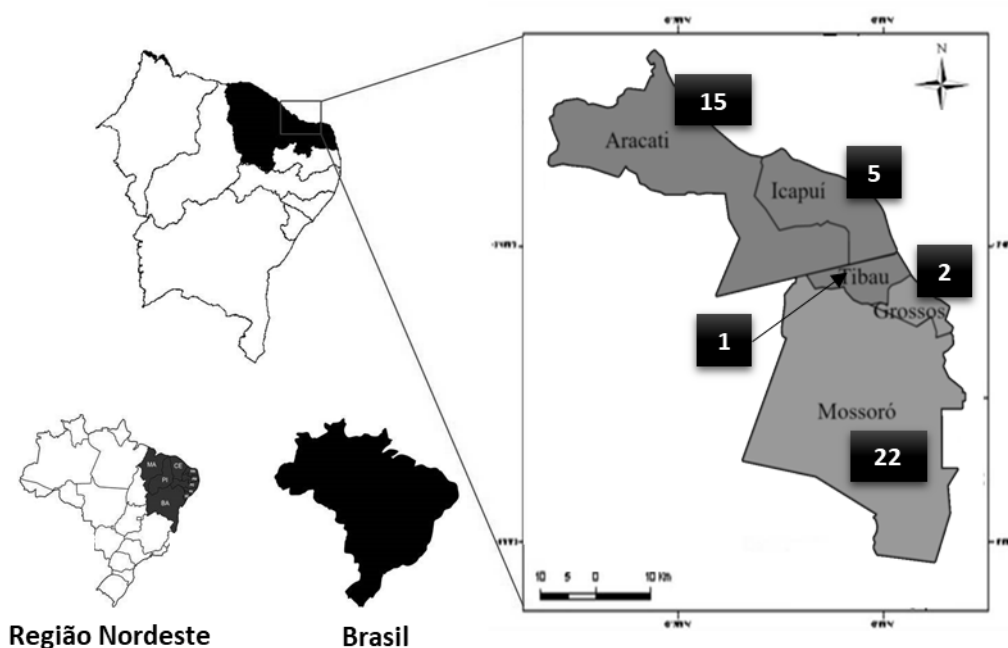
6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Entrevistas

6.1.1. Delineamento de pesquisa

A região Nordeste é reconhecida como o principal polo produtor de camarão marinho no Brasil (POERSCH *et al.*, 2006), com destaque para os estados do Ceará e Rio Grande do Norte, respectivamente (ROCHA; ROCHA, 2010; REBOUÇAS *et al.*, 2017). Para a realização deste estudo, foram avaliadas 45 fazendas de produção de camarão localizadas ao longo do litoral nordestino, abrangendo desde o litoral leste do Ceará até a região oeste do Rio Grande do Norte (Figura 2).

Figura 2 - Localização da área de estudo e distribuição dos estabelecimentos analisados segundo o município de localização ao longo do litoral nordestino.



Fonte - elaborado pelo autor.

O estudo foi conduzido por meio de uma entrevista semiestruturada com abordagem quali-quantitativa, utilizando um questionário aberto que permitia a inclusão de perguntas adicionais conforme surgissem novos questionamentos. O questionário foi composto por perguntas relacionadas às metodologias de aplicação dos probióticos, tipos de produtos utilizados, formas de ação e o grau de envolvimento dos produtores no uso desses produtos. O

objetivo foi identificar os perfis, opiniões, percepções e preferências dos entrevistados, estabelecendo uma relação entre essas informações e os resultados obtidos na produção.

Foram coletadas informações sobre as fazendas, incluindo dados como área dos viveiros, volume e densidade de estocagem, taxas de sobrevivência e produtividade média. Além disso, foram levantados detalhes sobre o uso de probióticos no último ciclo de cultivo, abrangendo seu emprego para prevenção ou tratamento de doenças. As entrevistas também incluíram discussões aprofundadas sobre os tipos e frequência de enfermidades, a percepção dos produtores sobre os sintomas clínicos dessas doenças e as práticas de monitoramento da qualidade da água. Sempre que possível, foi realizada a observação direta em algumas propriedades para complementar as informações.

Além disso, os produtores foram questionados sobre o manuseio dos probióticos, incluindo o conhecimento acerca da concentração e do modo de ação das bactérias utilizadas, a forma de aplicação e as estratégias de fornecimento. Essas informações foram utilizadas para triangular os dados sobre os tipos, doses e manejo relatados pelos aquicultores. A partir disso, os dados foram comparados com as indicações dos rótulos dos produtos, estabelecendo uma relação entre essas informações e os resultados de produção obtidos.

Participaram das entrevistas produtores e técnicos, bem como outros indivíduos com influência significativa no processo decisório sobre a utilização dos produtos em questão. A seleção desses participantes visou garantir uma diversidade de perspectivas relacionadas ao manejo e uso de probióticos.

Antes de iniciar as entrevistas, todos os participantes foram consultados sobre sua disponibilidade e interesse em participar da pesquisa. Aqueles que concordaram em contribuir assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo o cumprimento dos princípios éticos e a transparência do estudo. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o número de protocolo 3.428.302, em conformidade com a Resolução 466/12.

6.1.2 Análise de dados

Os dados obtidos a partir dos questionários e das entrevistas foram codificados e inseridos em um banco de dados eletrônico no MS Excel (Microsoft Corporation). Para a análise, foram aplicados métodos de estatística descritiva, utilizando frequências absolutas e relativas, que foram organizadas em gráficos e tabelas.

Posteriormente, os dados foram analisados com o auxílio do software Statistical

Package for Social Science, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). A relação entre o uso de probióticos e o percentual de sobrevivência nos cultivos foi avaliada utilizando o teste Exato de Fisher, considerando um nível de significância de 0,05.

6.2. Avaliação dos Probióticos comerciais

6.2.1 Delineamento experimental

A partir dos dados obtidos nas entrevistas, foram selecionados os principais produtos comerciais mencionados pelos produtores para a realização de testes *in vitro*. Foram utilizados quatro probióticos com composições distintas, voltados principalmente para a manutenção da qualidade da água (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização dos produtos comerciais probióticos utilizados no estudo com agentes ativos e suas concentrações (UFC/g) indicativos do rótulo.

Produto	Agentes ativos	Concentração
P1	<i>B. subtilis</i>	5,0x10 ¹⁰
	<i>B. licheniformis</i>	
P2	<i>B. subtilis</i>	1,5x10 ⁹
	<i>B. licheniformis</i>	1,5x10 ⁹
	<i>L. acidophilus</i>	3,0x10 ⁸
	<i>B. pumilus</i>	7,0x10 ⁸
	<i>S. cerevisiae</i>	5,0x10 ⁸
P3	<i>B. subtilis</i>	5,0x10 ⁸
	<i>B. licheniformis</i>	5,0x10 ⁸
	<i>B. toyoniense</i>	2,5x10 ⁹
	<i>L. plantarum</i>	7,5x10 ⁹
	<i>P. acidilactici</i>	5,0x10 ⁸
	<i>S. cerevisiae</i>	2,0x10 ⁸
P4	<i>B. subtilis</i>	3,4x10 ⁹
	<i>L. plantarum</i>	1,2x10 ⁹
	<i>P. acidilactici</i>	1,2x10 ⁹

Fonte - elaborado pelo autor.

Todos os produtos avaliados eram compostos por pó liofilizado acrescido de substrato. Após a aquisição, foram armazenados em local fresco e seco, protegidos da luz ou mantidos em

geladeira a 4°C, conforme as orientações descritas nos rótulos. O prazo de validade informado para os produtos era de dois anos, e nenhum deles ultrapassou o prazo de validade.

Os rótulos dos produtos foram submetidos a uma análise detalhada, incluindo a verificação da ortografia, clareza das informações descritas (como gênero e espécie), declaração do número de organismos viáveis, presença de data de validade e a indicação de alegações específicas de uso.

6.2.2. Análises Microbiológicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará, onde foram avaliados três grupos experimentais com diferentes níveis de salinidade (<0,5; 35; 80 ppt) para cada probiótico utilizado. A presença dos diferentes grupos microbianos foi verificada de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes.

A determinação da comunidade microbiana dos diferentes probióticos foi realizada utilizando meios seletivos específicos para cada grupo microbiano mencionado nos rótulos dos produtos. Para as bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e os *Bacillus* (BAC), utilizou-se o meio *Plate Count Ágar* (PCA). Para as bactérias ácido-láticas (BAL), foi utilizado o *Ágar De Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), enquanto para os fungos, o meio utilizado foi o *Ágar Potato Dextrose* (PDA). Essa técnica de cultura permitiu avaliar a viabilidade microbiana e determinar o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para cada conteúdo bacteriano presente nos produtos analisados.

6.2.3. Processamento das amostras

Para o isolamento e identificação das espécies probióticas viáveis, os probióticos liofilizados foram ressuspensos em 200 mL de água, ajustada para cada salinidade testada (<0,5; 35; 80 ppt), para cada amostra de probiótico (P1, P2, P3, P4). A diluição das amostras seguiu os protocolos de ativação (quantidade e metodologia) recomendados individualmente por cada fabricante.

Após o período de ativação de cada probiótico, considerando as soluções ressuspensas como a diluição inicial 10^{-1} , uma alíquota de 1 mL foi retirada e inoculada em 9 mL de solução salina a 1% de NaCl, prosseguindo com diluições seriadas até 10^{-6} . Para a determinação dos grupos microbianos, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de *Petri*

contendo meios seletivos PCA, Ágar MRS e Ágar PDA. As placas foram homogeneizadas por movimentos rotatórios utilizando a técnica de inoculação *Pour-plate* (APHA, 2000).

Após homogeneização e solidificação, as placas com meios destinados às bactérias foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 h (BETTIOL, 1995). Já as placas para o crescimento de fungos foram incubadas em estufa a 28°C por 7 dias (ARAÚJO; GUERREIRO, 2010). Todo o procedimento foi realizado em duplicata. Para a quantificação de *Bacillus* spp., seguiu-se procedimento semelhante ao descrito anteriormente, com uma etapa adicional: após as diluições, as amostras foram submetidas a banho-maria a 70°C por 60 min antes da inoculação no meio ágar PCA, utilizando a técnica de *Pour-plate* (ROTHFUSS *et al.*, 1997).

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nos meios de cultura. Foram consideradas as placas que apresentavam crescimento entre 25 e 250 colônias (SCHORTEMAYER *et al.*, 1996). As contagens seguiram o método de contagem padrão em placas (CPP) descrito por Downes e Ito (2001).

Para acompanhar o desenvolvimento dos grupos microbianos, o procedimento foi repetido 72 h após a ativação das amostras. Este monitoramento permitiu observar o crescimento das colônias ao longo do tempo, garantindo uma análise mais detalhada do desempenho dos probióticos.

6.2.4. Isolamento e identificação das colônias microbianas

Para o isolamento dos diferentes grupos microbianos, foram considerados o tamanho e a coloração das colônias crescidas em meios específicos, visando à obtenção de culturas puras. De cada meio seletivo, dez colônias foram selecionadas e isoladas para posterior purificação. No total, foram isoladas dez colônias de cada meio de cultura utilizado na quantificação dos distintos grupos bacterianos em cada tempo analisado (T0 e T72), procurando diferenciá-las com base em características como tamanho, textura, forma e coloração.

Essas culturas foram acondicionadas em tubos inclinados contendo os respectivos meios nos quais foram isolados. Em seguida, os tubos foram incubados a 35°C por 24 h para verificação da pureza e posterior identificação.

A análise da morfologia e da estrutura da parede celular das bactérias isoladas foi realizada pela técnica de coloração de Gram, conforme descrito por Tortora *et al.* (2012), que classifica as bactérias em dois grandes grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com sua reação aos corantes utilizados.

6.2.5. Análise de dados

Os resultados das contagens de probióticos em 0 e 72 h de estocagem foram analisados por meio da comparação das médias das amostras, utilizando o Teste de *Tukey* ao nível de significância de 5%. Além disso, foi aplicada estatística descritiva para descrever os dados de forma detalhada.

A percentagem de crescimento bacteriano detectado em relação à quantidade declarada no rótulo foi calculada utilizando a seguinte equação:

Equação 1 - Contagem das bactérias viáveis nos produtos probióticos testados

$$\text{Bactérias Viáveis} = \frac{\text{Contagem in vitro (UFC/g)}}{\text{Concentração descrita no rótulo (UFC/g)}}$$

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Entrevistas

De acordo com os resultados obtidos nas entrevistas, foi possível observar que as fazendas participantes do estudo variaram entre micro produtores ($\leq 5,0$ hectares) e grandes produtores ($> 50,0$ hectares). A maioria dos empreendimentos (42,2%) enquadra-se na categoria de pequenos produtores, com áreas entre 5,0 hectares e 10,0 hectares. Essa classificação segue os critérios definidos pela ABCC (2013) para determinar o porte dos empreendimentos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação das fazendas de camarão que participaram do estudo de acordo com o porte do empreendimento.

Categoria	Nº de Produtores	% de Produtores por Categoria
Micro	12	26,70%
Pequeno	19	42,20%
Médio	11	24,40%
Grande	3	6,70%
Total	45	100%

Fonte - elaborado pelo autor.

Assim como apontado no Censo Nacional do Camarão (ABCC, 2013), os resultados das entrevistas mostram que os empreendimentos da região são, em sua maioria, representados por micro, pequenos e médios produtores. Esses produtores estão concentrados nessas áreas, formando grupos produtivos que impulsionam a atividade local.

A alta concentração de produtores nessa região está diretamente relacionada às vantagens que a área oferece para o desenvolvimento da carcinicultura. Destacam-se, entre essas, a extensa faixa litorânea e as condições climáticas favoráveis, caracterizadas por um clima quente durante todo o ano. Esse ambiente favorece o crescimento dos organismos aquáticos, permitindo que os produtores completem até três ciclos anuais de cultivo (ROCHA, 2014).

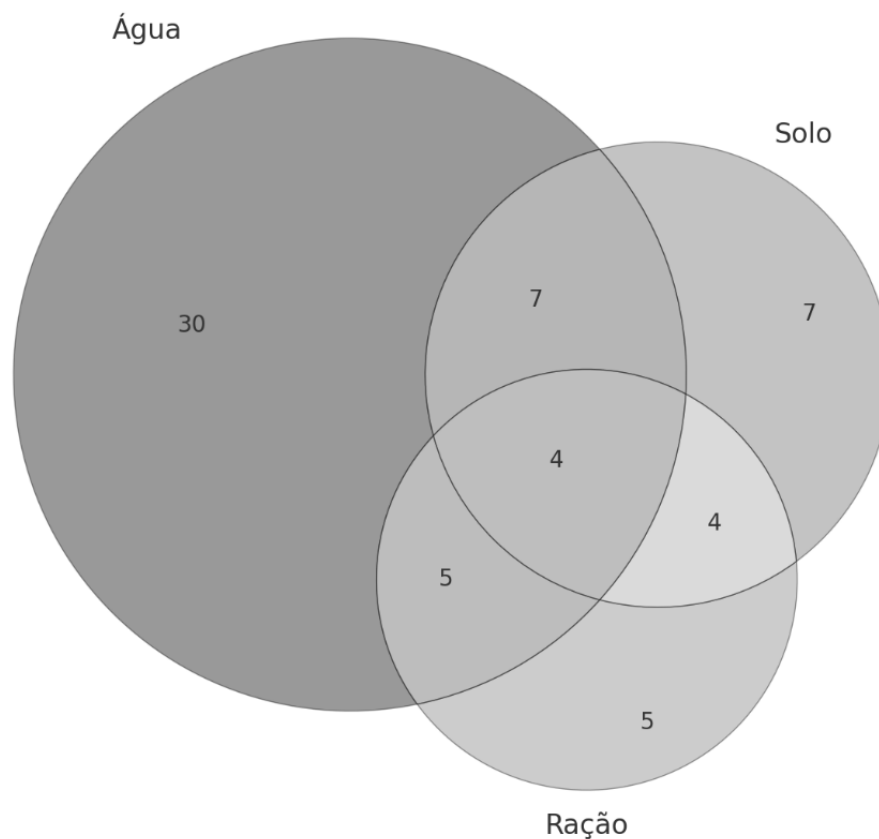
Além disso, conforme mencionado por Scopel (2014), as fazendas da região apresentam características assimétricas, tanto em termos de tamanho quanto de estilo e nível de tecnologia empregada. Algumas dessas propriedades exploram áreas menores que cinco hectares e

utilizam técnicas de manejo simples, baseadas em mecanismos pré-determinados e de fácil aprendizado, demonstrando a diversidade no perfil dos empreendimentos locais.

O levantamento revelou que, entre as fazendas pesquisadas, 100% dos entrevistados consideraram importante a utilização de probióticos. No entanto, apenas 66,7% faziam o uso regular desses produtos. O principal motivo apresentado pelos produtores que não utilizavam probióticos, em sua maioria pequenos produtores (53%), foi o custo elevado do produto, apontado por 86% dos entrevistados.

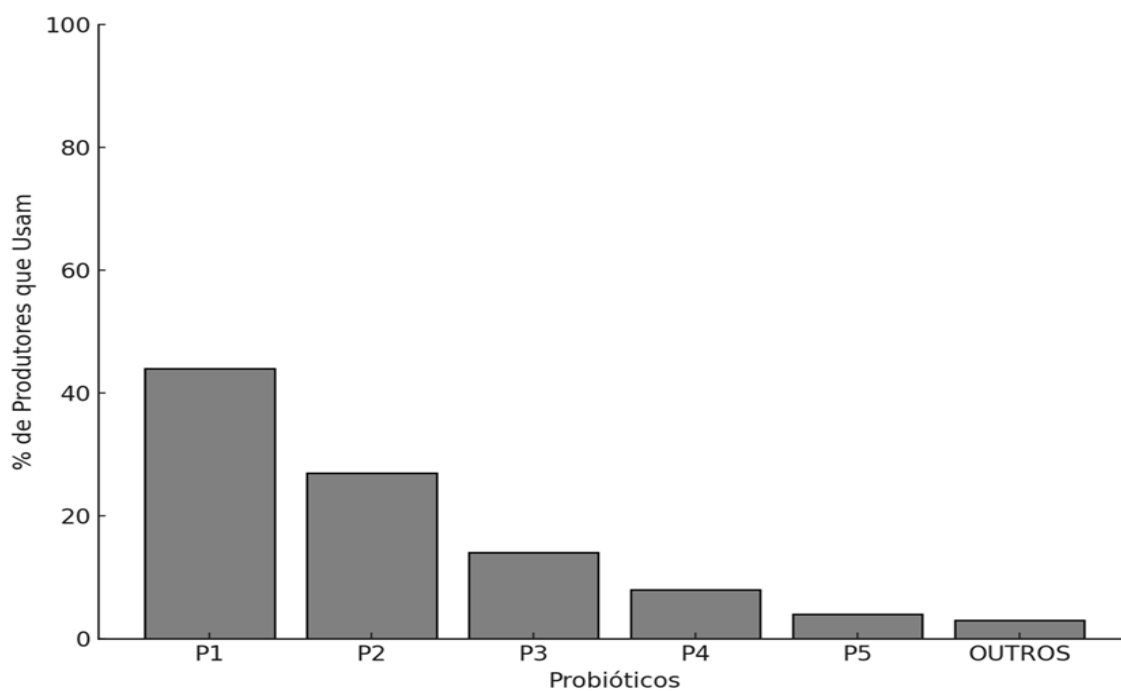
Os probióticos são amplamente utilizados pelos principais produtores de camarão da região. Contudo, o uso contínuo é mais frequente entre médios e grandes produtores, enquanto micro e pequenos carcinicultores enfrentam dificuldades em adotá-los de forma rotineira devido aos altos custos envolvidos no cultivo. Conforme os entrevistados, os probióticos eram aplicados por diferentes vias, sendo a água a mais utilizada (100%), seguida pelo solo (23,3%) e pela ração (16,7%). A Figura 3 apresenta a distribuição dos entrevistados em relação às formas de uso desses produtos.

Figura 3 - Distribuição do número de estabelecimentos de acordo com a forma de aplicação do probiótico nos cultivos de camarão.



Cinco marcas comerciais se destacaram entre os produtos probióticos utilizados pelos produtores da região. Dentre essas, uma marca específica apresentou maior representatividade, sendo escolhida por 44% dos entrevistados, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Frequência de citação das marcas comerciais de probióticos pelos produtores entrevistados.



Fonte - elaborado pelo autor.

A Tabela 4 apresenta a identificação detalhada dos principais probióticos comerciais mencionados pelos produtores entrevistados, destacando as informações declaradas nos rótulos, com foco nos agentes ativos e na concentração declarada de microrganismos.

Tabela 4 - Identificação dos principais probióticos comerciais utilizados pelos produtores entrevistados.

Produto	Agentes ativos	Concentração declarada no rótulo (UFC/g)
P1	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	5,0x10 ¹⁰
P2	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,5x10 ⁹ 1,5x10 ⁹ 3,0x10 ⁸ 7,0x10 ⁸ 5,0x10 ⁸
P3	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus toyoniense</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,0x10 ⁸ 5,0x10 ⁸ 2,5x10 ⁹ 7,5x10 ⁹ 5,0x10 ⁸ 2,0x10 ⁸
P4	<i>Bacillus cereus var. toyoi</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus bifidum</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0x10 ¹¹ 4,0x10 ¹¹ 3,5x10 ¹¹ 3,5x10 ¹¹ 3,5x10 ¹¹
P5	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	3,4x10 ⁹ 1,2x10 ⁹ 1,2x10 ⁹

Fonte - elaborado pelo autor.

Indagados sobre os critérios utilizados para a escolha dos produtos, 90% dos entrevistados afirmou que a decisão foi baseada na indicação de outros produtores, enquanto apenas 4,4% realizaram alguma pesquisa prévia sobre o probiótico antes de adquiri-lo. Isso demonstra uma forte influência de recomendações informais, em vez de análises técnicas ou científicas dos produtos.

A maior parte das indicações sobre qual probiótico utilizar em situações específicas é feita por vendedores, representando 57% das respostas. Contudo, apenas 45% dos entrevistados relataram ter recebido algum tipo de orientação sobre o uso correto do produto. Além disso, apenas 42,5% dos produtores declararam ter realizado cálculos para determinar a dosagem adequada, o que pode comprometer a eficácia do produto e gerar desperdícios ou subdosagens.

Outro dado relevante é que 76,7% dos entrevistados admitiram nunca ter lido o rótulo das embalagens, o que indica uma lacuna significativa na busca por informações essenciais sobre a composição, modo de uso e restrições dos probióticos. Apesar disso, todos os

entrevistados afirmaram repassar informações sobre os produtos para outros produtores, perpetuando práticas sem base científica e nem sempre adequadas às diferentes realidades (Tabela 5).

Tabela 5 - Principais informações compartilhadas entre os produtores sobre os produtos probióticos.

Base das informações compartilhadas entre produtores	% citações
Resultados na sua propriedade	60%
Resultados na propriedade de outros	35%
O que controla	25%
Preço	20%
Forma de aplicação	12%
Dosagem	3%

Fonte - elaborado pelo autor.

Quanto à compreensão dos rótulos, 70% dos entrevistados afirmaram entender o conteúdo apresentado. No entanto, quando questionados sobre o significado de termos técnicos específicos, apenas 26,11% daqueles que declararam compreender os rótulos foram capazes de descrever corretamente os termos apresentados. Dessa forma, sugere-se que os rótulos passem a adotar uma linguagem mais clara e acessível, com destaque para as informações essenciais e uma redução no uso de termos técnicos.

A maioria dos produtores entrevistados (85%) relatou monitorar alguma variável hidrológica em suas fazendas. As variáveis mais citadas foram: concentração de oxigênio dissolvido (78,18%), temperatura (78,18%), salinidade (75,45%), pH (60,91%), amônia (27,27%), nitrito (21,82%) e nitrato (17,27%). Entre os produtores que utilizavam probióticos, 56,7% afirmaram perceber melhorias significativas no cultivo após a adoção do produto. Essas melhorias foram associadas ao aumento da qualidade da água (86,6%), à menor incidência de doenças (6,7%) e à maior resistência dos animais (6,7%).

A preocupação com doenças foi destacada por 83,64% dos produtores, que relataram a ocorrência de enfermidades em suas fazendas. As doenças mais mencionadas foram: vibriose, mionecrose infecciosa (vírus IMNV), infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV) e mancha branca (vírus WSSV). Apesar disso, 80% dos entrevistados demonstraram otimismo em relação ao manejo dessas enfermidades, atribuindo a manutenção da ambiência do cultivo

e a aplicação regular de probióticos como fatores-chave para o controle das doenças.

Em termos de desempenho zootécnico, 28,9% dos empreendimentos relataram sobrevivência média acima de 70%, 31,1% entre 50-70% e 40% registraram sobrevivência inferior a 50%. Esses resultados foram semelhantes entre as propriedades independentemente da densidade de estocagem e do tamanho das propriedades.

A Tabela 6 ilustra a relação entre o uso de probióticos e o percentual de sobrevivência nos empreendimentos avaliados, destacando a diferença estatística significativa entre as proporções, conforme identificado pelo teste de Fisher ($P=0,010$).

Tabela 6 - Associação entre o uso de probióticos com o percentual de sobrevivência registrada nos empreendimentos.

Categoria	Usam Probióticos	Não Usam Probióticos	Valor-p
Produção > 50%	26.70%	66.70%	0.010243
Produção ≤ 50%	73.30%	33.30%	

Fonte - elaborado pelo autor.

Esse resultado indica uma associação não aleatória entre o uso de probióticos e os índices de sobrevivência. Em termos práticos, os produtores que empregaram probióticos apresentaram as maiores taxas de sobrevivência em seus cultivos, enquanto os menores índices foram observados entre aqueles que não utilizavam esses produtos. Essa relação reforça a eficácia dos probióticos como uma ferramenta para melhoria da sobrevivência dos camarões cultivados, evidenciando seu impacto positivo na aquicultura.

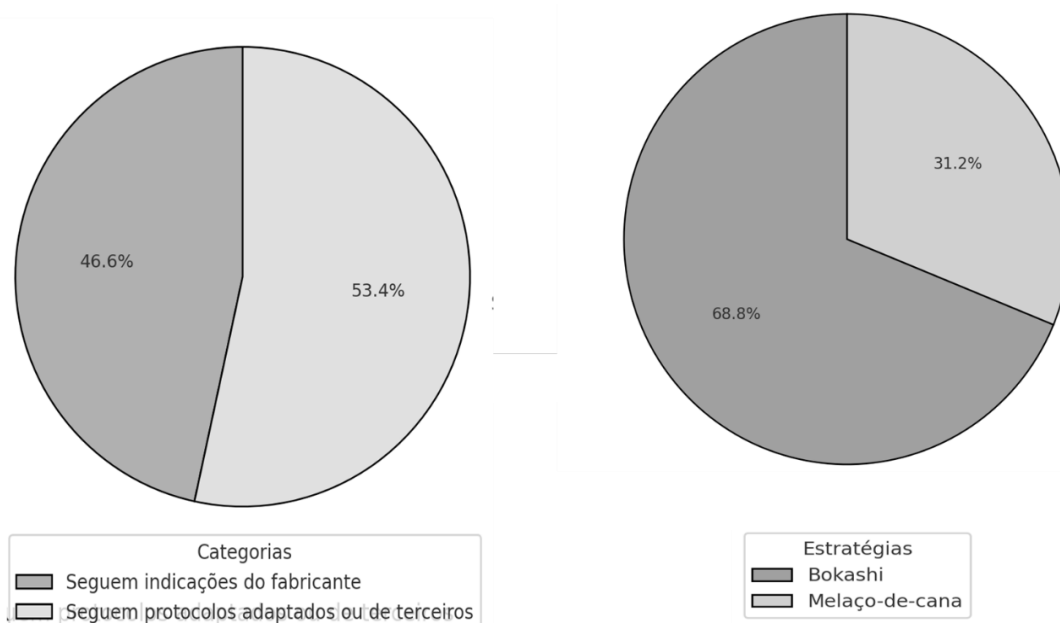
No detalhamento sobre os protocolos de aplicação e uso dos produtos probióticos e manejo complementar utilizados, apenas 46,6% dos entrevistados afirmaram seguir as indicações de uso fornecidas pelo fabricante. Esse dado evidencia uma significativa deficiência no cumprimento das orientações técnicas, o que pode impactar diretamente a eficácia dos produtos no cultivo. Resultados semelhantes foram relatados por Moriarty (1998), que destacou que a ausência de padronização no uso de probióticos em sistemas aquícolas frequentemente resulta em inconsistências nos resultados, comprometendo o desempenho produtivo e aumentando a incidência de falhas no manejo. Essa lacuna, conforme observado em outros estudos, também pode estar associada à falta de conhecimento técnico ou ao acesso limitado a informações claras e confiáveis sobre os produtos e seus modos de aplicação (MOURIÑO *et*

al., 2012).

Os demais produtores relataram utilizar protocolos adaptados ou seguir indicações de terceiros, o que reflete a busca por soluções personalizadas, muitas vezes sem embasamento técnico consistente. Entre as práticas alternativas identificadas, a utilização do *bokashi* destacou-se com a adoção por 68,8% dos entrevistados. Esse método, que consiste na fermentação de substratos orgânicos com microrganismos probióticos, é amplamente utilizado na fertilização de viveiros de camarão (MISCHKE; ZIMBA, 2004; ROMANO *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2020). Apesar de seus benefícios, como a modulação da microbiota intestinal e a melhoria das taxas de sobrevivência (LI *et al.*, 2009), o uso combinado com probióticos pode gerar efeitos antagônicos. Além do excesso de resíduos do substrato que pode causar acúmulo de matéria orgânica no fundo dos viveiros, alterando os parâmetros físico-químicos da água e comprometendo a eficiência do probiótico.

A Figura 5 apresenta as estratégias de aplicação de produtos probióticos, conforme relatado pelos entrevistados. Esses resultados evidenciam a diversidade de práticas adotadas, reforçando os desafios de padronização no manejo desses produtos.

Figura 5 - Estratégias de aplicação dos produtos probióticos adotadas pelos produtores



Fonte - elaborado pelo autor.

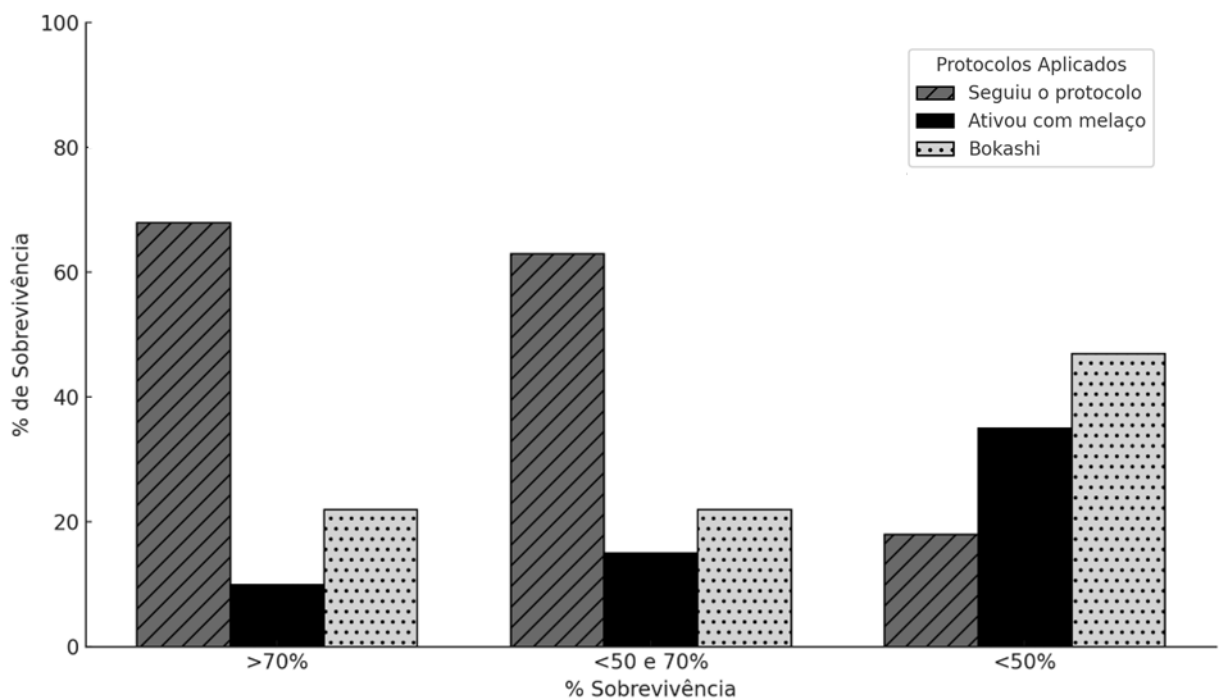
A aplicação inadequada desses simbióticos foi associada a menores taxas de sobrevivência nos cultivos analisados. Essa observação reflete a necessidade de entender os fatores que interferem na eficácia desses produtos. Souza Júnior (2008) verificou que diferentes

estratégias na aplicação de probióticos podem impactar diretamente os parâmetros de cultivo. Assim, fatores como a concentração, o modo de ação da bactéria, a estratégia de fornecimento e o conhecimento dos desafios ambientais e patogênicos devem ser considerados para maximizar os benefícios dos probióticos (CASTRO *et al.*, 2015).

Práticas similares foram discutidas por Moriarty (1997), que relatou a adaptação de protocolos como uma tentativa de produtores enfrentarem desafios específicos no cultivo de camarões, muitas vezes devido à variabilidade das condições locais. Da mesma forma, estudos como o de Lazado e Caipang (2014) destacam que o uso de aditivos, como melão, pode potencializar a atividade dos microrganismos probióticos, mas exige cautela, já que a ausência de orientação técnica pode comprometer os benefícios esperados e até prejudicar o sistema de cultivo.

Os resultados deste estudo destacam uma relação direta entre a utilização dos probióticos conforme as recomendações dos fabricantes e melhores taxas de sobrevivência. Os dados mostram que mais de 60% dos produtores que seguiram as instruções obtiveram sobrevivências superiores a 50%, enquanto 80% dos que utilizaram protocolos adaptados apresentaram sobrevivências abaixo de 50% (Figura 6).

Figura 6 - Relação entre o manejo de ativação do probiótico empregado e a sobrevivência de cultivo registradas nos empreendimentos avaliados.



Fonte - elaborado pelo autor.

Conforme observado neste estudo, Souza Júnior (2008) também evidenciou que estratégias distintas na aplicação de probióticos podem impactar diretamente os parâmetros de cultivo. Essa tendência reforça a importância de práticas baseadas em evidências técnicas, corroborando observações de Zorriehzahra *et al.* (2016), que enfatizam a relevância de um manejo adequado para maximizar os benefícios dos probióticos no cultivo de camarões.

Estudos, como os de Zorriehzahra *et al.* (2016) e Lazado e Caipang (2014), demonstram que a aplicação incorreta desses produtos, seja pela subdosagem, superdosagem ou por métodos não validados, podem reduzir significativamente sua eficácia e até gerar efeitos adversos no cultivo. Conforme observado em trabalhos como os de Jahangiri e Esteban (2018), o sucesso no cultivo de camarões depende diretamente da forma como os probióticos e prebióticos são aplicados. Moriarty (1998; 1999) também apontou que viveiros tratados com probióticos e tecnologias adequadas apresentaram maior consistência na produção, enquanto viveiros não tratados ou manejados inadequadamente enfrentaram colapsos devido a doenças.

A troca de informações entre produtores e empresas tem promovido novos processos no manejo de probióticos. Contudo, é essencial considerar as condições específicas em que os probióticos são utilizados para garantir o seu melhor desempenho. Diferentes tipos de probióticos podem ser necessários para atender às demandas particulares de cada propriedade, o que reforça a importância de adequar as práticas às realidades individuais do cultivo.

Esses dados evidenciam a necessidade de capacitar os produtores, garantindo que compreendam a relevância de seguir protocolos técnicos bem estabelecidos. A disseminação de informações técnicas e o desenvolvimento de materiais educativos específicos sobre o uso de cada probiótico são estratégias indispensáveis para padronizar as práticas, corrigir erros comuns e, conseqüentemente, melhorar os índices produtivos.

Além disso, o conhecimento aprofundado sobre os probióticos, incluindo seus mecanismos de ação e formas de aplicação, é indispensável para o sucesso dessa tecnologia. Para otimizar sua eficácia, é necessário avaliar fatores como a concentração e o modo de ação das bactérias, a forma de aplicação, as estratégias de fornecimento e o conhecimento dos desafios ambientais e patogênicos a serem enfrentados (Castro *et al.*, 2015). Esses elementos são cruciais para garantir que o produto aplicado atinja todo o seu potencial.

A utilização inadequada ou a alteração dos protocolos recomendados pelos fabricantes prejudica os resultados esperados, diminuindo as chances de sucesso no cultivo. Este estudo confirma que práticas divergentes comprometem o desempenho produtivo, destacando que não apenas o uso, mas o manejo correto dos probióticos é um elemento essencial para o sucesso.

Assim, a padronização de práticas e a adoção de protocolos técnicos bem estabelecidos são fundamentais para melhorar os índices produtivos e promover a sustentabilidade do setor aquícola.

Em síntese, o manejo correto e o conhecimento técnico sobre esses bioprodutos são fatores fundamentais para um bom desempenho produtivo. Alinhados às recomendações técnicas, esses fatores contribuem para a eficiência produtiva, promovem a sustentabilidade e fortalecem o uso de biotecnologias no cultivo de camarões, garantindo um setor mais competitivo e resiliente frente aos desafios contemporâneos.

7.2. Experimentos *in vitro*

7.2.1. Avaliação da rotulagem dos produtos

Os probióticos analisados apresentaram, em sua composição, consórcios de bactérias probióticas com a presença de três ou mais cepas, o que está alinhado com estudos anteriores que demonstram a eficácia superior de formulações multicepa em comparação com aquelas baseadas em uma única linhagem. Segundo Wang *et al.* (2019), probióticos de linhagem múltipla são mais eficazes em promover o crescimento e melhorar o estado de saúde do camarão *P. vannamei*. Essa eficácia está associada à diversidade microbiana, que proporciona uma maior amplitude de mecanismos de ação, incluindo a melhoria da digestibilidade, modulação imunológica e competição por nichos ecológicos no intestino do hospedeiro (CASTRO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2019).

Estudos complementares, como o de Castro *et al.* (2015), corroboram esses achados, apontando que produtos baseados em cepas únicas podem apresentar limitações em determinados contextos de cultivo, sobretudo devido à ausência de rotas metabólicas diversificadas que garantam um espectro de ação mais abrangente. A diversidade microbiana nos probióticos multicepa também é importante para lidar com a heterogeneidade dos desafios ambientais encontrados nos sistemas aquícolas, como variações nos parâmetros físico-químicos da água e a presença de patógenos específicos.

Os probióticos estudados foram caracterizados por consórcios de bactérias contendo três ou mais cepas probióticas, o que está alinhado com estudos anteriores que demonstram a eficácia superior de formulações multicepa em comparação com aquelas baseadas em uma única linhagem. Segundo Wang *et al.* (2019), probióticos de linhagem múltipla são mais eficazes em promover o crescimento e melhorar o estado de saúde do camarão *P. vannamei*.

Essa eficácia é atribuída à diversidade microbiana, que proporciona uma amplitude maior de mecanismos de ação, incluindo a melhoria da digestibilidade, modulação imunológica e competição por nichos ecológicos no intestino do hospedeiro.

Em relação à conformidade com a legislação brasileira, todas as amostras analisadas estavam de acordo com o Decreto nº 8.840/2016 e a Instrução Normativa nº 11/2005, que regulam a rotulagem de produtos de uso veterinário no Brasil (BRASIL, 2016). Os rótulos analisados incluíam informações sobre a composição qualitativa e quantitativa das espécies bacterianas, mencionando a concentração bacteriana em UFC/g. No entanto, foi observado que o produto P1 apresentava apenas a quantificação total dos microrganismos probióticos, sem especificar os valores individuais para cada espécie, o que compromete a clareza e a funcionalidade das informações fornecidas. Essa falha pode dificultar a avaliação do potencial de cada espécie bacteriana e prejudicar a tomada de decisões informadas por parte dos produtores.

De acordo com Borges e Medeiros (2016), a rotulagem de probióticos deve incluir informações específicas sobre a quantidade de microrganismos viáveis por espécie para garantir a eficácia funcional do produto. No presente estudo, apenas os produtos P1 e P4 forneceram no rótulo a concentração mínima de bactérias viáveis garantida pelo fabricante, evidenciando uma deficiência informacional nos demais produtos. Essa ausência de dados precisos também foi observada por Garcia *et al.* (2012), que relataram que muitos rótulos de probióticos carecem de detalhes técnicos adequados, priorizando informações promocionais em detrimento da clareza técnica.

Quando os critérios de adequação incluem a presença de informações claras sobre gênero, espécie, número de organismos viáveis e ausência de erros ortográficos, apenas 60% dos produtos analisados atenderam a esses padrões. Além disso, a ausência de identificação da especificidade das cepas nos rótulos compromete a confiabilidade nos produtos, uma vez que diferentes cepas de uma mesma espécie podem apresentar variações significativas em seus efeitos no hospedeiro. A presença de erros ortográficos na listagem de espécies bacterianas é outro fator preocupante, conforme apontado por Garcia *et al.* (2012). Embora esses erros não comprometam necessariamente a eficácia do produto, eles levantam dúvidas sobre a atenção aos detalhes por parte dos fabricantes, reduzindo a confiança dos consumidores na qualidade do produto.

Outro ponto crítico identificado foi a superficialidade das recomendações de uso nos rótulos. Nenhum dos produtos forneceu orientações específicas para diferentes condições de cultivo ou situações ambientais variáveis. Essa limitação já havia sido destacada em estudos

anteriores, como o de Garcia *et al.* (2012), que apontaram que a falta de instruções detalhadas dificulta a aplicação adequada dos probióticos em diferentes contextos de cultivo.

Os rótulos desempenham um papel essencial como meio de comunicação entre fabricantes e consumidores, especialmente para produtos cuja eficácia depende de uma aplicação correta e específica. Segundo Garcia *et al.* (2012), um rótulo bem elaborado e informativo é fundamental para garantir que os usuários compreendam e utilizem os produtos de forma eficaz. No presente estudo, as deficiências observadas na rotulagem reforçam a necessidade de aprimorar os padrões de comunicação e transparência na indústria de probióticos aquícolas.

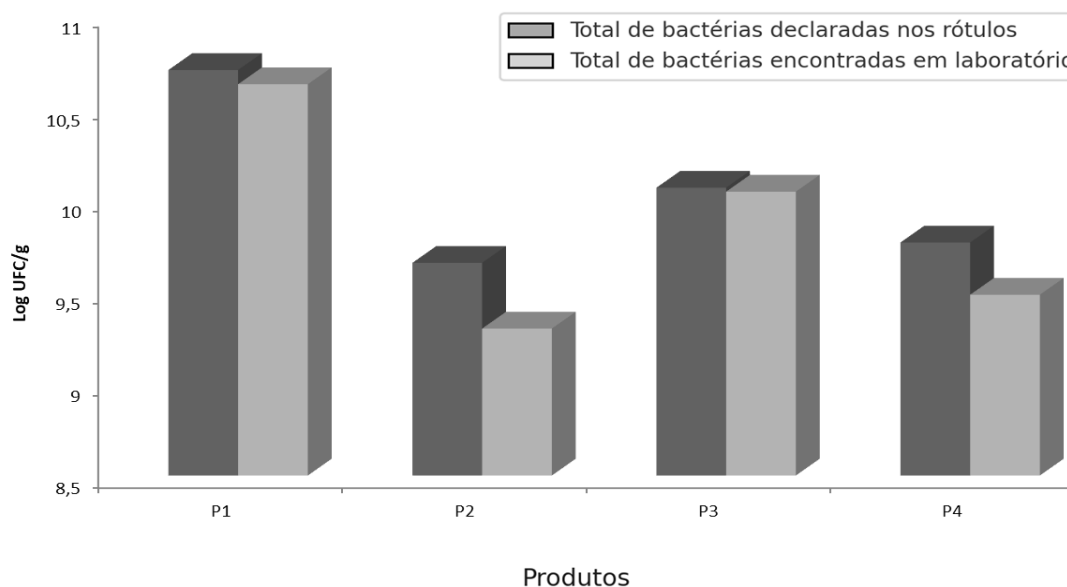
A avaliação dos probióticos neste estudo evidencia tanto avanços quanto lacunas na formulação e rotulagem desses produtos. Enquanto a presença de consórcios multicepa é um ponto positivo alinhado às melhores práticas científicas hospedeiro (CASTRO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2019), a falta de informações detalhadas e precisas nos rótulos compromete a eficácia potencial dos produtos. A melhoria nos padrões de rotulagem, com maior clareza, precisão e atenção às especificidades das cepas bacterianas, é crucial para garantir a confiança dos consumidores e o uso correto desses bioprodutos no cultivo de camarão.

7.2.2. Viabilidade e quantificação microbiana

Os resultados do presente estudo evidenciam que todos os produtos probióticos avaliados continham bactérias viáveis, indicando que, em termos gerais, os fabricantes conseguiram manter os microrganismos em condições propícias para sua sobrevivência. No entanto, foi identificada uma redução nas contagens de bactérias viáveis quando comparados os valores declarados no rótulo com os detectados em laboratório. Essa redução, embora perceptível, foi inferior a 1 ciclo log para todas as amostras, um valor que, de acordo com Borges e Medeiros (2016), ainda pode ser considerado aceitável para produtos biológicos em condições comerciais.

Entre os quatro produtos analisados, apenas dois apresentaram uma quantidade razoavelmente alta de bactérias viáveis, acima de 90% em relação aos valores declarados no rótulo (Figura 7).

Figura 7 - Comparação de contagens bacterianas viáveis nos produtos probióticos testados.



Fonte - elaborado pelo autor.

Esses resultados destacam a importância de um controle rigoroso durante o armazenamento e transporte dos probióticos, fatores que podem influenciar diretamente a viabilidade dos microrganismos. Estudos como os realizados por Wang *et al.* (2019) reforçam essa observação, demonstrando que a eficácia dos probióticos depende diretamente da manutenção de altos níveis de viabilidade bacteriana, já que microrganismos comprometidos perdem sua capacidade de colonizar o trato gastrointestinal ou atuar no ambiente de cultivo.

Além disso, a discrepância entre os valores declarados e detectados pode estar relacionada a variações no processo de fabricação, como encapsulamento inadequado ou condições inadequadas de secagem, conforme apontado por Garcia *et al.* (2012). Esses fatores podem reduzir a resistência das bactérias ao armazenamento e transporte, comprometendo sua eficácia no campo.

A manutenção de altos níveis de viabilidade bacteriana é crucial para o sucesso do uso de probióticos, pois esses microrganismos precisam estar ativos para exercer seus benefícios, como a exclusão competitiva de patógenos, melhoria da digestão e qualidade da água (LAZADO; CAIPANG, 2014).

Quanto ao número de organismos viáveis declarados nos produtos, nenhum especificou as quantidades garantidas até a data de vencimento. A informação sobre o número de organismos viáveis no momento da fabricação pode ser pouco relevante, dependendo da capacidade de sobrevivência de cada microrganismo ao longo do tempo. Os dados detalhados sobre a viabilidade e a quantificação microbiana de cada probiótico estão apresentados na

Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação das reivindicações de conteúdo apresentadas nos rótulos dos produtos comerciais com os resultados das contagens bacterianas viáveis para cada probiótico testado.

Produto	Concentração de bactérias declaradas no rótulo (UFC/g)	Concentração de bactérias detectadas em laboratório (UFC/g)	Rendimento (%)
P1	5,0 x 10 ¹⁰	4,18 x 10 ¹⁰	83,75
P2	4,5 x 10 ⁹	1,98 x 10 ⁹	44,09
P3	1,15 x 10 ¹⁰	1,09 x 10 ¹⁰	95,17
P4	5,8 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	52,08

Fonte - elaborado pelo autor.

A análise da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos produtos probióticos avaliados revelou diferenças significativas entre os resultados observados e as alegações presentes nos rótulos. Os produtos P1 e P3 apresentaram concentrações bacterianas mais próximas das quantidades reivindicadas pelos fabricantes, sendo o P3 o destaque, com 95,17% de viabilidade do total de bactérias declaradas. Em contrapartida, os produtos P2 e P4 demonstraram rendimentos inferiores, com apenas 44,09% e 52,02% de viabilidade, respectivamente. Esses números apontam uma deficiência na garantia da viabilidade bacteriana em alguns produtos, afetando sua eficácia.

A viabilidade bacteriana é um requisito fundamental para a funcionalidade dos probióticos. Segundo Macedo *et al.* (2008), a concentração mínima de microrganismos viáveis é essencial para garantir os efeitos esperados no cultivo, como a modulação da microbiota intestinal e a melhoria da saúde do ambiente de criação. No Brasil, a Instrução Normativa nº 01/2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece que a contagem bacteriana viável mínima deve ser de 10⁶ UFC/g para assegurar a eficiência dos bioprodutos (BRASIL, 2005). Nesse contexto, embora todas as amostras tenham atendido ao mínimo legal, a discrepância entre os valores informados nos rótulos e os efetivamente encontrados evidencia uma necessidade de maior controle de qualidade.

Além disso, a falta de informações claras nos rótulos sobre especificidades do produto para diferentes organismos aquáticos e condições ambientais dificulta a adequação da dosagem, comprometendo o potencial de eficácia. Estudos como o de Cai *et al.* (2022) indicam que os efeitos de bactérias ácido-láticas sobre a resistência a doenças em *Penaeus vannamei* são

altamente dependentes da dose e do tempo de aplicação, reforçando a necessidade de precisão na recomendação de uso.

Outro aspecto relevante é a presença de *Bacillus spp.* em dois dos produtos com maior viabilidade. Essa bactéria é conhecida por sua resistência ambiental devido à formação de esporos, que suportam condições adversas e prolongam a viabilidade durante o armazenamento (GUO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016; JESUS *et al.*, 2016). Isso sugere que produtos contendo espécies formadoras de esporos têm maior probabilidade de manter altos níveis de viabilidade, o que pode explicar o desempenho superior de P1 e P3.

Conforme Shah e Ravula (2000), a quantidade mínima de microrganismos viáveis necessária para exercer efeitos benéficos é crucial para a funcionalidade do probiótico. Nesse sentido, os resultados deste estudo reforçam a importância de garantir não apenas o cumprimento das normas regulatórias, mas também a transparência e a precisão das informações nos rótulos. Práticas inadequadas na formulação ou armazenamento dos produtos podem comprometer sua eficácia e, conseqüentemente, a produtividade dos sistemas aquícolas.

Portanto, é fundamental que os fabricantes assegurem a conformidade entre as alegações de rótulo e a qualidade real dos produtos, além de fornecer orientações detalhadas para diferentes condições de cultivo. A melhoria da padronização e a garantia de viabilidade bacteriana são passos indispensáveis para maximizar os benefícios dos probióticos na aquicultura (NINESS, 1999; SAAD, 2006; MACEDO *et al.*, 2008).

7.2.3. Composição das bactérias dos produtos probióticos comerciais

A análise dos produtos probióticos comerciais revelou a presença de um total de 740 cepas bacterianas, as quais foram caracterizadas quanto à morfologia e à coloração de Gram. Os resultados demonstraram que 77,9% dessas cepas eram bacilos Gram-positivos esporulantes, sendo atribuídas ao gênero *Bacillus*, conhecido por suas características robustas e ampla utilização na aquicultura devido à sua capacidade de formar esporos e resistir a condições adversas (SCHULTZ, 2009). Além disso, 15,34% das cepas foram identificadas como bacilos Gram-positivos não esporulantes, 0,94% como cocos Gram-positivos, 0,81% como leveduras, e 5,27% das amostras apresentaram ausência de crescimento (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição total dos microrganismos encontrados nos probióticos comerciais de acordo com a observação por microscopia.

Microrganismos	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Bacilos Gram-positivos esporulantes	577	77,66
Bacilos Gram-positivos	114	15,34
Cocos Gram-positivos	7	0,94
Leveduras	6	0,81
Não apresentou crescimento	39	5,25
Total	743	100

Fonte - elaborado pelo autor.

A predominância de bacilos do gênero *Bacillus* é consistente com outros estudos que destacam a eficácia dessas bactérias como probióticos em sistemas aquícolas. *Bacillus* spp. são amplamente utilizados devido à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares que melhoram a digestão, além de promoverem a exclusão competitiva de patógenos e melhorarem a qualidade da água nos sistemas de cultivo (SCHRYVER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2019). Segundo Moriarty (1998), a aplicação de *Bacillus* spp. em sistemas de cultivo de camarão não apenas aumenta a taxa de sobrevivência, mas também melhora o desempenho geral dos animais, principalmente devido à modulação da microbiota e à supressão de patógenos oportunistas.

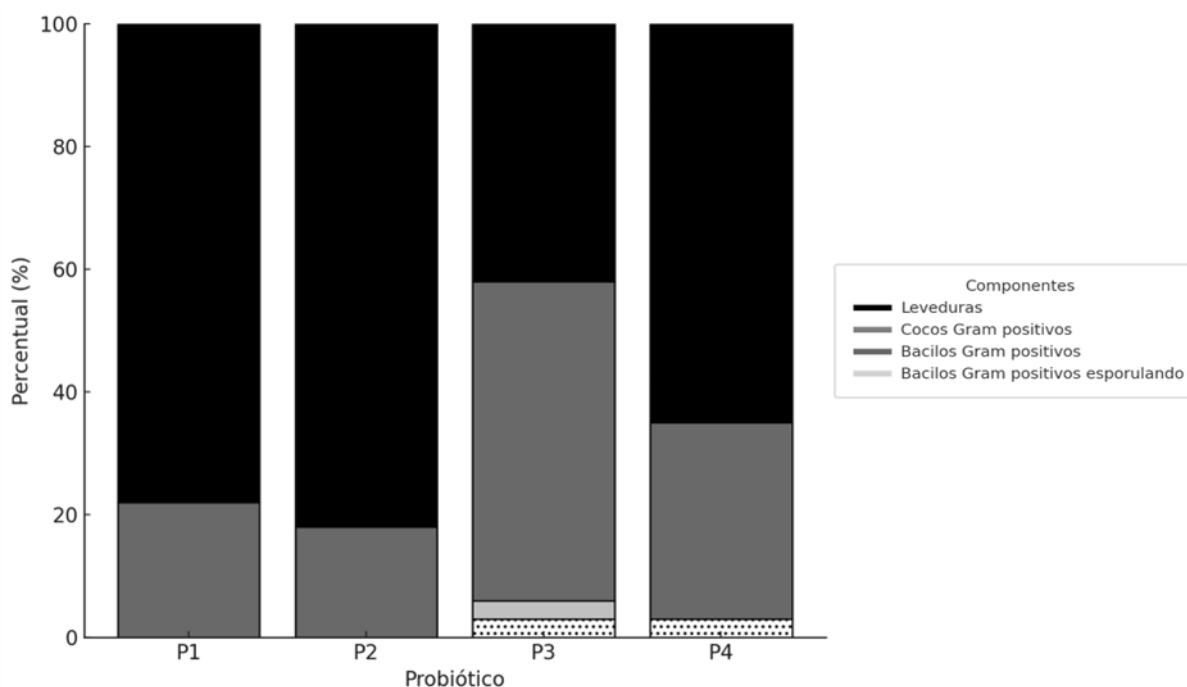
A identificação de leveduras (0,81%) também reflete o interesse crescente em explorar outros microrganismos como agentes probióticos. Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* têm sido destacadas por sua capacidade de estimular o sistema imunológico dos animais e melhorar a digestibilidade de nutrientes (VIDAL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

Esses resultados reforçam a necessidade de uma caracterização detalhada dos microrganismos presentes nos produtos probióticos para garantir sua eficácia e adequação às necessidades do cultivo. Trabalhos como os de Lazado e Caipang (2014) e Souza Júnior (2008) também apontam para a importância de selecionar cepas bacterianas apropriadas para diferentes condições ambientais e desafios específicos do cultivo, destacando que a diversidade microbiana nos produtos é um fator crucial para ampliar o espectro de ação e assegurar o desempenho produtivo em sistemas aquícolas.

A análise dos produtos probióticos utilizando meios de cultura seletiva revelou

inconsistências entre as cepas declaradas nos rótulos pelos fabricantes e as efetivamente presentes nos produtos. Dos quatro produtos testados, um apresentou inconformidade significativa (Figura 8).

Figura 8 – Percentual por grupo bacteriano isolado das culturas das bactérias encontradas nos diferentes probióticos comerciais estudados.



Fonte - elaborado pelo autor.

O produto P2 foi identificado como contendo discrepâncias na sua composição bacteriana em relação ao informado no rótulo. De acordo com o rótulo do P2, o produto deveria conter três espécies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*), uma espécie de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*) e a levedura *S. cerevisiae*. Entretanto, os testes indicaram que a levedura não estava viável sob as condições de ativação empregadas e, conseqüentemente, não foi detectada. A ausência da levedura foi evidente na figura 2, onde o P2 demonstrou apenas dois grupos bacterianos viáveis, diferentemente da composição rotulada.

A ausência de detecção de *S. cerevisiae* no produto P2 sugere que a viabilidade dessa levedura pode ter sido comprometida durante a produção, armazenamento ou ativação do probiótico. Wang *et al.* (2019), que destacam a necessidade de condições específicas para preservar microrganismos sensíveis, como as leveduras, especialmente em processos industriais.

Diversos fatores podem explicar a ausência de uma cepa microbiana em produtos probióticos. Hamilton-Miller *et al.* (1998) destacaram que erros na identificação de cepas ou a

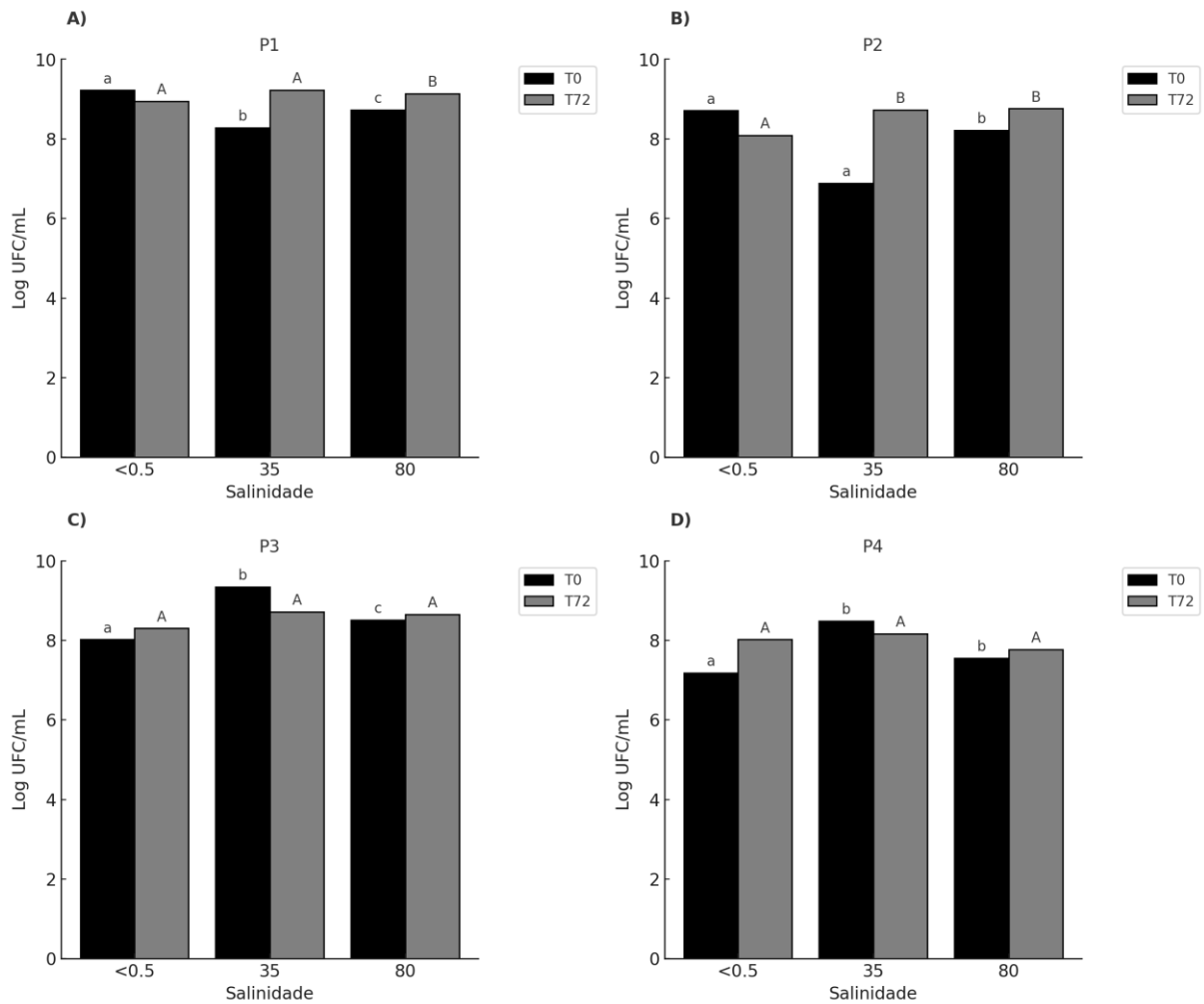
presença de contaminantes durante a fabricação podem comprometer a formulação do produto. Além disso, Denkova *et al.* (2013) observaram que bactérias do grupo ácido láctico podem inibir o crescimento de *S. cerevisiae*, devido à interação antagônica entre os microrganismos de um consórcio probiótico.

Cada cepa possui propriedades únicas, e os benefícios associados aos probióticos dependem da correta combinação e interação entre elas. Ullah *et al.* (2019) enfatizam que o desenvolvimento de consórcios probióticos requer atenção quanto à compatibilidade entre as cepas para evitar efeitos adversos. A inclusão de microrganismos com perfis incompatíveis pode não apenas reduzir a eficácia esperada, mas também gerar resultados inesperados ou indesejados.

7.2.4. Viabilidades dos probióticos comerciais em diferentes salinidades

Os resultados deste estudo demonstraram uma variação significativa nas contagens bacterianas entre os probióticos comerciais analisados, conforme indicado pelo Teste de *Tukey* ao nível de significância de 0,05. Na Figura 9 estão apresentados os dados de crescimento das diferentes formulações nas três salinidades testadas (<0,5, 35 e 80 ppm), tanto no tempo inicial (T0) quanto após 72 h (T72).

Figura 9 – crescimento bacteriano *in vitro* dos probióticos comerciais em diferentes salinidades, comparados ao longo do tempo (0 e 72 h).



a,b,c,d Valores representados pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

*Apresentamos a contagem total em Log UFC/mL representando a somatória das UFC de todos os meios de cultura.

Fonte - elaborado pelo autor.

Os probióticos demonstraram desempenhos variados nas condições testadas, como evidenciado pela análise de variância. O produto P1 destacou-se com os melhores resultados em todas as salinidades, indicando maior viabilidade entre os probióticos analisados. Em contraste, o P4 apresentou os piores resultados gerais, com contagens bacterianas consistentemente abaixo das demais formulações, o que o torna menos eficaz em atender à concentração bacteriana mínima recomendada pelo fabricante. O P3 mostrou desempenho superior em salinidades mais elevadas, sugerindo que suas cepas bacterianas possam ter características halotolerantes que permitem melhor crescimento em ambientes salinos.

O crescimento bacteriano e a viabilidade dos probióticos apresentaram variações

consideráveis nas salinidades testadas, como ilustrado na Figura 9. O P1 apresentou uma taxa de crescimento inicial mais rápida na salinidade <0,5 ppm, mantendo pouca variação ao longo do tempo, enquanto em salinidades de 35 e 80 ppm, o crescimento inicial foi mais lento, mas alcançando contagens semelhantes após 72 h. Por outro lado, o P2 exibiu variações mais suaves ao longo do período de teste em todas as salinidades, mas com crescimento inicial mais lento em 35 ppm. O P3 destacou-se pela maior taxa de crescimento inicial em 35 ppm, enquanto o P4 teve melhor desempenho nessa mesma salinidade, embora sua eficácia geral tenha sido inferior à dos outros produtos.

Essas diferenças reforçam a importância de avaliar a taxa de crescimento e o tempo de duplicação bacteriana, fatores que podem influenciar diretamente a competitividade das bactérias probióticas com a microbiota patogênica do ambiente (VINE; LEUKES; KAISER, 2004). Probióticos com maior taxa de crescimento inicial tendem a colonizar mais rapidamente o ambiente, o que pode beneficiar o cultivo ao reduzir a presença de microrganismos indesejados.

Uma observação relevante foi o bom desempenho de crescimento bacteriano observado em salinidades mais altas, o que pode ser atribuído à presença predominante de *Bacillus* nas formulações. Como bactérias esporogênicas, os *Bacillus* possuem esporos altamente resistentes a condições ambientais adversas, incluindo variações de salinidade, garantindo sua viabilidade durante o armazenamento e aplicação (GIL-TURNES *et al.*, 1999; JESUS *et al.*, 2016; ELSHAGHABEE *et al.*, 2017). Além disso, suas características estruturais, como a espessa camada de peptidoglicano na parede celular, conferem maior resistência ao estresse osmótico causado por altas concentrações de sal (ANDRIANI *et al.*, 2015).

Embora a salinidade possa reduzir a sobrevivência de bactérias probióticas em água salgada, limitando sua aplicação em ambientes marinhos (DAWOOD *et al.*, 2017; JAHANGIRI; ESTEBAN, 2018), a eficácia desses microrganismos pode ser ampliada pela adição direta à coluna d'água. Essa abordagem tem se mostrado mais eficaz em aquicultura marinha, promovendo maior colonização do ambiente e melhorando os resultados zootécnicos (JAHANGIRI; ESTEBAN, 2018; DOAN *et al.*, 2019)

8. CONCLUSÕES

Os probióticos têm se consolidado como uma ferramenta indispensável para os principais produtores de camarão da região, sendo amplamente utilizados por médios e grandes carcinicultores. Entretanto, seu uso ainda é limitado entre micro e pequenos produtores, devido ao elevado custo associado ao cultivo. Essa limitação evidencia a necessidade de estratégias que tornem esses produtos mais acessíveis e de uma melhor disseminação de práticas que otimizem seu uso, garantindo eficiência e custo-benefício.

Os dados observados neste estudo indicam que alterações nos protocolos de aplicação recomendados pelos fabricantes e a adoção de estratégias alternativas no uso dos probióticos podem impactar diretamente os parâmetros de cultivo, especialmente a sobrevivência dos animais. Produtores que seguem rigorosamente as orientações dos fabricantes apresentaram melhores resultados de produção, demonstrando a relevância de práticas padronizadas e baseadas em evidências para alcançar altos índices de desempenho.

Apesar de os produtos analisados atenderem aos limites estabelecidos pela legislação brasileira, foram identificadas discrepâncias significativas entre as quantidades declaradas nos rótulos e os valores reais encontrados. Apenas dois dos produtos testados mostraram consistência em relação ao número de células bacterianas declaradas, enquanto um dos produtos não apresentou as cepas bacterianas prometidas. Essa inconsistência compromete a eficácia do produto, reduzindo seus benefícios no cultivo e potencialmente afetando a saúde dos camarões.

Os agentes ativos presentes nos probióticos demonstraram diferentes padrões de viabilidade quando expostos a condições ambientais adversas, confirmando que sua eficácia depende de fatores como a temperatura, salinidade e manejo no cultivo. Isso reforça a necessidade de um monitoramento constante e de estudos detalhados sobre as condições em que esses produtos são aplicados. A compreensão dessas variáveis é fundamental para garantir o desempenho ideal dos probióticos e atender às demandas específicas de cada sistema de cultivo.

Além disso, as peculiaridades fisiológicas de diferentes bactérias e a interação com os hospedeiros, combinadas com as consideráveis influências ambientais e os métodos de cultivo, tornam inviável estabelecer um único probiótico ou prebiótico para aplicação universal. Por isso, é imprescindível que sejam definidos requisitos específicos para cada contexto de aplicação, respeitando as particularidades de cada sistema de produção. Somente com essa abordagem é possível assegurar a eficiência e a eficácia desses produtos na aquicultura.

Capítulo II - Efeito dos probióticos autóctones e comerciais sobre o desempenho produtivo do camarão marinho *P. vannamei* e na melhoria na qualidade de água do cultivo.

9. INTRODUÇÃO

A intensificação das atividades aquícolas, impulsionada pela expansão do cultivo, tem contribuído para o aumento da incidência de enfermidades. Essa problemática é agravada por fatores como alta densidade de estocagem, baixa qualidade da água, práticas inadequadas de manejo e insuficiência de medidas sanitárias (TELLI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016; BANERJEE; RAY, 2017; MACUSI *et al.*, 2022; SIEW *et al.*, 2023). A intensificação das atividades aquícolas, impulsionada pela expansão do cultivo, tem contribuído para o aumento da incidência de enfermidades. Essa problemática é agravada por fatores como alta densidade de estocagem, baixa qualidade da água, práticas inadequadas de manejo e insuficiência de medidas sanitárias (PANDIYAN *et al.*, 2013; ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016; KNIPE *et al.*, 2021; AMJAD *et al.*, 2022; AMIIN *et al.*, 2023; MORUF; USMAN, 2023).

Embora eficazes em curto prazo, o uso indiscriminado e excessivo destes fármacos apresenta diversos efeitos negativos. Esses incluem a presença de resíduos nos organismos cultivados, a poluição de mananciais e a promoção da resistência de agentes patogênicos, dificultando seu controle futuro (CABELLO, 2006; VIEIRA *et al.*, 2009; TELLI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2016). Tal cenário ressalta a necessidade de alternativas mais sustentáveis, que promovam a eficiência produtiva e reduzam os impactos ambientais (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MOURIÑO *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2022). Entre essas alternativas, o uso de probióticos tem se destacado, trazendo benefícios à saúde dos animais e melhorias nos índices zootécnicos das criações (KNIPE *et al.*, 2021; MORUF; USMAN, 2023).

Os probióticos, especialmente aqueles de origem autóctone, têm demonstrado ser ferramentas profiláticas eficazes na prevenção de enfermidades. Estudos indicam que probióticos isolados do ambiente ou do próprio hospedeiro apresentam maior adaptação às condições de cultivo, como salinidade e temperatura, resultando em melhor desempenho (AKHTER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016). Por isso, o uso de probióticos universais não é recomendado. Desta maneira, para que haja uma maior eficiência, atingindo o máximo potencial, as bactérias que compõem os probióticos devem ter especificidade para o hospedeiro (FERREIRA *et al.*, 2012; LAZADO; CAIPANG, 2014).

Atualmente no mercado é possível encontrar diferentes composições de cepas nos probióticos comerciais testados e utilizados em camarões (AKHTER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; MIANDARE *et al.*, 2016). Por outro lado, produtos probióticos comerciais com cepas

alóctones, isoladas de espécies terrestres ou não-alvo, podem ter eficácia reduzida, limitando os benefícios esperados (AKHTER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de probióticos adequados envolve processos complexos, como a caracterização e triagem de cepas, seguidos de testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar sua eficácia e segurança (LUIS-VILLASENOR *et al.*, 2013). Cepas únicas podem apresentar limitações de ação, enquanto consórcios bacterianos, compostos por múltiplas espécies, oferecem um espectro de ação mais amplo e diversificado (CASTRO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2019). Essa abordagem permite não apenas a melhoria na saúde do hospedeiro, mas também a otimização da qualidade da água e do ambiente de cultivo (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2013; UNTERKIRCHER *et al.*, 2012).

A pesquisa científica nessa área tem avançado significativamente, com inúmeros estudos focados na identificação de probióticos ideais e no desenvolvimento de ferramentas de monitoramento e produção controlada (NIKOSKELAINEN *et al.*, 2001; CHABRILLÓN *et al.*, 2006; BALCÁZAR *et al.*, 2008; AMENYOGBE *et al.*, 2023). Esses esforços buscam suprir as demandas do setor aquícola, promovendo o uso de biotecnologias que integrem sustentabilidade e eficiência. A caracterização e triagem de cepas probióticas têm sido objeto de inúmeros artigos científicos nos últimos anos.

Neste sentido, o objetivo desse capítulo foi desenvolver consórcios bacterianos com princípio probiótico a partir de isolados ambientais e através de testes *in vivo* verificar o efeito dos produtos comerciais e dos consórcios bacterianos formulados em laboratório sobre o desempenho produtivo do camarão marinho *P. vannamei* e na melhoria na qualidade de água do cultivo

10. MATERIAL E MÉTODOS

10.1. Desenvolvimento de Probiótico autóctone

O processo de isolamento de cepas bacterianas autóctones com potencial probiótico envolveu diversas etapas laboratoriais. Inicialmente, realizou-se o processamento das amostras coletadas, seguido pela quantificação e isolamento das bactérias. As colônias isoladas foram submetidas a caracterização morfológica, permitindo a identificação preliminar das características fenotípicas das cepas.

Após essa etapa inicial, foram conduzidos testes específicos para avaliar o potencial probiótico das bactérias. Esses testes incluíram a análise da expressão enzimática, a avaliação da tolerância a diferentes condições de estresse (salinidade, temperatura e pH), e a realização de testes de aderência às superfícies, fundamentais para determinar a capacidade das cepas de colonizar o ambiente intestinal. Além disso, foram analisadas a produção de exopolissacarídeos (EPS), que desempenham um papel importante na formação de biofilmes protetores, e a sensibilidade das cepas a antibióticos por meio de antibiogramas.

Também foi realizado o teste de antagonismo, tanto contra patógenos específicos quanto entre as próprias cepas bacterianas. Essa análise permitiu selecionar as cepas mais promissoras, capazes de inibir o crescimento de microrganismos prejudiciais e manter um equilíbrio adequado dentro do consórcio bacteriano.

Com base nos resultados obtidos, as cepas selecionadas foram combinadas para formar consórcios bacterianos específicos. Esses consórcios foram submetidos ao processo de liofilização, garantindo a viabilidade e estabilidade das bactérias durante o armazenamento e transporte. Posteriormente, os consórcios liofilizados foram incorporados a substratos de cultura, tornando-os adequados para a realização de testes *in vivo*.

10.1.1. Coleta e processamento da amostra

A produção de probióticos autóctones iniciou-se com a coleta de amostras de água provenientes do canal de abastecimento de uma fazenda de cultivo de camarão marinho (*Penaeus vannamei*), localizada na cidade de Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte. A escolha dessa fonte se deu pela relevância de utilizar microrganismos nativos, adaptados às condições locais, o que pode aumentar a eficácia dos probióticos no ambiente de cultivo.

As amostras foram coletadas em três pontos distintos ao longo do canal de abastecimento, garantindo uma representatividade adequada da microbiota presente. Para evitar

contaminações e obter dados confiáveis, a coleta foi realizada cerca de 30 centímetros abaixo da superfície da lâmina d'água, onde há menor influência de fatores externos como vento ou resíduos flutuantes.

As análises da qualidade da água coletada, apresentadas na Tabela 9, fornecem informações importantes sobre os parâmetros físico-químicos, essenciais para a caracterização do ambiente e a seleção dos microrganismos probióticos. Esses dados são fundamentais para assegurar que as cepas selecionadas sejam eficazes e seguras para o uso em sistemas de cultivo.

Tabela 9 – Características limnológicas da água coletada na fazenda de cultivo de camarão marinho para o desenvolvimento do probiótico autóctone.

Parâmetros	Amostra	Níveis de Referência
Salinidade (ppt)	35	0,5 – 35
Transparência (cm)	33,75	30 – 50
Temperatura (°C)	29,14	28 - 32 ° C
pH	7,4	6 – 9
ORP (mv)	137,89	400 – 500
Cond. Elétrica (us/cm)	45,92	23 – 71
Turbidez (NTU)	103,34	≤ 100
OD (mg/l)	7,31	5,0 – 9
% OD	116,54	-
TDS (g/L)	28,11	100
Clorofila A [ug/l]	5,69	≤ 30
Amônia [mg/l]	0,09	< 1
Nitrato [mg/l]	1,00	< 10
Nitrito [mg/l]	0,10	< 20
Ortofosfato [ug/l]	99,78	5 – 200
TIC [mg/l]	24360,00	-
TC [mg/l]	44892,94	-
TOC [mg/l]	19613,00	-
Fósforo Total [ug/l]	505,12	1 – 100
MO (mg/L)	4,73	≤ 4
Sólidos suspensos (mg/L)	212,00	500
Sólidos Totais (ml/L)	1,50	10

Fonte - elaborado pelo autor.

Legenda - ORP - Potencial de Oxiredução, OD - Oxigênio dissolvido, TDS - Sólidos totais dissolvidos, TC - Carbono total, TIC - Carbono inorgânico total, TOC - Carbono orgânico total, MO - Matéria Orgânica.

As amostras de água foram coletadas e acondicionadas em frascos estéreis contendo 250 mL de água peptonada a 1% de NaCl. Em seguida, foram transportadas, em temperatura ambiente, ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará, onde foram imediatamente processadas. O objetivo foi determinar a comunidade bacteriana presente nas amostras, classificando-as em três principais grupos: bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), *Bacillus* (BAC) e bactérias participantes do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos, subdivididas em bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias oxidadoras de nitrito (BON).

Para a quantificação dos grupos de BHC e *Bacillus*, utilizou-se solução salina a 1% NaCl para formar a primeira diluição (10^{-1}). Em seguida, diluições seriadas foram realizadas até 10^{-6} . Aliquotas de 1,0 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de *Petri* contendo o meio de cultura *Plate Count Ágar* (PCA), utilizando a técnica de *Pour-plate*. As placas foram preparadas em duplicata para cada diluição (10^{-3} a 10^{-6}). Após homogeneização e solidificação do meio, as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 h para o grupo BHC, conforme descrito por Bettiol (1995).

Para o grupo *Bacillus*, o procedimento foi semelhante, mas incluiu um tratamento térmico adicional. Após as diluições, as amostras foram submetidas a um banho-maria a 70°C por 60 min antes do plaqueamento, para favorecer a contagem de bactérias esporulantes. Após o período de incubação, realizou-se a contagem das colônias utilizando o método de contagem padrão em placas (CPP), considerando aquelas que apresentaram entre 25 e 250 colônias, como recomendado por Downes e Ito (2001).

A quantificação das bactérias participantes do ciclo do nitrogênio foi realizada com o uso de meios de cultura específicos para cada grupo, conforme metodologia adaptada de MARÍN *et al.* (2012). A Tabela 10 apresenta os detalhes dos meios de cultura utilizados, garantindo a precisão e especificidade no crescimento e identificação desses microrganismos.

Tabela 10 – Composição de meios seletivos para quantificação dos grupos de bactérias participantes do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos.

Composto químico (g/L)	Oxidadoras de amônia (g/L)	Oxidadoras de nitrito (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	-
K ₂ HPO ₄	1,0	1
KH ₂ PO ₄	0,027	0,27
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,03	0,03
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	0,1
CaCO ₃	7,5	1,0
CaCl ₂	0,01	0,3
KNO ₂ ou NaNO ₂	-	0,01
Elementos traços	1	1
pH	7,5	7,5

Fonte - Marín *et al.* (2012) – Adaptação do autor

A análise microbiológica das amostras de água coletadas na fazenda foi realizada por meio de diluições seriadas, variando de 10⁻¹ a 10⁻⁶. De cada diluição, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para uma série de cinco tubos de ensaio contendo 10,0 mL de meios específicos, conforme descrito em protocolos estabelecidos (APHA, 2000; MARÍN *et al.*, 2012). Os tubos foram incubados a 28°C por 21 dias. Após esse período, foram adicionados reagentes específicos para revelar a atividade bacteriana relacionada ao ciclo do nitrogênio.

Na análise de bactérias fixadoras de amônia, adicionou-se 0,5 mL do reagente de *Nessler* aos tubos. A presença de NH₄⁺ foi confirmada pela coloração amarelada a esverdeada, indicando um resultado positivo. Para a detecção de bactérias nitrificantes, utilizou-se o reagente de *Griess-Ilosvay*. A presença de nitrito, confirmada pela coloração vermelha, indicava um teste positivo para nitrificação. Em casos em que a coloração permanecia transparente, foi adicionada uma pequena quantidade de zinco. Esse procedimento permitia verificar a presença de nitrito residual, confirmando o processo completo de nitrificação (MARÍN *et al.*, 2012).

Dos tubos com resultados positivos, alíquotas do material biológico foram retiradas e cultivadas em meios seletivos sólidos para o isolamento e posterior identificação das bactérias participantes do ciclo do nitrogênio.

10.1.2. Isolamento e identificação das colônias

O processo de isolamento dos diferentes grupos bacterianos seguiu critérios específicos, considerando características como tamanho, textura, forma e coloração das colônias crescidas em meios seletivos. Após o crescimento nas placas de cultivo, as colônias foram quantificadas, selecionadas e isoladas para a obtenção de culturas puras. Cada meio de cultura utilizado forneceu 15 colônias representativas dos distintos grupos bacterianos, que foram transferidas para tubos inclinados contendo o mesmo meio de origem.

Esses tubos foram incubados a 35°C por 24 h, assegurando o crescimento das culturas e permitindo a verificação de sua pureza. As colônias puras, então, foram submetidas ao processo de identificação. A análise morfológica e estrutural das bactérias foi realizada utilizando a técnica de coloração de Gram, que permite classificar as bactérias de acordo com as características de sua parede celular. Para essa etapa, as cepas foram previamente renovadas em meio ágar TSA e incubadas novamente sob as mesmas condições de temperatura e tempo (35°C por 24 h).

10.1.3. Critérios empregados para a seleção de cepas probióticas

10.1.3.1. Testes de estabilidade a estresse

10.1.3.1.1. Teste de Termorresistência

Para avaliar o crescimento das cepas bacterianas sob diferentes condições de temperatura, foi empregada a metodologia descrita por Cai *et al.* (1999), com as devidas adaptações para o presente estudo. As cepas isoladas foram inoculadas em tubos contendo caldo TSB suplementado com 1% de NaCl, para simular condições favoráveis ao desenvolvimento bacteriano.

Os tubos foram incubados em duas temperaturas distintas, 4°C e 40°C, permitindo a análise da viabilidade das bactérias em ambientes com variações extremas de temperatura. Após 24 h de incubação, os resultados foram avaliados visualmente, observando-se a turvação do meio de cultura como indicador do crescimento bacteriano.

10.1.3.1.2. Teste de crescimento em diferentes pHs

Para avaliar a tolerância das cepas bacterianas a diferentes valores de pH, foi utilizada uma metodologia adaptada de Cai *et al.* (1999). Nesse procedimento, as cepas isoladas foram inoculadas em tubos contendo caldo TSB suplementado com 1% de NaCl, ajustados para os valores de pH 5,0 e 9,0. Os tubos foram então incubados a 35°C por um período de até 48 h. Após o período de incubação, a análise dos resultados foi realizada com base no crescimento das cepas bacterianas, identificado pela turvação do meio.

10.1.3.1.3. Teste de crescimento em diferentes salinidades

A análise do crescimento de cada cepa bacteriana em diferentes salinidades foi realizada utilizando tubos contendo caldo TSB ajustado a três níveis distintos de salinidade: <0,5 ppt, 35 ppt e 80 ppt. Cada cepa foi inoculada nos respectivos caldos, de acordo com a salinidade, para avaliar sua capacidade de adaptação às diferentes condições. Após a inoculação, os tubos foram incubados por até 48 h. O crescimento das cepas foi determinado pela observação da turvação no meio de cultura.

10.1.3.2. Caracterização fenotípica

Os isolados bacterianos foram submetidos a testes fenotípicos para avaliar sua capacidade de formar biofilmes, sendo utilizados os seguintes métodos:

10.1.3.2.1. Teste de formação de exopolissacarídeos (EPS)

Baseado na metodologia de Freeman, Falkiner e Keane (1989), com adaptações, as bactérias foram cultivadas em meio de ágar vermelho congo (AVC). Para compor o meio AVC, o corante vermelho congo foi adicionado ao meio *Brain Heart Infusion Agar* (BHI) (0,8 g para cada 1 L), com adição de 36 g de sacarose. As cepas bacterianas, previamente renovadas em ágar TSA, foram repicadas sobre a superfície do meio AVC em placas de *Petri* e incubadas a 35°C por 24 h. Após esse período, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 48 h, e então realizou-se a leitura.

As cepas foram consideradas produtoras de exopolissacarídeos (EPS) quando colônias escuras foram visualizadas sob a placa de AVC, devido à interação entre o corante vermelho congo e os exopolissacarídeos. Já as cepas não produtoras permaneceram sem pigmentação.

10.1.3.2.2. Teste de aderência em microplaca de poliestireno (TMC)

O teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC), adaptado de Christensen *et al.* (1985), foi conduzido para avaliar a formação de biofilmes bacterianos. As cepas foram inicialmente cultivadas em caldo TSB contendo 1% de NaCl e incubadas a 35°C por 24 h. Em seguida, 200 µL das culturas foram inoculados em triplicata em microplacas de poliestireno com fundo em “U”. As placas foram incubadas novamente a 35°C por 48 h, sem agitação.

Após a incubação, os inóculos foram descartados e os poços lavados três vezes com 200 µL de água destilada estéril. As microplacas foram então secas em estufa a 60°C por 1 hora. Para a coloração, adicionaram-se 200 µL de solução de cristal violeta a 1%, permanecendo em repouso à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, realizou-se a remoção do corante com lavagens sucessivas utilizando água destilada, e as placas foram secas novamente à temperatura ambiente.

O resultado foi considerado positivo para formação de biofilmes quando o corante cristal violeta permaneceu aderido às paredes dos micropoços, indicando a presença de células bacterianas agregadas.

10.1.3.3. Detecção da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática e do potencial de virulência dos isolados bacterianos foi realizada por meio de testes específicos para enzimas extracelulares relacionadas à patogenicidade, como proteases (caseínase e gelatinase), lipase, celulase e amilase, além da análise da hemólise na hemolinfa de camarão. Para cada ensaio, as cepas bacterianas foram cultivadas previamente em caldo TSB com 1% de NaCl e incubadas a 35°C por 24 h, utilizando-se 4 µL de inóculo em cada teste.

10.1.3.3.1. Caseínase

A detecção de caseínase foi realizada conforme Rodrigues *et al.* (1993), com adaptações. As cepas bacterianas, previamente cultivadas em caldo TSB com 1% de NaCl a 35°C por 24 h, foram padronizadas utilizando 4 µL de cada inóculo. Em seguida, foram

inoculadas em placas contendo ágar nutriente suplementado com 5% de leite em pó desnatado, compondo o meio seletivo conhecido como ágar leite.

As placas foram incubadas a 35°C por até 5 dias. A atividade enzimática foi evidenciada pela formação de halos transparentes ao redor das colônias, indicando a hidrólise da caseína presente no meio. Esse resultado confirma a produção de caseínase pelas cepas testadas.

10.1.3.3.2. Gelatinase

O teste seguiu a metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (1993) para avaliar a atividade gelatinolítica de cepas bacterianas. Inicialmente, as bactérias foram inoculadas em placas de *Petri* contendo meio PCA suplementado com 0,5% de gelatina. As placas foram incubadas a 35°C por até 5 dias, permitindo o crescimento das colônias e a interação das enzimas produzidas pelas bactérias com o substrato gelatina.

Após o período de incubação, foi aplicada uma solução saturada de sulfato de amônio sobre o meio, funcionando como agente revelador. A presença de halos transparentes ao redor das colônias indicou positividade para a atividade do teste, evidenciando que as enzimas secretadas pelas bactérias degradaram a gelatina presente no meio. Este resultado demonstra a capacidade das cepas em hidrolisar gelatina, um indicativo importante em estudos enzimáticos ou de identificação bacteriana.

10.1.3.3.3. Amilase

O teste para determinação da produção de amilase foi conduzido conforme as recomendações de Rodrigues *et al.* (1993). As cepas bacterianas foram inoculadas em placas de ágar nutriente suplementado com 0,1% de amido solúvel. As placas foram incubadas a 35°C por um período de 24 a 48 h.

Após a incubação, foi aplicado lugol a 1% sobre a superfície das placas. A presença de halos transparentes ao redor das colônias indicou atividade enzimática, confirmando a capacidade das cepas de produzir amilase. Esse resultado ocorre porque a enzima amilase degrada o amido presente no meio, formando áreas livres do substrato que, ao entrarem em contato com o lugol, permanecem sem coloração, contrastando com o restante da placa.

10.1.3.3.4. Celulase

A avaliação da produção de celulase foi realizada com base no protocolo descrito por Teather e Wood (1982), com adaptações. O procedimento consistiu na inoculação das cepas bacterianas em placas de ágar carboximetilcelulose (CMC). O meio foi preparado utilizando 3,27 g de componentes minerais, acrescidos de 1% de CMC e 15 g de ágar-ágar por litro de solução.

As placas foram incubadas a 35°C por um período de 24 a 48 h, permitindo o crescimento bacteriano e a potencial interação com o substrato CMC. Após a incubação, uma solução de vermelho congo a 1% foi adicionada às placas para visualizar a atividade enzimática. A presença de halos claros ao redor das colônias foi interpretada como resultado positivo, indicando a degradação da carboximetilcelulose pelo complexo celulolítico produzido pelas cepas bacterianas.

10.1.3.3.5. Hemólise

A atividade hemolítica foi avaliada conforme a metodologia de Chang *et al.* (2000), com adaptações para camarões *Penaeus vannamei*. Para a coleta da hemolinfa, utilizou-se uma seringa estéril de 1 mL com agulha, inserida na região entre o primeiro e o segundo pleópodes dos camarões. Antes da coleta, a seringa foi previamente lavada com um tampão citrato-EDTA, preparado com 0,1 M de glicose, 30 mM de citrato trissódico, 26 mM de ácido cítrico e 10 mM de EDTA, dissolvidos em água do mar a 20 ppt. O pH da solução foi ajustado para 4,6, e o tampão foi esterilizado a 121°C por 15 min.

Após a coleta, 1 mL da hemolinfa foi imediatamente transferido para um tubo estéril contendo 0,2 mL do tampão citrato-EDTA. Em seguida, a hemolinfa foi corada com a adição de 133 µL de uma solução de rosa bengala a 3%, previamente dissolvida no mesmo tampão citrato-EDTA. Para o cultivo bacteriano, utilizou-se ágar PCA como meio base, ao qual foi adicionado 1 mL da hemolinfa corada para cada 15 mL de meio. Essa mistura foi homogeneizada e vertida em placas de *Petri*, onde as cepas bacterianas foram inoculadas. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h.

Após o período de incubação, a presença de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas foi interpretada como indicativo de atividade hemolítica, confirmando a produção de hemolisinas capazes de degradar os componentes da hemolinfa. Esse método, com a

utilização de rosa bengala como marcador visual, permite uma identificação eficiente da atividade hemolítica em microrganismos associados à hemolinfa de camarões.

10.1.3.4. Antibiograma

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados seguindo as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010), utilizando os principais antibióticos empregados na aquicultura: Cloranfenicol (30µg), Oxitetraciclina (30µg), Florfenicol (30µg) e um antibiótico de amplo espectro Ácido Nalidíxico (30µg).

As cepas foram renovadas em ágar TSA suplementado com 1% de NaCl e incubadas a 35°C por 24 h. Após o crescimento, as culturas foram ajustadas à escala 0,5 de *McFarland*, equivalente a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando solução salina a 1% e espectrofotômetro para garantir precisão. Após isso, com auxílio de um swab estéril, as cepas ajustadas foram uniformemente estriadas sobre placas de ágar *Mueller-Hinton*, criando um tapete bacteriano sobre toda a superfície do meio.

Os discos com os antibióticos selecionados foram colocados na superfície do ágar, utilizando-se pinças previamente esterilizadas. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h para permitir a difusão dos antimicrobianos no meio e a formação de halos de inibição.

Após a incubação, os diâmetros dos halos de inibição ao redor dos discos foram medidos e comparados com os padrões descritos por Charteris *et al.* (1998). Com base nesses critérios, as cepas foram classificadas como sensíveis ou resistentes aos antibióticos testados (Tabela 11).

Tabela 11 – Agentes antimicrobianos e diâmetros de zona interpretativa para teste de sensibilidade a antibióticos por difusão de disco.

Antibióticos		Zona interpretativa dos diâmetros antimicrobianos (mm)		
Nome	Conc/disco (µg)	Resistente	Intermediária	Sensível
Florfenicol	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Oxitetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Cloranfenicol	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Ácido Nalidíxico	30	≤ 13	14-17	≥ 18

Fonte - Charteris *et al.* (1998) – Adaptação do autor

10.1.3.5. Testes de atividade antagonista

As bactérias foram submetidas a testes de antagonismo com o objetivo de selecionar estirpes adequadas para a composição de um consórcio microbiano destinado à formulação de probióticos. Esses testes avaliaram a interação entre as cepas selecionadas e sua capacidade de inibir patógenos, utilizando dois métodos distintos:

- Estrias cruzadas (*Streak Cross*): Adaptado de Williston *et al.* (1947), este método consiste em inocular as bactérias em padrões cruzados em um meio sólido, permitindo a observação de interações diretas entre as estirpes.
- *Plugs* de ágar: Baseado na técnica descrita por Nasser *et al.* (2003), este método envolve o uso de discos contendo as bactérias de interesse, que são posicionados em placas para avaliar sua ação inibitória contra patógenos.

Esses testes são indispensáveis para a formação de consórcios microbianos, pois identificam estirpes que mantêm interações ecológicas positivas ou neutras, possibilitando sua inclusão em um mesmo grupo. Além disso, avaliam bactérias com atividade antagonista contra patógenos, um critério essencial na seleção de probióticos eficazes.

10.1.3.5.1. Teste de antagonismo entre as cepas

10.1.3.5.1.1. Técnica de estrias cruzadas (*cross streak*)

As cepas bacterianas selecionadas para os testes foram inicialmente renovadas em caldo TSB contendo 1% de NaCl, sendo incubadas a 35°C por 24 h. Após esse período, foram transferidas para placas de ágar TSA, também suplementadas com 1% de NaCl, onde foram realizados os testes de antagonismo.

No procedimento experimental, a cepa a ser testada foi inoculada na posição central da placa, formando uma estria longitudinal. As demais cepas foram inoculadas em estrias perpendiculares a ela, mantendo-se uma distância de 1 cm entre elas e a linha central. As placas foram então incubadas a 35°C por 24 h para avaliação dos resultados.

Os resultados foram interpretados com base no padrão de crescimento observado. Quando havia inibição do crescimento da cepa central, considerava-se um antagonismo positivo, indicando que a cepa perpendicular exercia efeito inibitório. Por outro lado, a ausência de inibição, com o encontro das estrias perpendiculares com a central, indicava antagonismo negativo, de acordo com a metodologia adaptada de Williston *et al.* (1947).

10.1.3.5.1.2. *Plugs* de ágar

Inicialmente, as cepas foram renovadas em caldo TSB contendo 1% de NaCl, incubadas a 35°C por 24 h. Após esse período, as bactérias foram transferidas para placas de ágar TSA com 1% de NaCl, utilizando um *swab* estéril para espalhar o inóculo de forma homogênea, criando um tapete bacteriano na superfície do meio. As placas foram então incubadas por mais 24 h a 35°C.

Em seguida, discos de ágar inoculado (*plugs*), com 6 mm de diâmetro, foram cuidadosamente cortados dessas placas e posicionados sobre novas placas contendo o inóculo de outras cepas bacterianas. As placas foram incubadas novamente a 35°C por 24 h.

A capacidade de inibição do crescimento das cepas patogênicas foi avaliada pela formação de halos claros ao redor dos discos de ágar, indicando a ação antagonista das bactérias testadas, conforme descrito na metodologia de Nasser *et al.* (2003).

10.1.3.5.2. Teste de antagonismo contra patógenos

Para avaliar o antagonismo contra patógenos, foi conduzida uma análise utilizando duas estirpes bacterianas amplamente reconhecidas na carcinicultura por seu potencial patogênico: *Vibrio harveyi* (ATCC14126) e *Vibrio parahaemolyticus* (IOC18950). O objetivo deste procedimento foi selecionar cepas com potencial de inibição de bactérias patogênicas para o organismo hospedeiro.

O experimento foi realizado em placas de ágar TSA, nas quais foi inserido um inóculo central contendo os patógenos. Posteriormente, as estirpes bacterianas em teste foram inoculadas em estrias transversais, mantendo uma distância de 1 cm do traço principal, permitindo a avaliação da interação entre as bactérias.

Após a etapa de inoculação, as placas foram mantidas a 35°C por 24 h. O antagonismo foi identificado pela formação de zonas de inibição ao redor das estirpes testadas, demonstrando sua capacidade de restringir o crescimento dos patógenos, conforme descrito por Al-Khalidi (2017).

10.1.4. Formação dos consórcios bacterianos probióticos

Os resultados dos testes mencionados anteriormente serviram como critérios para selecionar as cepas utilizadas na elaboração de dois consórcios bacterianos destinados a

aplicação como probióticos em experimentos *in vivo*. Um consórcio foi formado por estirpes do gênero *Bacillus*, enquanto o outro reuniu bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio (BOA e BON).

Para preparar os consórcios e concentrar as células bacterianas, as cepas foram inicialmente cultivadas em tubos contendo ágar TSA a 35°C por 24 h. Em seguida, foram transferidas individualmente para *Erlenmeyer* com 200 mL de caldo TSB. As culturas foram incubadas em agitador *shaker* com rotação de 100 RPM por 24 h a 30°C. Após esse período, as suspensões foram centrifugadas em tubos Falcon a 5.000 RPM por 10 min a 25°C, permitindo a separação das células em forma de *pellets*, enquanto o sobrenadante era descartado.

Os *pellets* obtidos foram ressuspensos individualmente em 15 mL de solução salina contendo 0,85% de NaCl e armazenados em recipientes esterilizados, organizados conforme os consórcios pré-determinados. Por fim, uma alíquota de 1 mL de cada suspensão foi retirada para a quantificação da densidade bacteriana, garantindo o controle de qualidade dos consórcios preparados.

10.1.4.1. Determinação da densidade bacteriana

Para cada consórcio, as soluções ressuspensas foram consideradas na diluição inicial de 10^{-1} , a partir da qual foram feitas diluições seriadas até 10^{-8} . Em seguida, alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de *Petri*, utilizando a técnica *Pour-plate* com o meio ágar TSA, e as placas foram incubadas a 35°C por 24 h. Após o período de incubação, realizou-se a contagem das colônias formadas nas placas, com o objetivo de determinar a densidade celular inicial do consórcio.

10.1.4.2. Liofilização

As culturas foram submetidas a congelamento em freezer a -20°C por 24 h e, em seguida, liofilizadas. Antes do congelamento, foi aplicada uma camada de óleo mineral esterilizado sobre as amostras, garantindo a criopreservação dos microrganismos em condições de baixas temperaturas. Após o congelamento, as amostras passaram pelo processo de liofilização utilizando um liofilizador convencional (Liotop, L101), operando a uma pressão de 0,200-0,300µHg e temperatura de -50°C por 72 h.

10.1.4.3. Viabilidade das células após liofilização

Para quantificação da viabilidade das células após liofilização, pesou-se 0,01 g do material liofilizado de cada consórcio, que foi ressuspensionado em 10 mL de solução salina a 0,85%, correspondendo à diluição de 10^{-1} . A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 30 min para ativação do material liofilizado. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas até a concentração de 10^{-8} , com posterior plaqueamento utilizando a técnica *de pour-plate* em meio de ágar TSA.

As placas foram incubadas a 35°C por 48 h, ao final das quais foi realizada a contagem das colônias. O rendimento da recuperação de bactérias viáveis foi calculado considerando a quantificação das células viáveis da suspensão bacteriana e a quantificação após o processo de liofilização.

O rendimento da recuperação de bactérias viáveis após todo o processo foi calculado considerando a quantificação das células viáveis da suspensão bacteriana e a quantificação após o processo de liofilização.

Equação 2 - Equação utilizada para o cálculo do rendimento da recuperação bacteriana

$$\text{RENDIMENTO} = \frac{N_{\text{Liofilizado}}}{N_{\text{Suspensão}}} \times 100$$

Após o processo de liofilização, foi preparada a mistura probiótica para os dois consórcios. As bactérias liofilizadas foram incorporadas a um substrato na proporção de 1 g de bactéria para cada 100 g de substrato. Após a homogeneização do material, retirou-se uma amostra de 1 g da mistura, que foi ressuspensionada em solução salina a 0,85% e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min para ativação.

Em seguida, realizaram-se diluições seriadas da solução ativada, que foram plaqueadas em ágar TSA para a contagem de células viáveis, permitindo a avaliação da viabilidade bacteriana na mistura probiótica.

10.1.5 Análise de dados

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva, com tabelas e gráficos para representar o perfil das variáveis estudadas. Essa abordagem permitiu uma melhor compreensão dos padrões e tendências observados, facilitando a interpretação dos resultados obtidos.

10.2. Experimento *In vivo*

10.2.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Setor de Aquicultura da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizado em Mossoró, Rio Grande do Norte. Foram utilizadas 21 unidades experimentais, compostas por tanques circulares de polietileno com capacidade de 1000 litros e área operacional de 1,13 m². Cada tanque contava com sistema de aeração individual, equipado com mangueiras porosas microperfuradas.

A preparação dos tanques incluiu uma lavagem com água doce corrente e desinfecção com ácido clorídrico. Em seguida, os tanques foram abastecidos com água de poço com salinidade inicial de 4 ppt, ajustada para 35 ppt por meio da adição de cloreto de sódio não iodado. Para garantir a segurança da água, utilizou-se o desinfetante veterinário Virkon S e foi adicionado o quelante EDTA (1 g/500 L) para mitigar os possíveis efeitos tóxicos de metais pesados provenientes do cloreto de sódio.

Após o abastecimento, sete dias antes do povoamento, foi realizada a fertilização das unidades experimentais e do berçário para promover o desenvolvimento inicial de microalgas nos tratamentos. O fertilizante utilizado era uma mistura de farelo de arroz, melão de cana e silicato de magnésio, aplicado na proporção de 100 mg/L. A quantidade foi ajustada de acordo com a ração fornecida, buscando uma relação carbono-nitrogênio (C:N) de aproximadamente 20:1.

Além disso, foi feita a correção iônica da água para equilibrar as proporções de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K), visando alcançar uma relação próxima à da água do mar (1:3:1), conforme especificado na Tabela 12. Essas etapas foram cuidadosamente conduzidas para assegurar condições ótimas para o desenvolvimento do experimento.

Tabela 12 – Parâmetros de balanço iônico da água utilizado no experimento.

Parâmetros	Poço	Poço+Nacl	Após a correção da relação Ca - Mg - K
Cálcio	240	260	380
Magnésio	30	41	960
Potássio	12	6	200

Fonte - elaborado pelo autor.

As pós-larvas, criadas em salinidade de 35 ppt, foram adquiridas no Laboratório de Produção de Pós-Larvas de Camarão Marinho (ICAMARON), localizado em Icapuí, Ceará. Essas pós-larvas estavam no estágio PL12, com peso médio de 0,0045 g. Ao chegarem ao local do experimento, foram aclimatadas em um tanque de 1000 L, que funcionou como berçário antes do povoamento das unidades experimentais. O experimento teve duração de 60 dias, com densidade de estocagem de 150 camarões/m² em cada unidade experimental.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e três repetições cada. Os tratamentos incluíram: P1, P2, P3, P4 (probióticos comerciais), P5 e P6 (consórcios probióticos autóctones) e o tratamento controle onde não houve a adição de probiótico. Os probióticos comerciais e os consórcios autóctones foram aplicados duas vezes por semana, seguindo as recomendações dos fabricantes ou protocolo correspondente. A aplicação na água iniciou-se uma semana antes do povoamento dos camarões.

10.2.2. Manejo alimentar

O manejo alimentar foi padronizado para todos os tratamentos, utilizando o método de distribuição por voleio, combinado com bandejas de controle. Foram empregadas três fases de ração comercial, conforme descrito na Tabela 13:

Tabela 13 – Caracterização das rações comerciais utilizadas no experimento.

Fases	PB (%)	P (%)	E.E. (%)	Granulometria (mm)
Fase 1	40	1,3	0,9	0,54 a 1,0
Fase 2	40	1,3	0,9	1,0 a 1,8
Fase 3	35	1,2	0,85	2,5

Fonte - elaborado pelo autor.

Legenda - % PB - Porcentagem de proteína bruta na ração; % P - Porcentagem de fósforo na ração, % E.E - Porcentagem de extrato etéreo.

A Fase usada desde o povoamento até 10 dias de cultivo; Fase 2 usada logo após a fase 1 até o camarão atingir 3 g e a Fase 3 (ração de engorda) utilizada a partir de 3 g até a despesca. A alimentação foi ofertada em duas refeições diárias, representando 10% da biomassa até os camarões atingirem 1 g de peso médio. A partir desse ponto, a taxa de alimentação foi

gradualmente reduzida para 4% da biomassa até o final do experimento. A quantidade de ração foi ajustada semanalmente, com base no peso médio dos camarões, determinado por biometrias regulares.

10.2.3. Parâmetros físico-químicos

Parâmetros como pH, temperatura e oxigênio dissolvido foram monitorados diariamente, duas vezes ao dia, pela manhã e à noite. Semanalmente, foram avaliados salinidade, condutividade elétrica, potencial de oxirredução, turbidez e sólidos totais dissolvidos (TDS) em todas as unidades experimentais, utilizando uma sonda multiparamétrica (Horiba U-50, Kyoto, Japão). No mesmo intervalo, também foram realizadas análises de clorofila a amônia, nitrito e nitrato, com coleta de amostras da coluna d'água. Essas amostras foram armazenadas adequadamente para posterior filtragem a vácuo em laboratório, utilizando filtros de membrana de celulose (47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 μm). As concentrações foram determinadas por espectrofotometria, seguindo os protocolos estabelecidos para cada análise.

Além disso, foram realizadas contagens semanais das densidades de microalgas em cada tratamento, utilizando uma câmara de Neubauer. Complementarmente, a quantidade de sólidos suspensos e sedimentáveis foi avaliada semanalmente, permitindo o acompanhamento das condições físicas e biológicas da água em cada unidade experimental. Esses monitoramentos permitem maior controle para a manutenção da qualidade da água ao longo do experimento.

10.2.4. Desempenho zootécnico

Durante o experimento, o desempenho dos camarões foi avaliado por meio de biometrias semanais realizadas em cada unidade experimental. Essas medições permitiram acompanhar a curva de crescimento dos animais e ajustar a quantidade de ração fornecida de forma precisa. Seguindo práticas adotadas em fazendas comerciais de cultivo de camarão, a primeira biometria foi realizada apenas após 30 dias de cultivo, garantindo uma análise mais representativa do desenvolvimento inicial.

Ao final do período experimental, foram analisados os seguintes parâmetros zootécnicos: peso médio final (PM), ganho de peso semanal (GP), ganho de peso diário (GPD), biomassa final (BF), taxa de crescimento específico (TCE %), sobrevivência (S%), produtividade (P), fator de conversão alimentar (FCA). Os cálculos desses indicadores seguiram as fórmulas propostas por Bessa Junior *et al.* (2012), assegurando rigor e padronização na análise dos

resultados. Esses parâmetros forneceram uma avaliação detalhada do desempenho zootécnico dos camarões, possibilitando a comparação entre os tratamentos realizados.

Equação 3 - Peso médio final

$$\text{Peso médio final (g)} = \frac{\text{peso total dos animais amostrados}}{\text{quantidade de animais}}$$

Equação 4 – Ganho de peso

$$\text{Ganho de peso} = \text{peso médio final (g)} - \text{peso médio inicial (g)}$$

Equação 5 - Ganho de peso semanal

$$\text{Ganho de peso semanal} = \frac{\text{peso médio final (g)} - \text{peso médio inicial (g)}}{\text{Dias de Experimento}}$$

Equação 6 – Biomassa final

$$\text{Biomassa final(g)} = \text{n}^\circ \text{ final de indivíduos} \times \text{PM (g)} \times 1000$$

Equação 7 – Taxa de Crescimento Específico

$$\text{Taxa de Crescimento Específico (\%)} = \frac{(\text{Ln Pf} - \text{Ln Pi})}{\text{Dias de Experimento}} \times 100$$

Equação 8 – Sobrevivência

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{número final de indivíduos}}{\text{número inicial de indivíduos}} \times 100$$

Equação 9 - Produtividade

$$\text{Produtividade (kg/ha)} = \frac{\text{biomassa final}}{\text{Área de cultivo}}$$

Equação 10 – Fator de conversão alimentar

$$\text{Fator de Conversão alimentar (FCA)} = \frac{(\text{quantidade de ração consumida (g)})}{(\text{biomassa final (g)})}$$

10.2.5. Análise de dados

Os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Essas análises preliminares garantiram a adequação dos dados para os procedimentos estatísticos subsequentes.

Para avaliar as diferenças entre os tratamentos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nos casos em que foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, aplicou-se o teste de *Tukey* para a comparação das médias, também em nível de significância de 5%.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1. Probióticos autóctones

11.1.1. Quantificação e Isolamento das bactérias do cultivo

O resultado da quantificação pela técnica de contagem padrão em placas para os diferentes grupos bacterianos estão presentes na tabela 14.

Tabela 14 – Média das contagens das populações bacterianas analisadas

Grupos bacterianos	Média (UFC/mL)
BHC	$3,0 \times 10^4$
BAC	$5,0 \times 10^4$
BOA	Incontável
BON	Incontável

Fonte - elaborado pelo autor.

Legenda - BHC - bactérias heterotróficas cultiváveis, BAC - *Bacillus*, BOA - bactérias oxidadoras de amônia, BON - bactérias oxidadoras de nitrito.

Entre os grupos bacterianos analisados, destacou-se a alta densidade de bactérias oxidadoras, tanto de amônia quanto de nitrito, com um crescimento considerado incontável de UFC. Esses microrganismos desempenham um papel fundamental nos processos de nitrificação, que são essenciais para a manutenção da qualidade da água em sistemas aquícolas. A presença expressiva desses grupos indica a relevância de sua atividade no ambiente de cultivo, corroborando estudos anteriores que ressaltam a importância do equilíbrio microbiológico para a saúde e o desempenho zootécnico dos camarões (HLORDZI *et al.*, 2020; MEHLA *et al.*, 2023).

Foram isoladas 50 cepas bacterianas nas quais 43 apresentaram crescimento. Destas, 37 foram identificadas como Gram-positivas, sendo selecionadas de acordo com a morfologia em Bacilos, Cocos e Bastonetes positivos (Tabela 15).

Tabela 15 – Caracterização microbiana da amostra de água da fazenda de cultivo de camarão

Microrganismos	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Bacillus</i>	30	81,08
Cocos	2	5,41
Bastonetes positivos	5	13,51
Total de isolados selecionados	37	

Fonte - elaborado pelo autor.

As bactérias dos gêneros *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Bacillus spp.* destacam-se pelo seu potencial probiótico e são amplamente recomendadas para aplicação na aquicultura. Estudos realizados por Balcázar *et al.* (2006, 2008), Sequeiros *et al.* (2015) e Ringø *et al.* (2016) evidenciam que esses gêneros possuem propriedades benéficas que incluem a melhoria da digestibilidade dos alimentos, o fortalecimento da imunidade dos camarões e a modulação da microbiota intestinal. Esses atributos fazem dessas bactérias aliadas essenciais na busca por maior sustentabilidade e eficiência nos sistemas aquícolas.

O presente estudo corroborou essas evidências, reforçando que a seleção criteriosa de bactérias probióticas é indispensável para alcançar melhores resultados no cultivo. A integração de grupos bacterianos nitrificantes e probióticos adequados tem o potencial de não apenas melhorar a qualidade da água, mas também otimizar os índices produtivos na carcinicultura. Essa estratégia é sustentada por estudos anteriores, como os de Moriarty (1998), Gatesoupe (1999) e Verschuere *et al.* (2000), que demonstraram a eficácia do uso de cepas probióticas isoladas diretamente do ambiente de cultivo.

Partindo dessas premissas, as cepas bacterianas isoladas nesta pesquisa, excluindo as patogênicas, podem ser consideradas candidatas promissoras para uso no cultivo de camarões. Desde que sejam validadas por testes específicos para comprovar sua segurança e eficácia, essas cepas podem representar um avanço significativo no controle da carcinicultura, com maior probabilidade de sucesso nos ambientes de cultivo.

11.1.2. Critérios empregados para a seleção de cepas probióticas

11.1.2.1. Testes de estabilidade a estresse

A seleção de novas cepas probióticas para uso em aquicultura baseia-se em critérios que incluem segurança, funcionalidade, resistência e aspectos tecnológicos das culturas que serão incorporadas aos produtos (SAARELA *et al.*, 2000; PANCHENIAK, 2005). Esses critérios são

fundamentais para garantir que os probióticos possam atender às necessidades específicas do cultivo e oferecer benefícios consistentes ao ambiente e aos organismos cultivados.

Na aquicultura, é comum observar variações significativas nos parâmetros ambientais, como temperatura, pH e salinidade, que podem afetar diretamente a viabilidade e o desempenho dos microrganismos probióticos (SAMPAIO *et al.*, 2019). Para que os probióticos se desenvolvam e se multipliquem eficientemente no ambiente de cultivo, é essencial que sejam resistentes a essas condições flutuantes (MACEDO *et al.*, 2008; HUNGRIA; LONGO, 2009). Essa capacidade de resistência é determinante para garantir sua eficácia no controle da microbiota e na promoção da saúde dos organismos aquáticos.

Por isso, os testes de resistência desempenham um papel crucial na escolha de estirpes adequadas. Eles avaliam a capacidade de adaptação das cepas bacterianas às variáveis ambientais enfrentadas durante e entre os ciclos de cultivo. Segundo Mouriño *et al.* (2012), essa adaptação é um dos principais fatores que determinam a eficiência da colonização dos probióticos no ambiente de cultivo. O desempenho das diferentes cepas sob condições ambientais simuladas foi analisado e está detalhado na Tabela 16, que apresenta os resultados de crescimento das estirpes testadas em diferentes cenários ambientais.

Tabela 16 – Número de isolados tolerantes às diferentes condições de pH, temperatura e salinidade.

Condições ambientais avaliadas	Número de isolados sobreviventes	Taxa de sobrevivência (%)
pH 5	0	0
pH 9	37	100
4° C	0	0
40° C	37	100
0,5 ppt	37	100
30 ppt	31	83,8
80 ppt	14	37,8

Fonte - elaborado pelo autor.

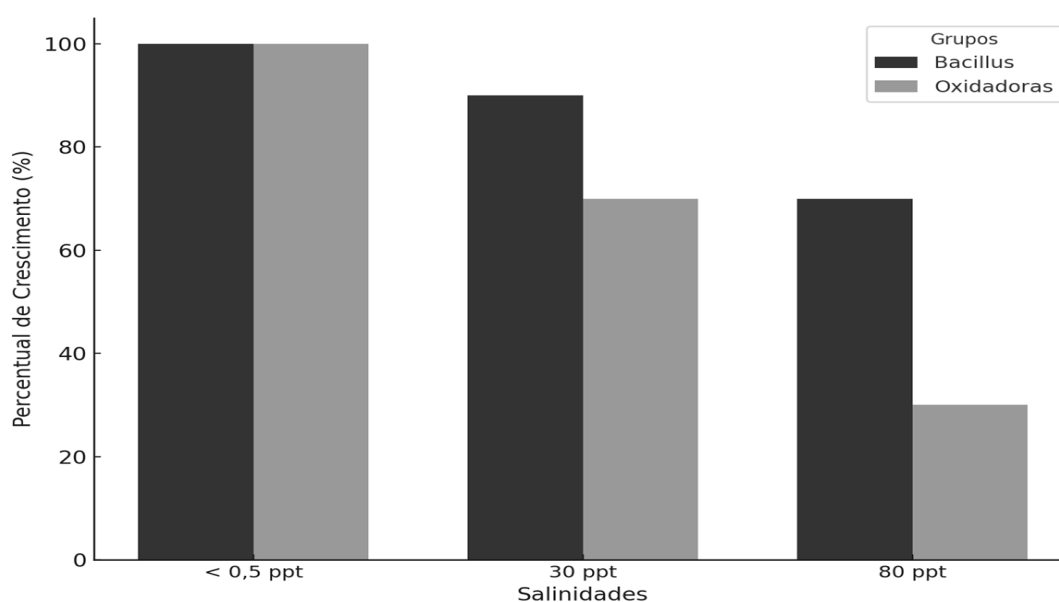
As cepas analisadas demonstraram baixa tolerância a diferentes condições de temperatura e pH, apresentando crescimento apenas a 40°C e pH 9. Essa limitação pode ser atribuída ao fato de que a maioria dessas cepas entra em estado vegetativo quando exposta a temperaturas mais baixas e valores de pH reduzidos. No entanto, esse comportamento destaca

a importância de bactérias esporogênicas, que possuem maior resistência a condições adversas. Estudos como o de Guo *et al.* (2013) confirmam a alta sobrevivência dos esporos de *Bacillus* sp., mesmo em ambientes com baixos valores de pH e temperaturas reduzidas, reforçando sua utilidade em condições variáveis.

Embora as cepas em questão não tenham apresentado crescimento em baixos valores de pH, esse fator não representa necessariamente um obstáculo para sua aplicação. Como essas bactérias serão destinadas ao uso em viveiros de cultivo, onde o pH da água geralmente varia entre 7 e 9, valores considerados ideais para o crescimento máximo dos camarões (BOYD; TUCKER, 1990), sua eficácia no ambiente real pode não ser comprometida. Assim, a seleção de cepas com desempenho em condições específicas de cultivo continua sendo uma estratégia promissora para a otimização da produção aquícola.

Já em relação ao teste de exposição a diferentes salinidades, a taxa de crescimento foi inversamente proporcional ao aumento da salinidade. Todas as concentrações de NaCl estudadas apresentaram crescimento. Para a concentração de 0,5 ppt, as 37 cepas isoladas apresentaram resultado positivo de crescimento. No entanto, quando expostas à salinidade de 35 ppt, cerca de 90% dos isolados demonstraram crescimento positivo. Já na salinidade de 80 ppt, a maioria das cepas não conseguiu se desenvolver, com uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 38% entre os 37 isolados, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Percentual de crescimento nas diferentes salinidades para os grupos *Bacillus* e oxidadoras.



Fonte - elaborado pelo autor.

A menor sobrevivência das bactérias em salinidades elevadas, como observado nos testes com 80 ppt, reflete os desafios fisiológicos enfrentados pelos microrganismos em ambientes de alta osmolaridade. A maioria das cepas bacterianas carece de mecanismos de adaptação suficientes para lidar com o estresse osmótico gerado por concentrações extremas de sal. Estudos, como o de Souza Júnior (2008), destacaram que a salinidade afeta diretamente o metabolismo bacteriano e a eficácia dos probióticos em sistemas de cultivo.

Conforme Zorriehzahra *et al.* (2016), a sobrevivência reduzida sob condições de alta salinidade pode comprometer a funcionalidade dos probióticos, limitando sua capacidade de colonizar o ambiente e competir com patógenos. Moriarty (1998; 1999) também ressaltou que a seleção de bactérias adaptadas às condições específicas do cultivo é essencial para maximizar sua eficácia, especialmente em ambientes com parâmetros estáveis. Esses achados reforçam a importância de considerar a salinidade como um critério determinante na seleção de cepas probióticas.

No presente estudo, foi possível observar desempenhos distintos entre diferentes grupos bacterianos em função da salinidade (Figura 10). As cepas do grupo *Bacillus* demonstraram maior viabilidade celular mesmo em altas concentrações de sal, atribuído à sua capacidade de formar esporos, que conferem resistência a condições adversas (GIL TURNES *et al.*, 1999). No entanto, é importante lembrar que na forma de esporos, essas bactérias não apresentam atividade biológica e, portanto, não exercem efeito probiótico.

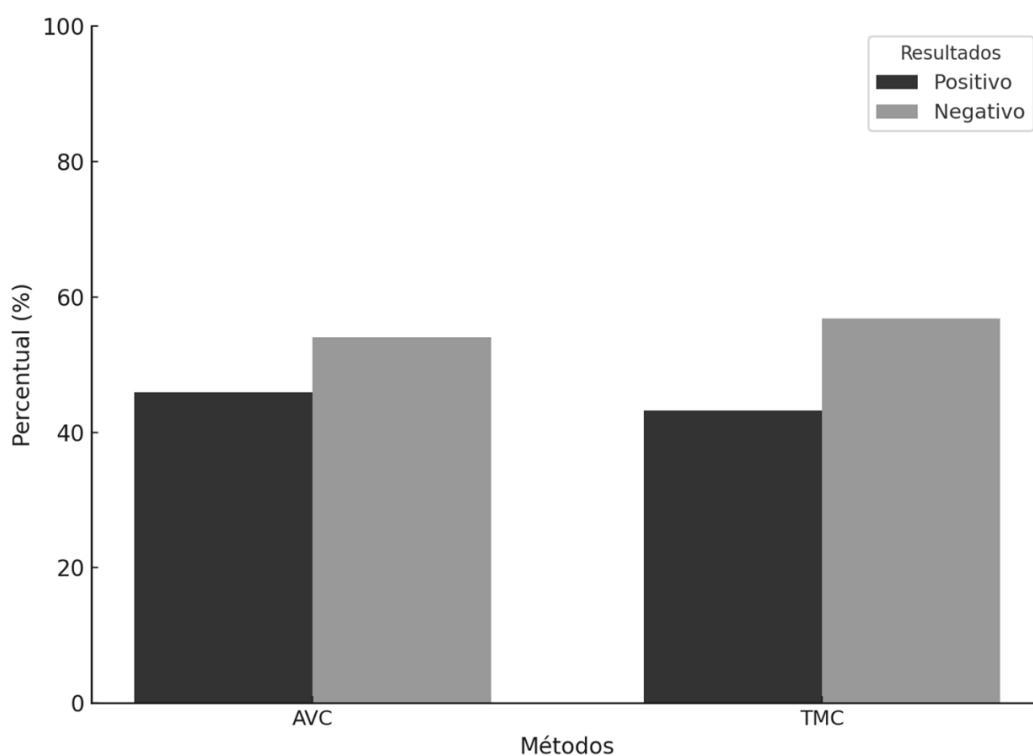
Por outro lado, o grupo das bactérias oxidadoras mostrou baixa tolerância a variações extremas de salinidade, apresentando redução progressiva da viabilidade com o aumento da concentração de sal. Resultados semelhantes foram reportados por Nóbrega *et al.* (2004), que analisaram 12 estirpes de bactérias deste grupo em diferentes regiões e observaram que apenas algumas eram capazes de crescer em concentrações superiores a 50 ppt. A maioria mostrou tolerância limitada a níveis entre 2 e 30 ppt.

Esses resultados reforçam a importância de considerar a salinidade como um critério determinante na seleção de probióticos. Cepas bacterianas que tolerem concentrações elevadas de sal podem oferecer maior eficiência no controle de patógenos e no suporte à saúde dos organismos cultivados, contribuindo para a estabilidade e produtividade dos sistemas aquícolas.

11.1.2.2. Caracterização fenotípica

Na Figura 11 encontra-se a caracterização fenotípica das bactérias através do teste de aderência a microplaca e produção de exopolissacarídeos em placas contendo o ágar vermelho congo.

Figura 11 – Percentual de amostras classificadas de acordo com caracterização fenotípica em produtoras (positivo) e não produtoras de biofilme (negativo).



Fonte - elaborado pelo autor.

Legenda - AVC - produção de exopolissacarídeos nas placas de ágar vermelho congo, TMC - Teste de aderência na microplaca.

No teste de formação de exopolissacarídeos (EPS), 17 dos 37 isolados analisados (45,95%) apresentaram resultados positivos, evidenciando a capacidade dessas bactérias em produzir EPS. Entre os isolados do gênero *Bacillus sp.*, a positividade foi ainda maior, atingindo 55,66%, enquanto no grupo das bactérias oxidadoras, 36,84% dos representantes foram positivos no teste do AVC. Por outro lado, os demais isolados avaliados em meio AVC com adição de sacarose mostraram crescimento bacteriano, mas sem a presença de coloração escura, indicando a ausência de formação de EPS.

Os exopolissacarídeos desempenham funções cruciais, como proteger as células

bacterianas contra ataques externos e situações de estresse, além de favorecer a aderência em superfícies e a formação de biofilmes (DOGAN *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). Essas propriedades podem aumentar a sobrevivência das bactérias em condições adversas, como variações de salinidade e temperatura, e facilitar sua aderência e colonização de nichos, características desejáveis para bactérias probióticas empregadas no cultivo de *Penaeus vannamei*.

A análise da produção de biofilmes pelo teste de aderência em microplacas (TMC) revelou resultados positivos em 16 das 37 cepas analisadas (43,24%). Dentre os isolados que se mostraram aderentes às microplacas de poliestireno, 7 pertenciam ao gênero *Bacillus*, enquanto 9 eram bactérias oxidadoras. A capacidade de formar biofilmes sugere que esses microrganismos podem sobreviver em diferentes tipos de ambientes, além de possuir potencial para colonizar o trato intestinal de camarões e atuar como probióticos.

Segundo Fuller (1989), a adesão celular é uma característica essencial para que microrganismos probióticos exerçam efeito antagônico. Essa habilidade permite que bactérias probióticas se mantenham em contato mais prolongado com o hospedeiro, reduzindo a necessidade de reaplicações frequentes (TORO, 2005). Assim, os resultados obtidos neste estudo corroboram a literatura existente e destacam o gênero *Bacillus* como um potencial candidato para aplicação em estratégias probióticas, dado seu desempenho superior na produção de EPS e formação de biofilmes, características que aumentam sua eficácia e persistência em sistemas de cultivo de camarões.

11.1.2.3. Detecção da atividade enzimática

Os critérios de segurança para a seleção de probióticos são fundamentais e incluem propriedades como a ausência de patogenicidade e de fatores de virulência (MUNOZ-ATIENZA *et al.*, 2013; RUBIO *et al.*, 2014). Os fatores de virulência são mecanismos que permitem que um patógeno infecte e cause danos ao hospedeiro, sendo, portanto, essenciais para avaliação durante o desenvolvimento de probióticos (SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

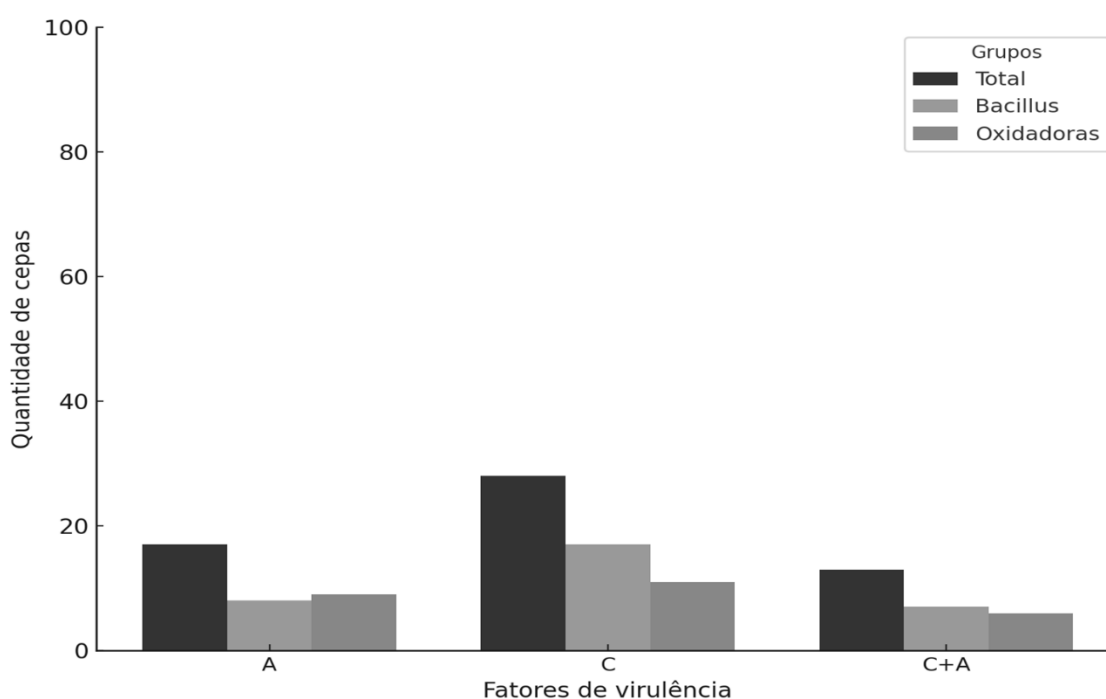
A produção de enzimas extracelulares por bactérias é considerada um dos principais fatores de virulência. Para garantir a segurança de uma estirpe probiótica, é imprescindível confirmar a ausência ou níveis seguros dessas enzimas, assegurando que a bactéria não exerça efeitos patogênicos, mesmo sob condições de estresse do hospedeiro (BATHAEI; ZAHRAI, 2022).

Uma preocupação adicional está relacionada à produção de múltiplas enzimas por uma

mesma bactéria, pois essa característica pode intensificar seu potencial patogênico. A interação sinérgica entre diferentes enzimas pode amplificar os danos ao hospedeiro, agravando quadros clínicos em sistemas de cultivo aquático (SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Estudos como os de Soto-Rodriguez *et al.* (2012) e Bathaei e Zahrai (2022), apontam que bactérias com múltiplos fenótipos de virulência apresentam maior risco para a saúde do hospedeiro e devem ser evitadas na formulação de probióticos.

A figura 12 apresenta a disposição das cepas analisadas com base nos fenótipos de virulência expressos.

Figura 12 – Distribuição das cepas de acordo com os fenótipos de virulência expressos para os diferentes grupos.



Legenda - A – amilase, C – Caseinase, C+A – Caseinase e Amilase.

Fonte - elaborado pelo autor.

As análises realizadas evidenciaram que nenhuma das cepas testadas apresentaram a produção de mais de duas exoenzimas, o que sugere uma limitação na expressão de fatores de virulência potencialmente patogênicos. A relação dos fatores de virulência reforça a necessidade de uma triagem criteriosa para a seleção de cepas probióticas seguras.

Entre as exoenzimas avaliadas, a caseinase foi a mais frequentemente detectada, com positividade em 75,67% (28) dos isolados. Dentro deste grupo, 45,94% (17) eram bactérias do gênero *Bacillus*, enquanto 29,73% (11) correspondiam a bactérias oxidadoras.

Além disso, foi observado que 35,13% dos isolados expressaram simultaneamente duas enzimas, indicando uma interação entre as exoenzimas em parte dos microrganismos analisados. Por outro lado, nenhuma das cepas apresentou atividade das enzimas hemólise, gelatinase ou celulase, o que reforça a segurança do uso destas cepas no contexto de probióticos para aquicultura.

Esses resultados são consistentes com estudos prévios que apontam para a importância de monitorar a produção de exoenzimas em bactérias utilizadas como probióticos. A ausência de enzimas como a hemólise e a gelatinase é considerada uma característica desejável para minimizar riscos ao hospedeiro e aumentar a segurança dos produtos probióticos (MUNOZ-ATIENZA *et al.*, 2013; SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

11.1.2.4. Antibiograma

O aumento da resistência antimicrobiana em bactérias provenientes de sistemas de produção animal tem despertado preocupações crescentes devido às possíveis implicações para a saúde humana e ambiental. Essa questão tem levado a uma fiscalização rigorosa sobre o uso de antibióticos, principalmente em setores como a aquicultura, onde a utilização indiscriminada dessas substâncias é comum no tratamento e profilaxia de doenças bacterianas (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2012). O ambiente aquícola, por sua natureza, torna-se um local propício para a seleção de espécies bacterianas resistentes, o que pode levar à propagação de genes de resistência entre os organismos presentes (SCHMIDT, MORTEN, DALSGAARD, 2000).

O uso prolongado e repetido de determinados antimicrobianos no cultivo de organismos aquáticos contribui para a seleção de cepas bacterianas resistentes. Esse fenômeno, amplamente relatado em estudos como o de Tendência e Peña (2002), demonstra como a pressão seletiva causada pelo uso frequente de medicamentos antimicrobianos reflete diretamente no padrão de resistência observado no ambiente de cultivo.

No presente estudo, foram isoladas 37 cepas bacterianas do sistema de cultivo e testadas frente a quatro antimicrobianos. Todas as cepas apresentaram sensibilidade à Oxitetraciclina e ao Florfenicol, substâncias amplamente utilizadas na aquicultura. Entretanto, 24,32% das estirpes isoladas mostraram resistência ao ácido nalidíxico, enquanto 16,22% foram resistentes ao Cloranfenicol, conforme observado na Tabela 17.

Tabela 17 – Padrão de comportamento frente a antimicrobianos nas bactérias isoladas em amostra de água de um sistema fechado de cultivo de camarão marinho.

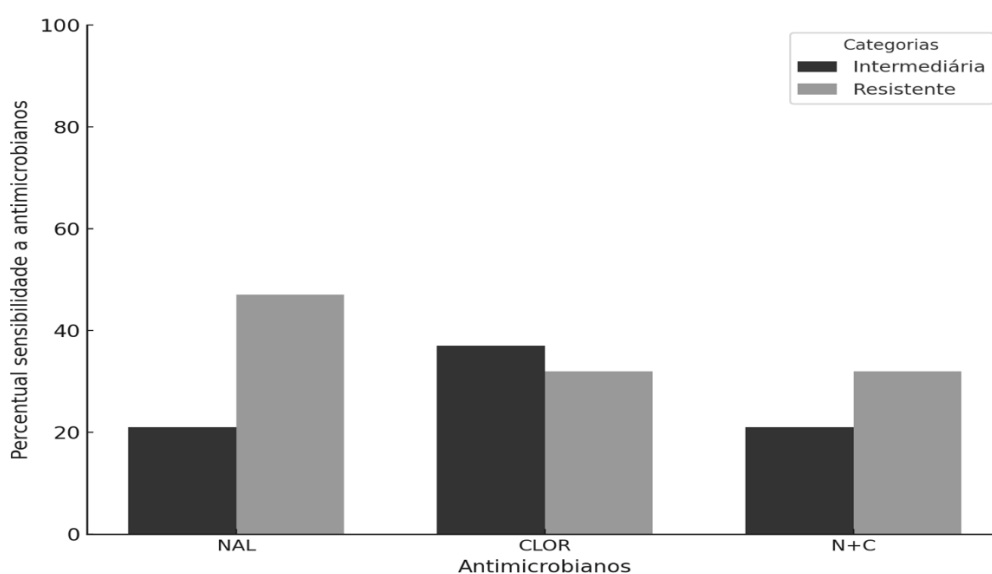
Sensibilidade a antibióticos (%)				
	Oxi	Flor	Nal	Clor
Sensível	100	100	64,87	64,87
Intermediária	0	0	10,81	18,92
Resistente	0	0	24,32	16,22

Legenda - Oxi – Oxitetraciclina, Flor – Florfenicol, Nal – Ácido Nalidíxico, Clor – Cloranfenicol

Esses achados são consistentes com relatórios anteriores, como os de Schmidt, Morten e Dalsgaard (2000), que destacaram a prevalência de resistência ao Cloranfenicol em ambientes aquícolas. Da mesma forma, Tendência e Peña (2002) observaram que a resistência ao ácido nalidíxico pode ser particularmente problemática em sistemas de cultivo com manejo inadequado.

No grupo das bactérias oxidadoras o perfil mais frequente de resistência foi ao Ácido Nalidíxico (47,4%). Do total de estirpes isoladas das bactérias oxidadoras 31,6% (6/19) se mostrou com um perfil de resistência múltipla aos 2 antimicrobianos (Ácido Nalidíxico e Cloranfenicol) (Figura 13).

Figura 13 – Percentual de resistência das estirpes bacterianas pertencentes ao grupo das bactérias oxidadoras testadas frente aos antimicrobianos (Ácido Nalidíxico e Cloranfenicol)



Fonte - elaborado pelo autor.

As bactérias presentes no ambiente de criação de camarões frequentemente exibem características de resistência a múltiplos antibióticos, conforme observado em diversos estudos (TENDENCIA; PEÑA, 2001; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016). Essa capacidade de multirresistência representa um risco significativo tanto para a saúde pública quanto para os sistemas de cultivo, uma vez que os genes de resistência podem ser transferidos entre microrganismos por meio de mecanismos de transferência vertical ou horizontal (UDDIN *et al.*, 2015; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016; BANERJEE; RAY, 2017).

11.1.2.5. Testes de atividade antagonista

O teste de antagonismo foi empregado como um critério essencial na montagem dos consórcios bacterianos e na seleção de candidatas probióticas com características desejáveis, garantindo que as cepas escolhidas não competissem entre si. A relação antagonista entre os microrganismos pode inibir a atividade biológica de outros componentes da comunidade, impactando diretamente o equilíbrio da microbiota bacteriana. Esse equilíbrio não depende apenas das interações com o hospedeiro, mas também das relações ecológicas entre os microrganismos que coabitam o mesmo ambiente, permitindo sua coexistência, antagonismo ou competição (DENKOVA *et al.*, 2013).

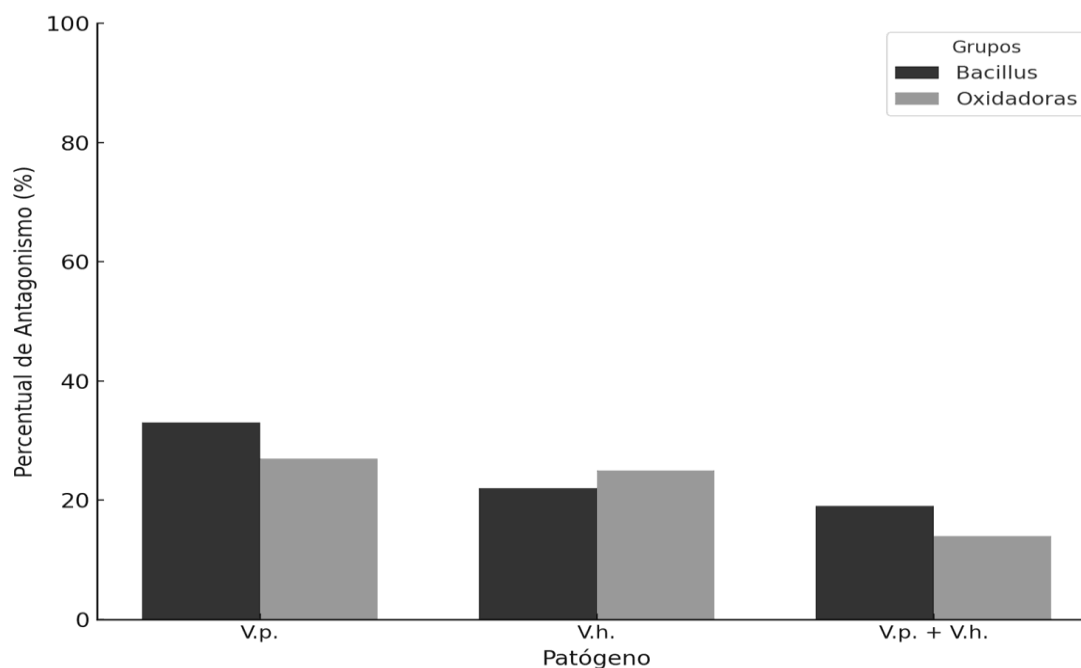
No teste de antagonismo *in vitro*, das 37 estirpes selecionadas, todas apresentaram atividade antagônica positiva contra pelo menos uma outra cepa do grupo avaliado. Isso permitiu diversas combinações potenciais entre as cepas testadas. Entretanto, apenas os microrganismos que demonstraram os melhores resultados em todos os testes foram selecionados para formar dois consórcios.

Estudos anteriores, como os de Verschuere *et al.* (2000), Zokaeifar *et al.* (2012) e Banerjee e Ray (2017), destacaram a importância de realizar testes de antagonismo especificamente entre as estirpes e patógenos. Esses trabalhos visaram identificar agentes microbianos com potencial para controle biológico eficiente. Nessas pesquisas, um grande número de cepas antagonistas foi pré-selecionado em testes de antagonismo *in vitro* e utilizado para combater diversas enfermidades, justificando o interesse econômico e sanitário nesses organismos.

O perfil mais prevalente de antagonismo foi observado em relação ao *V. parahaemolyticus*, enquanto a capacidade de ação antagônica simultânea contra ambos os patógenos, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, foi registrada em 32,41% dos isolados (Figura 14). Esses resultados contrastam com os achados de Zokaeifar *et al.* (2012), que observaram maior

antagonismo contra *V. harveyi* em consórcios bacterianos avaliados.

Figura 14 – Perfil de atividade antagonismo contra os patógenos testados para os diferentes grupos



Legenda - V.p: *V. Parahaemolyticus*; V.h: *V. harveyi*

Fonte - elaborado pelo autor.

Entre os grupos bacterianos avaliados, o grupo de bactérias do gênero *Bacillus* apresentou os melhores resultados, com taxas de antagonismo de 21,63% contra *V. harveyi* e 32,43% contra *V. parahaemolyticus*. Em comparação, o grupo das bactérias oxidadoras demonstrou antagonismo de 24,33% e 27% frente a *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, respectivamente. Estudos como os de Liu *et al.* (2015) confirmam a capacidade antagonista de bactérias do gênero *Bacillus* contra a espécie *V. parahaemolyticus*, destacando o potencial do gênero como probiótico eficaz.

A capacidade inibitória das bactérias *Bacillus* está associada à sua habilidade de produzir e liberar uma ampla gama de substâncias antimicrobianas. Essas incluem toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de vias metabólicas primárias, substâncias antibióticas e bacteriocinas, que possuem atividade bactericida ou bacteriostática. Essas substâncias são eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo patógenos de relevância sanitária, como *Vibrio harveyi* (UDDIN *et al.*, 2015; BANERJEE; RAY, 2017).

Esses resultados reforçam o potencial do uso de consórcios bacterianos baseados em

Bacillus na carcinicultura, não apenas como ferramenta de controle biológico, mas também como alternativa sustentável ao uso de antimicrobianos tradicionais.

11.1.3. Formação dos consórcios bacterianos probióticos

Os resultados dos testes citados anteriormente foram usados como parâmetros para selecionar as cepas para o desenvolvimento de dois consórcios bacterianos para aplicação como probiótico em testes *in vivo*. A escolha das cepas para cada consórcio foi fundamentada nos potenciais benefícios proporcionados aos organismos cultivados, considerando tanto o controle de patógenos quanto a melhoria da qualidade ambiental.

O primeiro consórcio foi composto exclusivamente por estirpes do gênero *Bacillus*, com foco na prevenção e controle de doenças. A escolha desse grupo deve-se à sua versatilidade e capacidade de formar esporos, o que confere maior resistência a condições ambientais adversas e viabiliza seu uso em locais de grande instabilidade ambiental. Essa característica também favorece a sobrevivência das bactérias durante os processos de elaboração, transporte e armazenamento dos produtos (GIL TURNES *et al.*, 1999). Estudos como o de Zorriehzahra *et al.* (2016) reforçam a eficácia do uso de *Bacillus* na aquicultura, destacando seu papel no fortalecimento imunológico dos organismos cultivados.

O segundo consórcio foi destinado ao controle da qualidade da água, composto por bactérias participantes do ciclo do nitrogênio. Este grupo inclui bactérias nitrificantes responsáveis pela conversão da amônia em nitrito e, posteriormente, em nitrato (PEREIRA; MERCANTE, 2005). O uso de probióticos com essas propriedades promove a redução das trocas de água nos sistemas de cultivo, permitindo maior reutilização e minimizando o desperdício de recursos hídricos. Essa abordagem é corroborada por Kumar *et al.* (2016), que destacam a maior eficiência desses consórcios bacterianos, além de sua capacidade de formar biofilmes mais estáveis, o que contribui para a manutenção da qualidade da água.

Para a formação dos consórcios, foram priorizadas cepas com maior tolerância a diferentes condições ambientais e antagonismo comprovado contra pelo menos um dos patógenos testados. Esse critério é consistente com práticas relatadas por Mouriño *et al.* (2012), que enfatizam a importância de selecionar bactérias com propriedades específicas para melhorar a eficiência dos consórcios probióticos. A Tabela 18 apresenta a caracterização detalhada das bactérias selecionadas para a formação dos consórcios.

Tabela 18 – Caracterização das bactérias selecionadas para a formação dos consórcios.

Consórcio	Grupo funcional	Atividade enzimática	EPS	Agregação	pH 9.0	Temp. (40° C)	Salinidade			Antagonista contra patógenos		Sensibilidade a antibióticos			
							<0,5	35	80	V. p.	V. h.	Flor	Oxi	Nal	Clor
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp	C	-	++	+	+	+	+	-	-	+	S	S	S	S
	<i>Bacillus</i> sp	C	+	++	+	+	+	+	+	+	+	S	S	S	S
	<i>Bacillus</i> sp	C	-	-	+	+	+	+	+	-	+	S	S	S	S
	<i>Bacillus</i> sp	C	-	+	+	+	+	+	+	-	+	S	S	S	S
	<i>Bacillus</i> sp	C	+	-	+	+	+	+	-	+	+	S	S	S	S
Oxidadoras	<i>Bacillus</i> sp	C	-	+++	+	+	+	+	-	+	-	S	S	S	S
	Cocos	A	++	+	+	+	+	+	+	-	+	S	S	I	I
	Cocos	C	-	-	+	+	+	+	+	-	-	S	S	I	I
	<i>Bacillus</i> sp	C-A	-	+	+	+	+	+	-	+	+	S	S	S	S
	<i>Bacillus</i> sp	C-A	-	+	+	+	+	+	-	-	+	S	S	S	S

Legenda - C - Caseinase, A - Amilase, EPS - Produção de exopolissacarídeos, FLOR - Florfenicol, OXI - Oxitetraciclina, NAL - Ácido Nalidíxico, CLOR - Cloranfenicol, S - Sensível, I - Sensibilidade intermediária, V.p - *V. parahaemolyticus*, V.h - *V. harveyi*

11.1.4. Viabilidade e rendimento dos consórcios formados

Os resultados apresentados na Tabela 19 mostram a contagem de células viáveis (UFC/ml) para os dois consórcios probióticos elaborados, abrangendo a quantificação inicial da suspensão bacteriana, a concentração após o processo de liofilização e, por fim, a incorporação do material liofilizado a um substrato.

Tabela 19 – Comparação dos resultados das contagens bacterianas viáveis (UFC/ml) para cada fase do desenvolvimento do probiótico

Consórcio	Concentração bacteriana inicial (UFC/ml)	Concentração bacteriana após liofilização (UFC/ml)	Concentração bacteriana final (UFC/ml)	Rendimento após a liofilização (%)
<i>Bacillus</i>	$1,05 \times 10^{12}$	$5,0 \times 10^9$	$4,5 \times 10^7$	0,48
Oxidadoras	$5,2 \times 10^{11}$	$7,8 \times 10^{10}$	$1,03 \times 10^9$	15

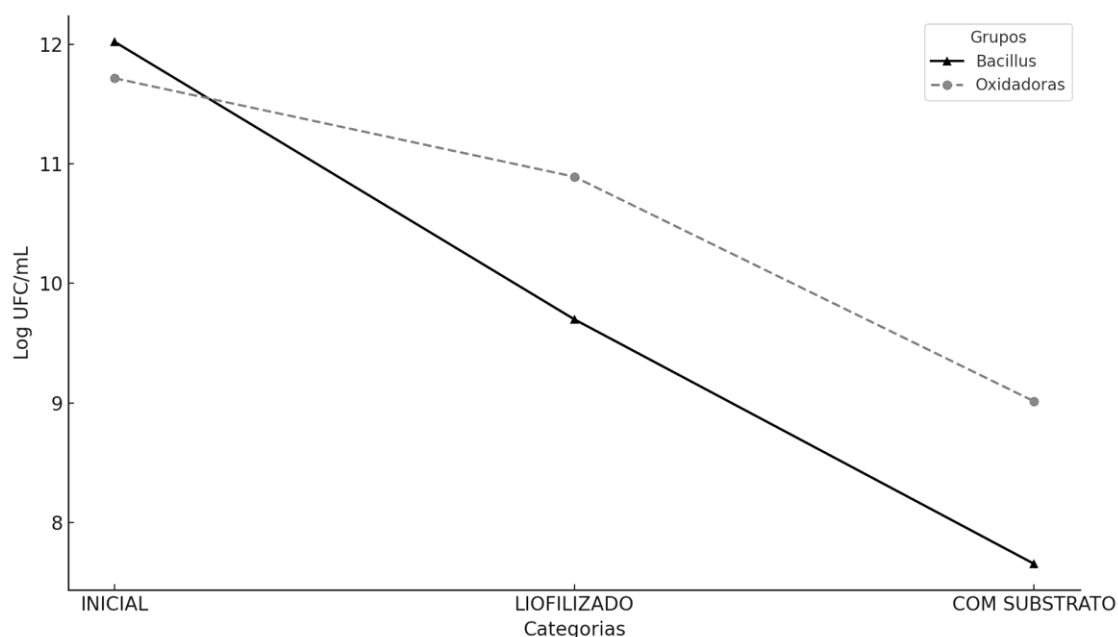
Fonte - elaborado pelo autor.

Mesmo apresentando baixo rendimento de células viáveis após a liofilização, especialmente no consórcio *Bacillus*, as concentrações bacterianas permaneceram acima da quantidade mínima necessária para que os microrganismos probióticos exerçam efeitos benéficos, estimada em 10^6 UFC/ml. Este dado reforça a importância de iniciar o processo com concentrações elevadas de células bacterianas, uma vez que parte significativa da população microbiana perde viabilidade durante a liofilização. Segundo Bozoglu *et al.* (1987), uma sobrevivência de apenas 0,1% da população original já é suficiente para permitir a propagação de uma cultura bacteriana viável.

Além disso, os resultados corroboram observações anteriores de Saarela *et al.* (2000) e Zorriehzakra *et al.* (2016), que destacam que o sucesso de produtos probióticos depende de tecnologias que garantam a manutenção da viabilidade das células bacterianas ao longo das etapas de processamento e armazenamento. Nesse contexto, o rendimento superior observado no consórcio Oxidadoras (15%) pode ser atribuído a características intrínsecas de maior resistência das cepas à liofilização.

A Figura 15 ilustra como a utilização de altas concentrações iniciais é essencial para mitigar as perdas inevitáveis durante o processo de liofilização e assegurar a eficácia final do produto probiótico.

Figura 15 - Acompanhamento da viabilidade em Log UFC/mL dos dois probióticos autoctones elaborados em cada fase do desenvolvimento dos produtos.



Fonte - elaborado pelo autor.

De modo geral, o grupo dos *Bacillus* mostraram ser mais sensíveis à liofilização em comparação quando comparado ao grupo das bactérias oxidadoras. Mesmo com a utilização do agente crioprotetector, notou-se uma redução mais significativa na viabilidade das cepas do consórcio *Bacillus*. Este grupo apresentou uma diminuição de três ciclos log na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml), passando de $1,05 \times 10^{12}$ UFC/ml antes da liofilização para $4,5 \times 10^9$ UFC/ml após o procedimento. Em contraste, o grupo das bactérias oxidadoras teve uma diminuição mais sutil, de apenas um ciclo log, passando de $5,2 \times 10^{11}$ UFC/ml para $7,8 \times 10^{10}$ UFC/ml (Tabela 19 e Figura 15).

Esses resultados são semelhantes aos achados de Berner e Viernstein (2006), que avaliaram o efeito de diferentes crioprotetores na viabilidade de *Lactococcus lactis* durante a liofilização. No estudo, os microrganismos apresentaram uma redução de viabilidade máxima de um ciclo log, independentemente da presença de crioprotetores. Essa resistência pode ser atribuída às características intrínsecas das células.

As diferenças no comportamento observado entre os dois consórcios podem ser explicadas pelas características estruturais distintas de suas células. Conforme discutido por Coulibaly *et al.* (2009), características celulares específicas influenciam diretamente a sobrevivência de microrganismos durante processos como a liofilização. Em um estudo com

Lactobacillus plantarum e *Leuconostoc mesenteroides*, o *L. plantarum* demonstrou maior sobrevivência, atribuída às suas propriedades celulares únicas.

A sobrevivência durante a liofilização depende de múltiplos fatores, incluindo as características dos microrganismos, a concentração inicial da cultura, os meios de multiplicação celular e os métodos de reidratação utilizados (BAIOCCO, 1997). Esses aspectos devem ser considerados no desenvolvimento de produtos probióticos, especialmente para aplicações em aquicultura, onde a manutenção da viabilidade bacteriana é crucial para garantir a eficácia dos produtos no campo.

11.2. Experimento *In vivo*

11.2.1. Qualidade de água

Os resultados demonstraram que os valores médios de salinidade variaram entre 25 e 35 ppt, enquanto o pH apresentou variação de 8,8 a 9,0. Em relação à concentração de oxigênio dissolvido (OD), os valores oscilaram entre 4,70 e 9,60 ml/L, e a temperatura de 28,0°C a 32,1°C. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos quanto aos valores de temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido foram similares, indicando estabilidade desses parâmetros ao longo dos experimentos.

O oxigênio dissolvido, considerado um dos principais parâmetros com relação a qualidade da água em cultivos aquáticos, manteve-se em níveis superiores a 3,0 ml/L em todos os tratamentos, estando dentro da faixa considerada ótima para o desenvolvimento do *Penaeus vannamei* (PEREIRA *et al.*, 2005; SOARES; HENRY-SILVA, 2019). Essa concentração elevada de oxigênio na água é devido à presença do fitoplâncton tanto na coluna de água como no substrato, auxiliando na incorporação desse gás na água durante o dia (SOARES; HENRY-SILVA, 2019).

A estabilidade dos parâmetros físico-químicos, foi consistente em todos os tratamentos empregados, independente do período observado (8 e 16 h). Esses valores estão em conformidade com a faixa ideal para o crescimento do camarão *P. vannamei*, conforme observado em estudos de Krummenauer *et al.* (2011) e Jatobá *et al.* (2008).

Tabela 20 apresenta as médias e desvios padrão das variáveis físico-químicas da qualidade da água, reforçando a compatibilidade dos parâmetros observados com os requisitos do cultivo de *P. vannamei*.

Tabela 20 - Descrição das variáveis físico-químicas (média±DP) para os parâmetros de temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido.

Tratamentos	Variáveis	Período	
		8 - 00h	16 - 00h
P1	pH	9,17 ± 0,35 a	9,13 ± 0,37 a
	OD	6,64 ± 0,54 a	6,21 ± 0,67 a
	Temp	29,02 ± 0,95 a	31,68 ± 1,42 a
P2	pH	9,19 ± 0,29 a	9,14 ± 0,31 a
	OD	6,67 ± 0,57 a	6,19 ± 0,63 a
	Temp	28,75 ± 0,73 a	31,63 ± 0,97 a
P3	pH	9,23 ± 0,25 a	9,19 ± 0,29 a
	OD	6,75 ± 0,71 a	6,21 ± 0,82 a
	Temp	28,78 ± 0,66 a	31,65 ± 0,95 a
P4	pH	9,19 ± 0,22 a	9,14 ± 0,24 a
	OD	6,69 ± 0,22 a	6,24 ± 0,84 a
	Temp	28,79 ± 0,68 a	31,59 ± 0,92 a
P5	pH	9,29 ± 0,22 a	9,22 ± 0,26 a
	OD	6,82 ± 0,62 a	6,32 ± 0,73 a
	Temp	28,69 ± 0,69 a	31,61 ± 0,95 a
P6	pH	9,20 ± 0,23 a	9,15 ± 0,27 a
	OD	6,87 ± 0,73 a	6,38 ± 0,96 a
	Temp	28,48 ± 0,68 a	31,35 ± 0,95 a
Controle	pH	9,20 ± 0,28 a	9,15 ± 0,31 a
	OD	6,68 ± 0,59 a	6,12 ± 0,66 a
	Temp	28,76 ± 0,70 a	31,47 ± 1,18 a

Fonte - elaborado pelo autor.

Médias seguidas de letras diferentes entre as colunas que diferem significativamente (*Tukey*-Teste $p < 0,05$).

A alcalinidade total não apresentou variações entre os tratamentos empregados, com valores registrados entre 240 e 370 ml/L eq. CaCO₃. Esses valores são superiores a faixa mínima recomendada para o cultivo do *P. vannamei* que é 120 ml/L eq. CaCO₃, conforme indicado por Boyd (2003). Uma alcalinidade elevada nos viveiros de camarão contribui para a estabilidade do pH ao longo do dia, avisando oscilações que poderiam causar estresse aos organismos

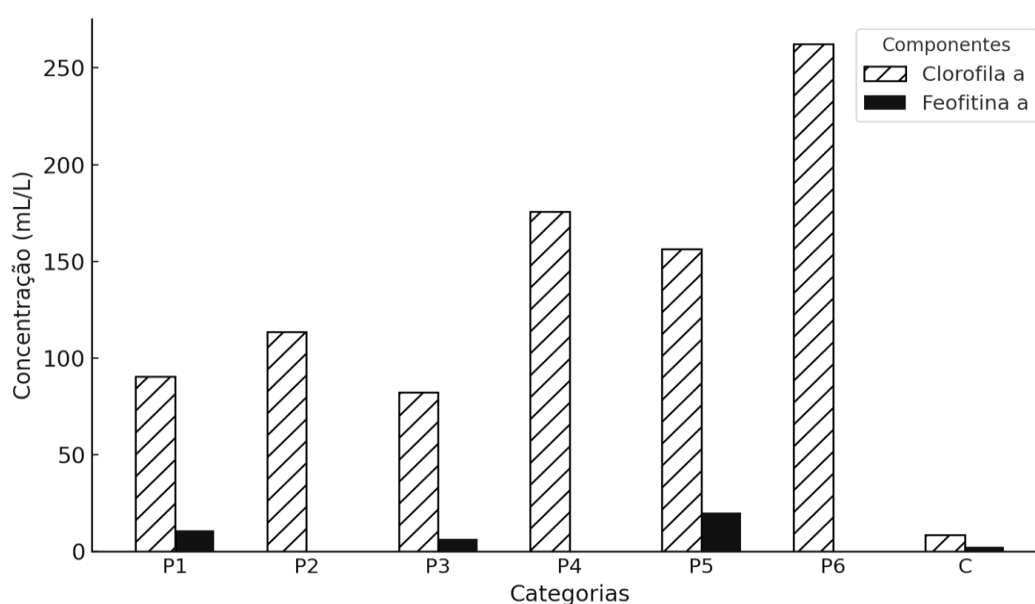
cultivados (MERCANTE *et al.*, 2011). Essa estabilidade é fundamental para manter as condições ideais de cultivo e minimizar os impactos negativos sobre o crescimento e saúde dos camarões cultivados.

A clorofila *a* e a feofitina *a* são reconhecidas como importantes marcadores para monitorar os processos de eutrofização. De acordo com Håkanson, Bryhn e Blenckner (2007), a clorofila *a* é utilizada para estimar a biomassa fitoplanctônica em sistemas aquáticos eutrofizados, enquanto a feofitina *a* resultante da degradação da clorofila, como um indicador da decomposição dessa biomassa. Segundo Wetzel (2001) conclui que a análise da feofitina *a* oferece uma perspectiva valiosa sobre a dinâmica de decomposição orgânica em ecossistemas aquáticos.

Nos viveiros de camarão, esses indicadores se tornam ferramentas importantes para os produtores. Altos níveis de feofitina *a*, por exemplo, podem indicar a necessidade de ajustes nas práticas de manejo, como a redução da quantidade de ração ou a realização de trocas de água. Tais intervenções são cruciais para manter o equilíbrio do ambiente e minimizar os impactos negativos na saúde e no crescimento dos camarões (WETZEL, 2001; BOYD, 2003).

A figura 16 apresenta os resultados da análise química da água para determinação de Clorofila *a* e da Feofitina *a*.

Figura 16 - Concentração de Clorofila *a* e Feofitina *a* no cultivo do camarão *P. vannamei* com adição de probióticos



Fonte - elaborado pelo autor.

A análise química da água (Figura 16) mostrou que a Clorofila a, apresentou concentrações elevadas em todos os tratamentos com probióticos (P1 a P6) quando comparados ao Controle (C). Entre os grupos testados, o tratamento P6 se destacou com a maior concentração de Clorofila a, ultrapassando 250 mL/L, indicando que as condições nesse tratamento foram favoráveis ao crescimento de fitoplâncton. No entanto, o grupo controle registrou valores mínimos, sugerindo uma menor produção primária em ambientes sem adição de probióticos. Esses resultados corroboram os dados de Boyd e Tucker (1998), que destacaram a clorofila a como um indicador direto da produtividade primária nos viveiros. Essa alta concentração está associada ao aumento da densidade fitoplanctônica, fundamental para a cadeia alimentar e o balanço energético dos sistemas aquáticos.

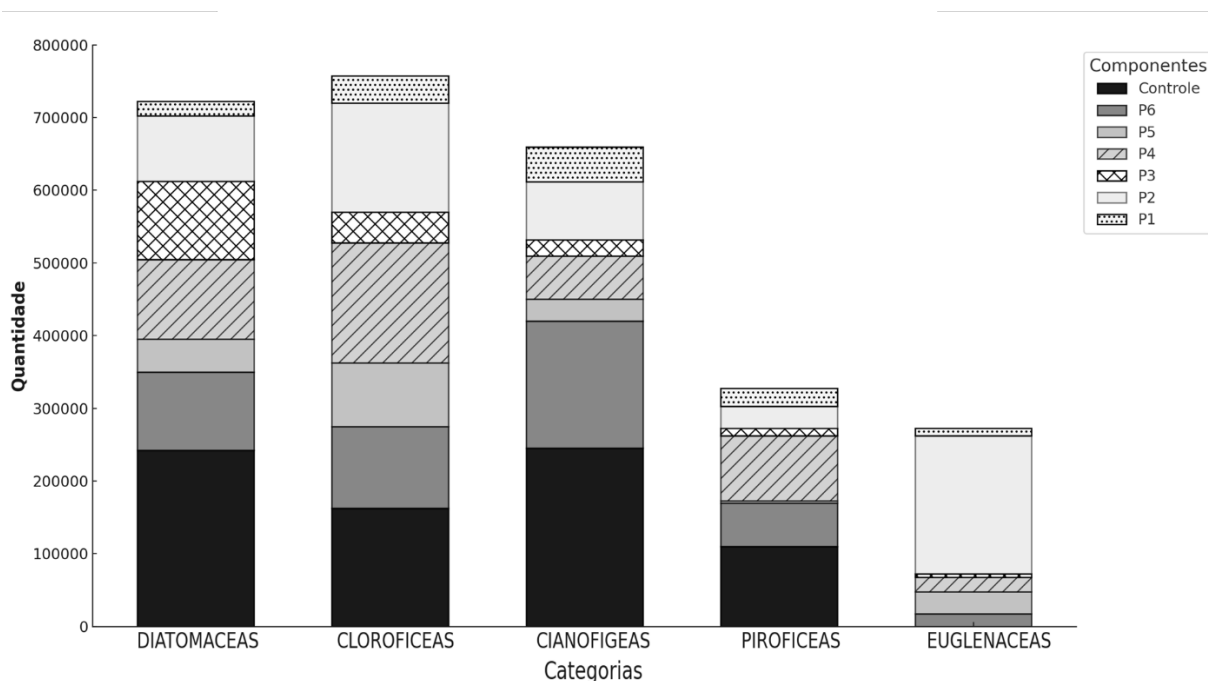
Por outro lado, a Feofitina a, apresentou concentrações significativamente menores em todos os tratamentos com relação à Clorofila a, variando entre 0 e 20,51 mL/L. O tratamento P5 foi o que registrou a maior concentração, enquanto o grupo controle apresentou os menores valores. Essa diferença pode indicar uma menor degradação da Clorofila a ou uma menor atividade de decomposição de biomassa fitoplanctônica nos grupos tratados com probióticos. Estudos como os de Mercante *et al.* (2011) e Boyd (2003) apontaram que valores elevados de feofitina a estão frequentemente associados ao acúmulo de matéria orgânica em decomposição e à degradação do fitoplâncton, impactando diretamente a dinâmica de nutrientes nos viveiros.

Deste modo, os resultados dessa pesquisa mostram que os tratamentos com probióticos promoveram um impacto positivo na produção de Clorofila a, sendo o P6 o mais eficiente entre eles. A baixa concentração de Feofitina a, mesmo nos grupos com alta produção de Clorofila a, sugere que os probióticos podem contribuir para a estabilidade do ambiente aquático, reduzindo a degradação da biomassa fitoplanctônica.

A análise da densidade relativa registrada para os organismos das classes fitoplanctônicas variou entre os tratamentos avaliados. Apesar de padrões semelhantes na maioria dos tratamentos, exceções foram observadas. No tratamento P2, as classes Euglenaceae e Chlorophyceae apresentaram maior percentual de densidade relativa, enquanto o tratamento controle destacou-se pelo predomínio de Cyanobacteria (cianofíceas).

No entanto, o percentual de densidade relativa por classe, predominantemente seguiu um padrão semelhante entre os tratamentos, com exceção do Tratamento P2, no qual houve um maior percentual de densidade relativa das Classes Euglenaceae e Chlorofíceae e do tratamento Controle que apresentou um maior percentual de densidade relativa relacionado à Classe Cyanobacteria (cianofíceas) (Figura 17).

Figura 17 - Densidade dos organismos fitoplanctônicos (%) entre os diferentes tipos de probióticos utilizados no estudo.



Fonte - elaborado pelo autor.

A aplicação dos probióticos apresentou influência sobre a composição da comunidade fitoplanctônica e os parâmetros de qualidade da água, destacando desafios e oportunidades para otimização do manejo. Entre se tratando da aplicação de probióticos no cultivo observado, os resultados encontrados não foram suficientemente robustos, para confirmar com clareza a ação dos diferentes probióticos sobre a composições da Comunidade Fitoplanctônica estudada.

No tratamento P1, composto por duas espécies de *Bacillus*, observou-se a predominância de diatomáceas, com densidade média de $4,4 \times 10^4$ células/mL (43,7%), enquanto as euglenaceas foram as menos representativas, registrando $1,4 \times 10^3$ células/mL (1,4%). Padrões similares foram observados nos tratamentos P3, P4, P5 e P6. Por outro lado, no tratamento P2, que utilizou *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Saccharomyces cerevisiae*, as clorofíceas dominaram, representando 32,4% da comunidade, seguidas pelas diatomáceas (26,9%) e euglenaceas, que registraram a maior densidade média, $2,7 \times 10^4$ células/mL (21,1%). No tratamento controle, a distribuição foi mais equilibrada, com diatomáceas, clorofíceas e cianofíceas representando 33,5%, 23,5% e 30,8%, respectivamente, destacando uma grande densidade de cianofíceas.

O domínio de diatomáceas é especialmente importante, considerando que as espécies da classe *Bacillariophyceae* são amplamente reconhecidas como excelente alimento para camarões, particularmente em suas fases iniciais de desenvolvimento. Diversos autores, como Boyd (1990), Bojórquez-Mascareño e Soto-Jiménez (2013), e Maciel (2018), reforçam a importância das diatomáceas como fonte de alimento, sendo preferencialmente consumidas por pós-larvas e juvenis, como destacado por Kubitzka (2018). A fertilização inicial pode ter contribuído para o aumento da biomassa dessas microalgas, especialmente das classes *Bacillariophyceae* e *Chlorophyceae*, consideradas benéficas para o ecossistema aquático e para o crescimento dos camarões, como também discutido por ABCC/MAPA (2018).

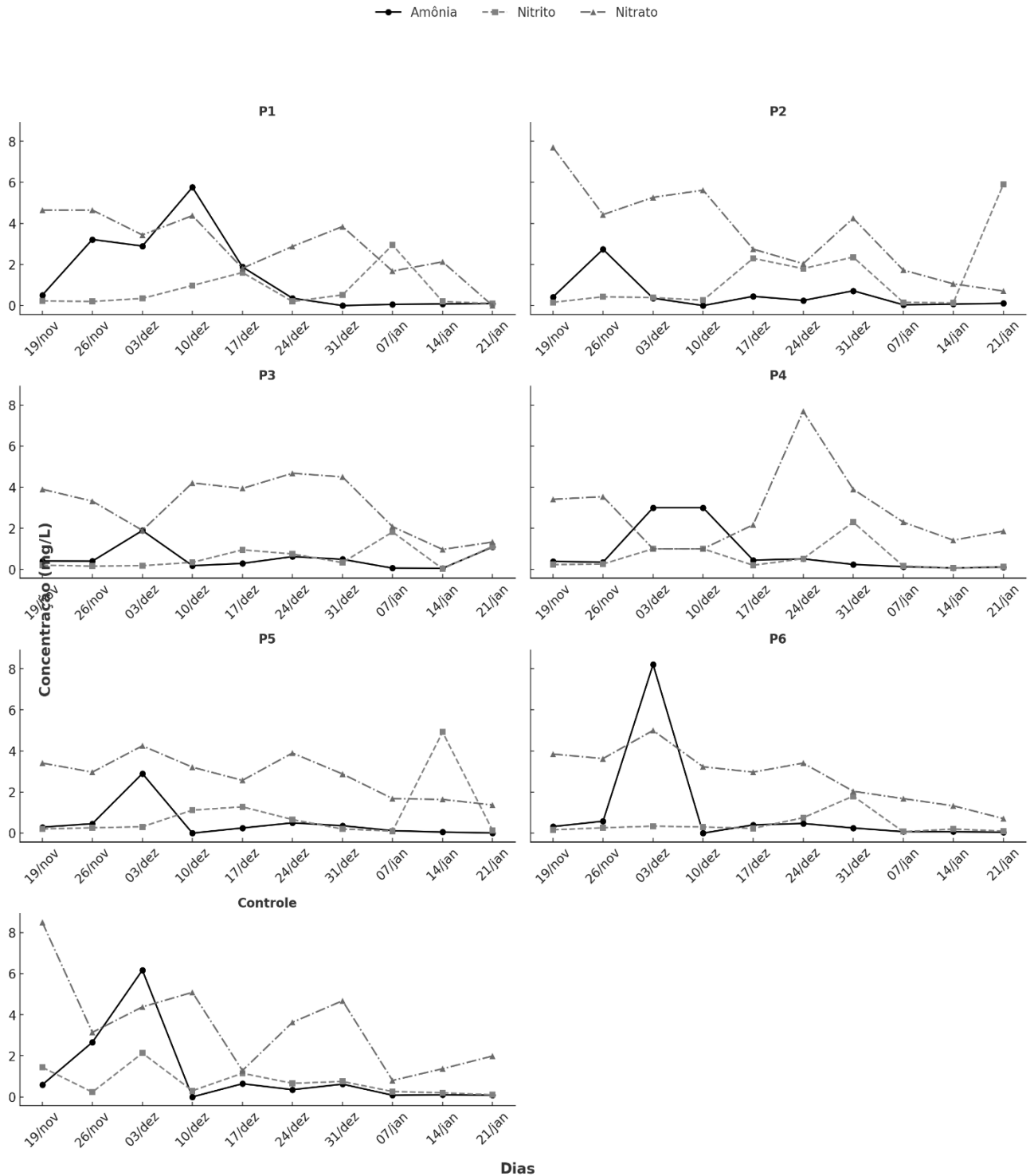
Entretanto, as espécies de *Cyanobacteria* e *Dinophyceae* apresentam riscos potenciais à qualidade da água e à saúde dos animais, devido à produção de compostos tóxicos, como apontado por Adloff *et al.* (2018), Rangel (2016) e Cavalcante *et al.* (2013). No tratamento controle, a predominância de cianofíceas coincidiu com picos elevados de amônia, que atingiram 6,0 mg/L na terceira semana, sugerindo uma relação entre a alta densidade de cianofíceas e a acúmulo de compostos nitrogenados. Alguns autores, como Hornes *et al.* (2010), explicam que certas espécies de cianobactérias utilizam gás nitrogênio e o transformam em íons amônio, favorecendo sua proliferação em ambientes ricos em nutrientes.

Nos demais tratamentos, especialmente no P6, os níveis de amônia se mantiveram mais estáveis, variando entre 0,09 e 0,50 mg/L, enquanto a concentração de nitrito foi mais consistente nos tratamentos P3 e P6, com valores finais de 0,10 mg/L. A atividade de nitrificação foi evidente em todos os tratamentos, com produção inicial de nitrato, seguida por redução ao longo do cultivo. Essa estabilidade foi mais notável nos tratamentos P3, P5 e P6, que apresentaram um melhor balanço entre a nitrificação e o aumento da biomassa.

Estudos como os de Xu *et al.* (2019) e Paiva-Maia *et al.* (2013) confirmam esses achados, indicando que probióticos podem restringir a proliferação de cianobactérias prejudiciais e favorecer a presença de microalgas benéficas, otimizando as condições para o cultivo de *Penaeus vannamei*.

A Figura 18 mostra as concentrações de amônia, nitrito e nitrato do cultivo do camarão *Penaeus vannamei* ao longo do estudo para avaliação do uso de probióticos. Esses parâmetros foram monitorados nos diferentes tratamentos testados, acompanhando os níveis de compostos nitrogenados entre os grupos.

Figura 18 - Concentrações de amônia, nitrito e nitrato registradas na água de cultivo do camarão *Penaeus vannamei* durante o estudo de avaliação do uso de probióticos.



Fonte - elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados obtidos a maioria dos tratamentos seguiu os padrões esperados de nitrificação, com a conversão de amônia em nitrito e, posteriormente, em nitrato.

No entanto, observados foram picos em nitrito em P2, P4 e Controle, indicando momentos de desbalanceamento microbiológico para esses tratamentos, provavelmente causados por fatores como carga orgânica excessiva. P3 e P6 destacaram-se como os tratamentos mais eficientes, com níveis baixos de amônia e nitrito, e estabilização rápida do nitrato. Já o tratamento controle apresentou maior instabilidade, com flutuações nos compostos nitrogenados, indicando menor eficiência de manejo.

Estudos anteriores revelaram que os probióticos mantiveram a qualidade da água, como afirmado por Wu *et al.* (2016); Newaj-Fyzul *et al.* (2014); Nimrat *et al.* (2012) e potencializaram o crescimento de grupos de organismos fitoplanctônicos como destacado por Lukwambe *et al.* (2015). Os organismos que constituem o fitoplâncton respondem aos altos níveis pH e baixos índices de oxigênio dissolvido na água dos ambientes de cultivo, tornando-se excelentes indicadores das condições ambientais, uma vez que são suscetíveis a alterações na qualidade da água, como destacado por Casé *et al.* (2008).

10.2.2. Desempenho Zootécnico

Os resultados dos testes *in vivo* realizados neste estudo mostraram uma tendência de aumento significativo na melhoria dos parâmetros de desempenho zootécnico, como peso médio, sobrevivência e produtividade, nos tratamentos com probióticos. Os dados de desempenho zootécnico para o experimento estão apresentados na tabela 21.

Tabela 21 - Descrição dos parâmetros de desempenho zootécnico entre os tratamentos (média±DP)

Parâmetros	P1	P2	P3	P4	P5	P6	C
Peso médio (g)	3,47 b	2,93 b	4,05 a	3,45 b	3,60 b	4,20 a	3,24 b
Ganho de peso semanal (g)	0,43 a	0,36 a	0,50 b	0,43 a	0,45 a	0,53 6	0,40 a
Fator de Conversão Alimentar	0,74 a	0,97 a	0,81 a	0,84 a	0,79 a	0,80 a	0,88 a
Sobrevivência (%)	41,33 a	84,00 b	89,11 b	77,28 b	63,28 a	96,00 c	96,00 c
Produtividade kg/ha	2153,2 a	3696,0 a	5417,8 b	4006,9 a	3429,7 a	6280,0 b	4675,2 a

Médias seguidas de letras diferentes entre as colunas que diferem significativamente (*Tukey*-Teste $p < 0,05$).

Os tratamentos P3 (Probiótico comercial) e P6 (Probiótico autóctone) destacaram-se entre os demais, apresentando os melhores valores de peso médio, ganho de peso semanal e produtividade. O tratamento P6 alcançou a maior produtividade, registrando 6.280 kg/ha, e também obteve a maior taxa de sobrevivência (96%) entre os tratamentos testados. Esses dados confirmam o impacto positivo do uso de probióticos, especialmente aqueles formulados de cepas autóctones, na melhoria dos indicadores produtivos.

No entanto, os tratamentos que empregaram protocolos menos eficientes ou probióticos com menor diversidade microbiológica, como P1 e P2, apresentaram desempenho inferior. O tratamento P1 registrou a menor taxa de sobrevivência entre os grupos (41,3%), destacando a necessidade de estratégias otimizadas e personalizadas para maximizar o potencial dos probióticos. Esses resultados reforçam a importância de protocolos específicos e alinhados às características do ambiente e dos microrganismos utilizados.

O FCA manteve-se uniforme entre os tratamentos. No entanto, os ganhos mais significativos foram observados nos tratamentos P3 e P6, que apresentaram maior crescimento em peso médio ao final do experimento, alcançando 4,05 g e 4,20 g, respectivamente. Tais resultados foram consistentes, com aqueles obtidos por Paiva-Maia *et al.* (2013) e por Zheng *et al.* (2019), em relação ao cultivo do camarão com uso de probióticos.

Diferenças significativas ($p < 0,05$) também foram observadas nos dados de sobrevivência. Os tratamentos P6 e Controle apresentaram as maiores taxas (96%), enquanto os demais tratamentos mostraram desempenho inferior. Apesar de não haver diferenças significativas das médias de sobrevivência entre o grupo controle e os grupos tratados, deve-se lembrar que os probióticos têm sua ação evidenciada em períodos de baixa resistência, tais como estresse e contaminação por bactérias prejudiciais aos organismos, o que não aconteceu neste trabalho. Estudos anteriores, como os de Xu *et al.* (2019) e Paiva-Maia *et al.* (2013), sugerem que em ambientes controlados e estáveis, o impacto dos probióticos pode ser menos evidente, pois os fatores adversos que normalmente exigiriam suporte suplementar, como a ação de probióticos, estão minimizados.

Na análise de produtividade, uma das variáveis de maior interesse para os aquicultores, foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Sendo os melhores valores de produtividade observadas para os tratamentos P3 e P6, onde estes tratamentos apresentaram resultados significativamente semelhantes entre si e superiores aos demais. Registrando nesses tratamentos resultados cerca de 30% superiores ao tratamento P1, que apresentou a menor produtividade.

Esses resultados destacam o papel crucial dos probióticos na otimização do cultivo de

camarões. A superioridade dos tratamentos P3 e P6 demonstra a importância de estratégias bem definidas e baseadas no conhecimento científico para a escolha e aplicação desses produtos, reforçando a necessidade de protocolos específicos e adaptados às condições locais. Essas descobertas validam estudos prévios, como os de Paiva-Maia *et al.* (2013) e Zheng *et al.* (2019), e reafirmam que o uso de probióticos é uma ferramenta indispensável para a sustentabilidade e eficiência do cultivo de camarões. No entanto, esses dados também indicam que a eficácia dos probióticos pode ser mais evidente em condições adversas, como períodos de estresse ou surtos de patógenos. Desta forma, os probióticos podem desempenhar um papel estratégico tanto na melhoria dos índices zootécnicos quanto na sustentabilidade dos sistemas de cultivo, contribuindo para uma aquicultura mais sustentável e competitiva.

12. CONCLUSÕES

A escolha dos grupos bacterianos para formação de cada consórcio baseou-se nos potenciais benefícios necessários para os organismos cultivados. Para isso, foram selecionados dois consórcios bacterianos de cepas autóctones com propriedades probióticas: um grupo composto por espécies do gênero *Bacillus* e outro por bactérias oxidadoras. O isolamento e seleção de linhagens autóctones demonstraram contribuição significativa na melhoria do desempenho zootécnico para o crescimento, sobrevivência e produtividade, além de promoverem melhorias relevantes na qualidade da água. Dentre os probióticos avaliados, o consórcio autóctone P6, composto por bactérias oxidadoras, destacou-se com o melhor desempenho geral, seguido pelo probiótico comercial P3, que continha cepas de *Bacillus spp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *Saccharomyces cerevisiae*. Esses resultados demonstram que a escolha criteriosa das cepas bacterianas é fundamental para maximizar os efeitos combinados de uma mistura probiótica, aproveitar ao máximo os seus benefícios. As bactérias isoladas para formação dos dois consórcios microbianos demonstraram propriedades probióticas promissoras nos testes *in vitro*, como a capacidade de inibir bactérias patogênicas e resistência a condições de estresse, no entanto nos experimentos realizados *in vivo* apenas uma delas se sobressaiu aos probióticos comerciais com melhora na sobrevivência, alterações no desempenho de crescimento e parâmetros de qualidade de água. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos detalhados sobre a seleção e combinação de cepas probióticas, a fim de desenvolver formulações mais eficazes e adaptadas às condições específicas de cultivo.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ineficácia de produtores vendidos como probióticos, em determinadas condições de cultivo, leva os produtores a questionarem o conceito de probiótico, ao invés de pesquisarem aspectos fundamentais das cepas utilizadas, como a origem das cepas utilizadas, o modo de ação específico e a contagem de bactérias viáveis no produto. Alguns produtos comercializados contêm espécies de bactérias não apropriadas ou com densidades populacionais insuficientes para ter efeito significativo na carcinicultura. Além disso, é comum que esses produtos sejam destinados a outras espécies ou condições ambientais, não sendo eficientes na utilização em locais onde essas bactérias não ocorrem naturalmente.

Por isso, não somente a administração, mas também a escolha e a manipulação correta desses produtos são fatores essenciais para garantir o bom desempenho desses no cultivo. Para se obter uma boa resposta na aplicação de probióticos aumentando sua efetividade em benefício ao animal, deve-se considerar previamente uma série de fatores, tais como concentração e modo de ação das bactérias, forma de aplicação, estratégia de fornecimento, e um entendimento claro dos desafios ambientais e patógenos específicos do cultivo. Além disso, o uso de probióticos elaborados a partir de isolados autóctones é especialmente recomendada, já que eles demonstram maior eficiência em atender às demandas específicas do ambiente de cultivo.

Pela análise dos resultados encontrados nesse estudo observa-se uma relação direta entre o uso dos probióticos comerciais de acordo com as recomendações dos fabricantes e melhores resultados produtivos. Por outro lado, alterações nos protocolos de aplicação indicados e as diferentes estratégias de emprego dos probióticos interferem negativamente sobre importantes parâmetros de cultivo, influenciando principalmente os resultados de sobrevivência registrados.

Apesar de estarem em conformidade com os limites estabelecidos pela legislação brasileira, foi constatado que a maioria apresentava quantidades de células bacterianas abaixo do declarado nos rótulos. Além disso, um dos produtos testados, apresentou ausência de cepas bacterianas descritas pelo fabricante, o que provavelmente causa uma redução do efeito e das propriedades do produto em benefício do cultivo e do animal. Apenas dois dos produtos testados mostraram uma boa qualidade em relação ao número de células bacterianas declaradas, demonstrando a necessidade de maior rigor na produção e comercialização desses produtos.

Com base nos princípios de atuação dos probióticos comerciais avaliados foram elaborados dois consórcios bacterianos autóctones, com cepas dos gêneros *Bacillus* sp, *Lactobacillus* sp e cocos. Essas cepas apresentaram viabilidade *in vitro* e concentração bacteriana final compatível aos produtos comerciais. No entanto, nos testes *in vivo*, apenas um

dos consórcios superou os probióticos comerciais, demonstrando melhor desempenho em sobrevivência, crescimento e parâmetros de qualidade da água.

Dentre os probióticos comerciais analisados o que obteve a preferência da maioria dos produtores durante a entrevista também mostrou os melhores resultados em resposta a viabilidade do produto nos testes *in vitro* realizados. Demonstrando crescimento equivalente em todas as condições ambientais testadas. No entanto, os resultados dos testes *in vivo* não acompanharam o mesmo padrão de eficiência, reforçando a necessidade de selecionar cepas probióticas com base em critérios rigorosos para maximizar os efeitos combinados e garantir benefícios em diferentes condições de cultivo

Portanto, o conhecimento sobre esses produtos funcionais, seus mecanismos de ação e formas de aplicação são essenciais para a eficiência dessa tecnologia nas diferentes condições de cultivo enfrentadas. Assim, para se obter uma boa resposta na aplicação de probióticos, aumentando sua eficácia em benefício do animal, é fundamental considerar previamente fatores como concentração e modo de ação das bactérias, estratégia de aplicação e desafios ambientais e patogênicos específicos do cultivo. Desta forma, a seleção criteriosa de probióticos, especialmente aqueles formulados a partir de isolados autóctones, pode representar um avanço significativo na eficiência da carcinicultura.

REFERÊNCIAS

- ABCC. **Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011.** ABCC/MPA, Natal, RN, 2013.
- ABCC; MAPA. Utilização e Manejo de Berçários Intensivos e Raceways com ênfase no Aumento do Número de Ciclos de Cultivos por Ano e Controle e/ou Exclusão de Enfermidades. Rio Grande do Norte: ABCC, 2018.
- ADEL, M. *et al.* Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition.** v. 23, n. 6, p. 1401-1409, 2017a.
- ADEL, M. *et al.* Effect of probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Penaeus vannamei*. **Probiotics & Antimicrobial Proteins.** v. 9, p. 150-156, 2017b.
- ADLOFF, C. T. *et al.* Analysis of the phytoplankton community emphasizing cyanobacteria in four cascade reservoirs system of the Iguazu River, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 23, n. 6, p. 1-14, 2018.
- AKHTER N, WU B, MEMON AM, MOHSIN M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture - A review. **Fish Shellfish Immunology.** v. 45, n. 2 - p. 733-41. 2015. Doi - 10.1016/j.fsi.2015.05.038.
- AL-KHALIDI, B. **Detection of antagonism in cross-streak experiments - practical microbiology**, 2017.
- AMENYOGBE, E. Application of probiotics for sustainable and environment-friendly aquaculture management - A review. **Cogent Food & Agriculture.** v. 9, p. 1-23, 2023. 10.1080/23311932.2023.2226425.
- AMIIN, M. K. *et al.* The role of probiotics in vannamei shrimp aquaculture performance - A review. **Veterinary World.** 2023 Mar; v. 16, n. 3, p. 638-649. 2023. Doi - 10.14202/vetworld.2023.638-649.
- AMJAD, K. *et al.* Probiotic additions affect the biofloc nursery culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), **Aquaculture**, v. 560, 738475, ISSN 0044-8486, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738475>.
- ANDRIANI, Y. *et al.* Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial and cytotoxicity properties of keys and cores part of *Pandanus tectorius* fruits. **Arabian Journal of Chemistry.** v. 12, n. 8, p. 3555-3564, 2015

- ANJOS; R. Q.; ARAUJO; M. C. Probiótico comercial no desempenho, ingestão alimentar e composição centesimal do camarão-da-Amazônia. **Engenharia de Pesca: aspectos teóricos e práticos**. v. 16, p. 254-265, 2021. Doi: 10.37885/21040426201/06/2021
- ANJUGAM, M. *et al.* Effect of β -1, 3 glucan binding protein based zinc oxide nanoparticles supplemented diet on immune response and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 76, p. 247-259. 2018.
- APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. 19 th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2000, 1-10 p.
- ARANEDA, E. M. *et al.* White Shrimp *Penaeus Vannamei* Culture in Freshwater at Three Densities: Condition State Based on Length and Weight. **Aquaculture**. v. 283, n. 1-4, p. 13-18, 2008.
- ARAUJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 34, 4, p. .837-844, 2010.
- ASSEFA, A., ABUNNA, F. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. **Veterinary Medicine International**, ID 5432497, 10 p, 2018.
- AUSTIN, B. *et al.* A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. **Journal of Fish Diseases**. v. 18, p. 93–96, 1995.
- BAIOCCO, L. M. **Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis***. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1997. 148p.
- BALCAZAR, J. L. *et al.* Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**. v. 278, p. 188-191, 2008.
- BALCÁZAR, J. L. *et al.* The role of probiotics in aquaculture: Review. **Veterinary Microbiology**. v. 114, n. 3–4, p. 173-186, 2006.
- BALCÁZAR, J.L. Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In: Blas, I. (Ed.), **Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**. Zaragoza, Spain, p. 877–881, 2002.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 66-77, 2017.

- BARRACCO, M. A. *et al.* Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. p. 237–304, 2014.
- BATHAEI, A., ZAHRAI, S. M. Improving semi-active vibration control of an 11-story structure with non-linear behavior and floating fuzzy logic algorithm. *Structures*. v. 39, p. 132-146, 2022.
- BAZAR, K. K. *et al.* Effect of Soil Probiotic on Water Quality and Soil Quality Maintenance and Growth of Freshwater Fish *Pangasius hypophthalmus*. **Letters in Applied NanoBioScience**. v. 11, n. 1, p. 3291 – 3304, 2022. <https://doi.org/10.33263/LIANBS111.32913304>
- BERNER, D.; VIERNSTEIN, H. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. **Scientia Pharmaceutica**. v. 74, p. 137-149, 2006.
- BESSA JUNIOR, A.P. *et al.* Polyculture of Nile tilapia and shrimp at different stocking densities. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.41, p.1561- 1569, 2012.
- BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (Ed.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos - Manual Técnico**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, p.72. 1995
- BIDHAN, C. *et al.* Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 40, v. 3, p. 921-971, 2014.
- BOJÓRQUEZ-MASCAREÑO, E. I.; SOTO-JIMÉNEZ, M. F. Effects of natural diet on growth on white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under experimental mesocosms emulating an intensive culture system. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 4, n. 1, 2013.
- BORGES, T.L; MEDEIROS, S.R.A. Avaliação da adequação de rotulagem de alimentos probióticos com alegação de propriedade funcional. **Nutrivisa – Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**. v. 3, n. 2, p. 70-75, 2016
- BÓSQUEZ, A. *et al.* Characterization and Viability Prediction of Commercial Probiotic Supplements under Temperature and Concentration Conditioning Factors by NIR Spectroscopy. **Fermentation**. V. 8, n. 2, ed 66, 2022. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020066>
- BOYD, C. E. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama: Agricultural Experimental Station – Arlburn University, 1990.
- BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. Ponds aquaculture water quality management. **Springer - Keuwer Academic Publishers**, p. 700, 1998.
- BOYD, C.E. Bottom soil and water quality management in shrimp ponds. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 13, n. 1-2, p. 11-33, 2003.

- BOZOGLU, T.F.; OZILGEN, M; BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 9, p. 531–537, 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução **Normativa nº 11, de 8 de junho de 2005**. Regulamento técnico para registro e fiscalização de estabelecimentos que manipulam produtos de uso veterinário. Boas práticas de manipulação de produtos veterinários. Diário Oficial União. Brasília, 8 de jun. 2005.
- BRASIL. Presidência da República, Secretária-geral, Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Decreto nº 8.840, de 24 de agosto de 2016**. Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem. Alteração ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004 [Internet]. Diário Oficial União. Brasília, 24 de ago. 2016. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/decreto/D8840.htm> Acesso em 9 mar. 2020.
- BRITO, L. *et al.* Utilização do sistema simbiótico em berçário de camarões marinhos. **Aquaculture Brasil**. v. 18, 11-15, 2020.
- BUGLIONE, C. C. *et al.* Avaliação de bacteriana e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção experimental por *Vibrio harveyi* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, p. 40-45, 2008.
- BUSANELLO, M. *et al.* Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 11, n. 4, p.14-24, 2012.
- CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture - a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**. v. 8, p. 1137-1144, 2006.
- CAI, Y. *et al.* Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 45, n. 4, p. 177-184, 1999.
- CAI, X. *et al.* The probiotic effects, dose, and duration of lactic acid bacteria on disease resistance in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Reports**, v. 26, p. 101299, 2022.
- CAIPANG, C. M. *et al.* Host-derived Probiotics for Finfish Aquaculture. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. v. 430, 012026, 2020. Doi: 10.1088/1755-1315/430/1/012026.
- CASTEX, M. *et al.* Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 28, p. 622-631, 2010.
- CASTRO, S. *et al.* PROBIÓTICO MULTI-CEPAS NA NUTRIÇÃO AQUÍCOLA: Aspectos

práticos e recentes avanços tecnológicos para a saúde intestinal de peixes e camarões.

Panorama Da Aqüicultura, julho, agosto, p. 34-37, 2015.

CAVALCANTE, K.P. *et al.* First record of expansive *Ceratium* Schrank, 1793 species (Dinophyceae) in southern Brazil, with notes on their dispersive patterns in Brazilian environments. *CheckList*, v.9, p. 862–866, 2013.

CHA, J. H. *et al.* Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. **Aquaculture** v. 402–403, p. 50– 57, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.030>

CHABRILLÓN, M. *et al.* Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). **Journal Fish Diseases**. v. 28, p. 531–537, 2005.

CHANG, C.I., LIU, W.Y., SHYU, C.Z. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 43, p. 153–157, 2000.

CHANG, C.I.; LIU, W.Y. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla Anguilla*. **Journal of Fish Diseases**. v. 25, p. 311-315, 2002.

CHARTERIS, A. *et al.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J. of F. Protect.**, v.61, p.1636-1643, 1998.

CHEN, M.Y. *et al.* Effects of adenosine triphosphate (ATP) treatment on postharvest physiology, quality and storage behavior of longan fruit. **Food and Bioprocess Technology**. v. 8, p. 971–982, 2015. doi: 10.1007/s11947-014-1462-z.

CHEN, X. *et al.* Dietary nucleotide supplementation enhances the growth, immune response, and disease resistance of the juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture International**. v. 30, p. 1755–1768. 2022.

CHO, Y.A.; KIM, J. Effect of probiotics on blood lipid concentrations. **Medicine**. v. 94, e1714, 2013.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase- negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, p. 996-1006, 1985.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement**. M100-S19. CLSI: Wayne, v. 29, n. 3, 149 p, 2010.

- COPPOLA, M. M.; GIL TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, jul-ago, 2004.
- COULIBALY, I. *et al.* Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 70–84, 2009.
- CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011. Doi:10.1016/j.fm.2010.03.007.
- DAS, S. K. *et al.* Desempenho produtivo, desempenho reprodutivo e características de carcaça de coelhos de corte em diferentes gerações sob condições agroclimáticas de Meghalaya. **Journal of Animal Research**. v. 40, n. 1, p. 38-41, 2006.
- DAWOOD, M.A.O. *et al.* Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish Shellfish Immunology**. v. 49, p. 275–285, 2017.
- DE SCHRIJVER, R.; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 186, p. 107-116, 2000.
- DENKOVA, R. *et al.* Atividade antimicrobiana de lactobacilos probióticos, bifidobactérias e bacterias do ácido propiônico, isoladas de diferentes fontes. Microbianopatógenos e estratégias para combatê-los: ciência, tecnologia e educação. p. 857–864, 2013.
- DEVARAJA, T.N. *et al.* A holistic approach for selection of *Bacillus* spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. **Turkish Journal of Biology**. v. 37, p. 92-100, 2013. 10.3906/biy-1203-19.
- DIAS, J. A. R. *et al.* Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Research**. v. 49, 3063–3070, 2018. DOI: 10.1111/are.13767
- DOAN, U. V. *et al.* *Datura* and *Brugmansia* plants related antimuscarinic toxicity: an analysis of poisoning cases reported to the Taiwan poison control center. **Clinical toxicology** (Philadelphia, v. 57, n. 4, p. 246–253, 2019. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1513527>.
- DOGAN, Y. *et al.* Of the importance of a leaf: The ethnobotany of sarma in Turkey and the Balkans. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v. 11, n. 6, p. 10-15, 2015.
- EL-SAADONY, M. T., *et al.* A review of shrimp aquaculture and factors affecting the gut microbiome. **Aquaculture International**. v. 30, n. 6, p. 2847–2869, 2022.
- ELSHAGHABEE, F. M. F. *et al.* *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. **Front Microbiol**. v. 8:1490, 2017.

- ELUMALAI, P.; PRAKASH, P.; MUSTHAFA, M. S.; FAGGIO, C. Effect of alkoxy glycerol on growth performance, immune response and disease resistance in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in veterinary science**, v. 123, p. 298-304, 2019.
- FALCINELLI, S. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* lowers zebrafish lipid content by changing gut microbiota and host transcription of genes involved in lipid metabolism. **Scientific Reports**, v. 5, 9336, 2015.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fisheries and Aquaculture: Global aquaculture production Quantity (1950 - 2020)**. Disponível em: https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_quantity Acesso em 29 agosto de 2023.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Towards Blue Transformation. Rome: FAO. 2022. 266p. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc0461en> Acesso em 29 agosto de 2023.
- FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 149-158, 2006.
- FERNANDES, D. *et al.* Caracterização de amônia, nitrato, nitrito, fosfato (orto) dissolvido e clorofila “a” em uma fazenda de cultivo de camarão. **Revista de Geologia**, v. 20, n. 1, p. 99-117, 2007.
- FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, p. 248, 2012.
- FLORES-VALENZUELA, E *et al.* Water quality and productive response of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc with addition of commercial strains of nitrifying bacteria and *Lactobacillus rhamnosus*. **Aquaculture**, 542:736869. 2021.
- FONSECA, J.R.S. *et al.* effects of bac-trat® probiotic complex on growth, hematological and intestinal parameters of Nile tilapia, reared at low temperatures. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 46, n. 2, 2020.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, n.5, p.365-378, 1989.
- GALLINAA, D. A. *et al.* Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 4, p. 239-44, 2011.

- GARCIA, R. V.; FARIAS, R. L. G.; LIMA, A. R. C. Estudo de rótulos de leite fermentado comercializados no município João Pessoa – PB. **Revista Verde, Mossoró**, v. 7, n. 1, p. 15 - 18, 2012.
- GARCIA, R. V.; FARIAS, L. R. G.; LIMA, A. R. C. Estudo de rótulos de leite fermentado comercializados no município João Pessoa – PB. **Revista Verde**. v. 7, n.1, p. 15-18, 2012.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147 – 165, 1999.
- GHADBAN, G.S. Probiotics in broiler production - A review. **Archiv fur Geflugelkunde**. v. 66. P. 49-58, 2002.
- GHELARDI, E. *et al.* Analysis of the microbial content of probiotic products commercialized worldwide and survivability in conditions mimicking the human gut environment. **Front. Microbiology**. v. 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1127321>
- GHOSH, A. K. *et al.* Impact of commercial probiotics application on growth and production of giant fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). **Aquaculture**, Amsterdã, v. 4, p. 112-117, 2016.
- GIL TURNES, C. *et al.* Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.30, n.1, p.11-14, 1999
- GULLIAN, M. *et al.* Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*, **Aquaculture**, v. 233, p. 1-14, 2004, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>.
- GUO, X. *et al.* Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharynodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 52, p. 74–84, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.017>
- HAI, N. V. The use of probiotics in aquaculture. **J Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 119, n. 4, p. 917–935, 2015.
- HÅKANSON, L.; BRYHN, A. C.; BLENCKNER, T. Operational effect variables and functional ecosystem classifications—a review on empirical models for aquatic systems along a salinity gradient. **International Review of Hydrobiology**, v. 92(3), p. 326–357, 2007.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. *et al.* Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic organisms. **Public Health Nutrition**. v. 2, p. 223 - 229, 1999.
- HLORDZI, V. *et al.* The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. **Aquaculture Reports**. v. 18, 100503. 2020. [10.1016/j.aqrep.2020.100503](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503).
- HORNES, M. *et al.* Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da

cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nageli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 364-371, 2010.

HOSEINIFAR, S.H. *et al.*, The study of antioxidant enzymes and immune-related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings fed different prebiotics. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, pp. 5447-5454, 2017.

HUNGRIA, T.D.; LONGO, P.L. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico intil relacionada a vida-de-prateleira *Lactobacillus casei* viability in child probiotic food related to shelf-life. **Revista Saúde**. V. 3, n. 3, p. 10-15, 2009

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of fish diseases**. v. 25, n. 11, p. 633-642, 2002.

JAHANGIRI, L.; ESTEBAN, M. Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: A Review. **Fishes**, v. 3, n. 3, 33, 2018.

JATOBÁ, A. *et al.* Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

JESUS, G. F. A. *et al.* Probióticos na piscicultura. Aquaculture Brasil - Setembro/Outubro 2016. Disponível em: https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Trabalho-Periodico/54-Trab_periodico-piscicultura-sanidade.pdf. Acessado em 15/09/2023.

JUDKINS T. C. *et al.* Probiotics, nutrition, and the small intestine. **Current Gastroenterology Reports**. v. 22, n. 1, 2, 2020.

KAMAL, S. Z. *et al.* Effect of enzymatic pre-treatment on thermophilic composting of shrimp pond sludge to improve ammonia recovery. **Environmental Research**. 204 (Pt C):112299, 2022.

KARTHIK *et al.* Efficacy of probiotic and nitrifier bacterial consortium for the enhancement of *Penaeus vannamei* aquaculture. **International Journal of Veterinary Sciences Research**, v. 1, n. 1, 2015.

KARTHIK, M.; BHAVAN, P.S. Supplementation of *Lactobacillus brevis* for growth promotion of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae and identification of gut microflora through 16S rDNA. **Research Journal of Biotechnology**. v. 13, n. 1, p. 34-50, 2018.

KARTHIK, R. *et al.* Effectiveness of *Lactobacillus* sp. (AMET1506) as probiotics against vibriosis in *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei* shrimp aquaculture. **Biosciences Biotechnology Research Asia**. v. 11, p. 297-305, 2014.

KENNEDY, S.B. *et al.* Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: A case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). p. 573-588, 1998.

KERRY, R. G., *et al.* Benefício de probióticos para a saúde humana: uma revisão. **J Food Drug**

Analysis, v. 26, n. 3, p. 927–939. 2018.

KESARCODI-WATSON, A. *et al.* Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1–14, 2008.

KEWCHAROEN, W. E SRISAPOOME, P. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). **Fish Shellfish Immunology**. v. 94, p. 175–189. 2019.

KHAN, S.; MAHMUD, S. The impact of probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* in growth and survival of the juvenile fresh water river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) infected with pathogenic *Vibrio* spp. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v. 5, n. 3, p. 225-229, 2015.

KIM, Y. *et al.*, Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. **Nutrition Research Reviews**. v. 31, n. 1, p. 35-51, 2018. Doi: 10.1017/S095442241700018X

KNIPE, H. *et al.* Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. **Reviews in Aquaculturem**, [s.l.], v. 13, p. 324-352, 2021. Doi: 10.1111/raq.12477

KONURAY G, ERGINKAYA Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. **Foods**. v. 7, n. 6, p. 92, 2018.

KORONA-GLOWNIAK, I. *et al.*, Microbiological evaluation of 10 commercial probiotic products available in Poland. **Curr. Issue Pharm. Med. Sci.** v. 32, p. 121–124, 2019. 10.2478/cipms-2019-0022

KRUMMENAUER, D. *et al.* The effect of probiotics in a *Litopenaeus vannamei* biofloc culture system infected with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Aquaculture**. v. 26, n. 4, p. 370-379, 2014

KUBITZA, F. Adubação eficiente na produção de camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura**, v. 28, ed. 166, p. 14-25, mar./abr. 2018.

KUMAR, V. *et al.* Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 24, n.4, p. 342-368, 2016.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. Review. Aquaculture. v, 20 p. 53-62, 2014.

LI, B. Z. *et al.* Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 250–254, 2009.

LIU, G. *et al.* Temperature drives the assembly of *Bacillus* community in mangrove ecosystem, **Science of The Total Environment**, v. 846, 157496, ISSN 0048-9697, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157496>.

LIU, K.F. *et al.* Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 28, n. 5-6, p. 837–844, 2010.

LIU, X. F. *et al.* Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. Antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. **World J Microbiol Biotechnology**, v. 31, p. 795–803, Mar 2015.

LOZUPONE, C. A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**. v. 13, n. 489, p. 220-30, 2012. doi: 10.1038/nature11550. PMID: 22972295; PMCID: PMC3577372.

LUIS-VILLASENOR, I. E. *et al.* Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: Modulation 18 of the bacterial community. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 257–265, 2013. doi: 10.1007/s11274-012-1177-0

LUKWAMBE, B.; QIUQIAN, L.; WU, J.; ZHANG, D.; WANG, K.; ZHENG, Z. The effects of commercial microbial agents (probiotics) on phytoplankton community structure in intensive white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) aquaculture ponds. *Aquaculture International*, v. 23, n. 6, p. 1443-1455, 2015.

MACEDO, N.L. *et al.* Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 28, n. 4, p. 935-42, 2008

MACIEL, J. C. Restrição alimentar na criação do *Litopenaeus vannamei* em sistemas de recirculação e de bioflocos. 94 f. Tese (Doutorado em Produção Animal/Aquicultura) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MACUSI, E. D. *et al.* Environmental and Socioeconomic Impacts of Shrimp Farming in the Philippines: A Critical Analysis Using PRISMA. **Sustainability**. v. 14, 2977. 10.3390/su14052977, 2022.

MADANI N.S.H. *et al.* The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. **Aquaculture Research**. v. 49, n. 5, p - 1926–1933, 2018.

MAEDA, M. *et al.* Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. **Marine Biotechnology**. v.16, n. 2, p. 181-192, 2014.

- MAKRIDIS, P. *et al.* Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima* and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. **Aquaculture**, v. 255, p. 76–81, 2006.
- MARÍN, J. C. *et al.* Nitrobacterias em reatores biológicos rotativos de controle (CBC) de três câmaras bajo diferentes cargas orgânicas. **Revista Tecnocientífica URU**, v. 2012, n. 2, p.71-82, 2012.
- MARTÍNEZ CRUZ, P. *et al.* Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*. v. 16, 916845, 2012 doi: 10.5402/2012/916845. PMID: 23762761; PMCID: PMC3671701.
- MAZZANTINI, D., *et al.* Spotlight on the Compositional Quality of Probiotic Formulations Marketed Worldwide. **Front Microbiology**. v. 20, 12:693973, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.693973. PMID: 34354690; PMCID: PMC8329331.
- MEHLA, B. *et al.* *Bacillus subtilis* can improve water quality. **European Chemical Bulletin**. v. 12, n. 8, 8139-8153, 2023
- MERCANTE, C. T. J. *et al.* Limnologia de viveiro de criação de tilápias do nilo: avaliação diurna visando boas práticas de manejo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 73 – 84, 2011.
- MERRIFIELD, D. *et al.* The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**. v. 302, p. 1-18. 2010. doi.10.1016/j.aquaculture.2010.02.007.
- MIANDARE, H.K. *et al.* Immune related transcriptional responses and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed on dietary probiotic PrimaLac®. **Fish Shellfish Immunology. Fish & Shellfish Immunology**. v. 55, p. 671-678, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.053>
- MIDHUN, S. J. *et al.* Dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* HGA8B improves growth parameters, enzymatic profile and gene expression of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**. v. 505, p. 289-296, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.064>.
- MISCHKE, C. C.; ZIMBA, P. V. Plankton community responses in earthen channel catfish nursery ponds under various fertilization regimes. **Aquaculture**, v. 233, p. 219–235, 2004.
- MONTEAGUDO-MERA, A. *et al.* *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**. v. 4, n.2, p. 531-541, 2012.
- MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**. v.164, p.351-358, 1998.
- MORIARTY, D.J.W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: BELL,

- C.R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. **Atlantic Canada Society for Microbial Ecology**, Halifax, Canada, p. 237-243, 1999.
- MORINIGO, M. A. *et al.* Intestinal Microbiota Diversity of the Flat Fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) Following Probiotic Administration. **Microbial Ecology**. v.60, n.2, p.310-319, 2010.
- MORUF, O; USMAN, B. **Probiotics as Live Boon to Shrimp Aquaculture - A Mini-Review**. In Book Of Proceedings Theme: Animal Agriculture: A Sustainable Path To National Food Security And Economic Recovery 18th - 22nd June, 2023. ISBN: 978-978-799-934-9 ISBN: 978-978-799-934-9.
- MOURIÑO, J.L.P. *et al.* Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Aquaculture Nutrition**, v.18, p.73-80, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x.
- MUNOZ-ATIENZA, E. *et al.* Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. **BMC Microbiology**. 13, 15. 2013.
- NASSER, P.P. *et al.* Implicações do fungo *Aspergillus niger* var. *niger* sobre o crescimento de isolados de *Aspergillus* da seção *Circumdati* e produção de ocratoxina a. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 27, n.5, p.1172-1175, 2003.
- NATORI, M.N. *et al.* Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, v. 41, p. 61-73, 2011.
- NEWAJ-FYZUL, A., AUSTIN, B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. **Journal of Fish Diseases**. v. 38, p. 937-955, 2015.
- NIKOSKELAINEN, S. *et al.* Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*? **Aquaculture**. v.198, n. 3-4, p. 229-236, 2001.
- NIMRAT, S. *et al.* Dietary administration of *Bacillus* and yeast probiotics improves the growth, survival, and microbial community of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Applied Aquaculture**, Londres, v. 33, p. 15-31, 2019.
- NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402S-1406S, 1999.
- NOBREGA, R.S.A. *et al.* Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Revista Ciência e agrotecnologia**, v. 28, n. 4, 2004, p. 899-905.
- OLIVEIRA, M. N. *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

OLMOS, J., OCHOA, L., PANIAGUA, J. M. Functional Feed Assessment on *Litopenaeus vannamei* Using 100% Fish Meal Replacement by Soybean Meal, High Levels of Complex Carbohydrates and *Bacillus* Probiotic Strains. **Marine Drugs**, v.9, n.6, p.1119-1132, 2011.

OMAR, A.F. *et al.* Visible spectral linearisation, gradient shift and normalisation in quantifying carambola acidity. **Food Biophysics.** v. 7, p. 289–295, 2012. doi: 10.1007/s11483-012-9267-y.

OUWEHAND, A. C. *et al.* Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 16, n. 2, p. 212-7, 2005 doi: 10.1016/j.copbio.2005.01.007.

PAIVA-MAIA, E. *et al.* Effect of a commercial probiotic on bacterial and phytoplankton concentration in intensive shrimp farming (*Litopenaeus vannamei*) recirculation systems. Latin American Journal of Aquatic Research, v. 41, n. 1, p. 126-137, 2013.XU, W. *et al.* Addition of algicidal bacterium CZBC1 and molasses to inhibit cyanobacteria and improve microbial communities, water quality and shrimp performance in culture systems. *Aquaculture* 502, 303–311, 2019.

PANCHENIAK, E. F. R. **Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01- 001 em suínos**, Universidade Federal do Paraná, Tese de doutorado, 2005.

PANDEY, K. R., NAIK, S. R., VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal Food Science Technology.** v. 52, n. 12, p. 7577-87, 2015. doi: 10.1007/s13197-015-1921-1.

PANDIYAN, P. *et al.* Probiotics in aquaculture. **Drug Invention Today.** v. 5, n. 1, p. 55-59, 2013. S0975761913000082

PEDROZA FILHO; ROUTLEDGE, E. **Nota técnica intensificação produtiva da aquicultura brasileira e novas demandas tecnológicas.** EMBRAPA – Março/206, 2016.

PERBELIN, A. *et al.* O papel da microbiota como aliada no sistema imunológico. **Arquivos do MUDI**, v. 23, n. 3, p. 345-358, 2019.

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

PEREIRA, M. O. *et al.* Curcuma longa hydrolate improves Nile tilapia survival in a recirculation rearing system, maintaining the animal homeostasis and modulating the gut microbial community. **An Acad Bras Cienc.** v. 93, n. 4, e20210088, p. 2 - 13, 2021.

- PEREIRA, M. O. *et al.* Supplementation of *Curcuma longa* hydrolate improves immunomodulatory response in Nile tilapia reared in a recirculation aquaculture system. **Arq Bras Med Vet Zootec** v. 72, n. 5, p. 1805-1812, 2020.
- PETRI, R. Uso de Exclusão Competitiva na Avicultura no Brasil. **In: II Simpósio de Sanidade Avícola**, setembro de 2000. Santa Maria, 2000.
- PHIANPHAK *et al.* Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Journal of Scientific Research**. v. 24, p. 41-51, 1999.
- PICCHIETTI, S. *et al.* Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). **Fish Shellfish Immunology**, v. 26, n. 3, p. 368-76, Mar 2009.
- PICCHIETTI, S. *et al.* Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. **Fish Shellfish Immunology**, v. 22, n. 1-2, p. 57-67, Jan-Feb 2007.
- POERSCH, L. *et al.* Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Ciência Rural**, n 36, p. 1337-1343, 2006.
- RAMASUBBU, S. *et al.* Antibacterial activity and phytochemical analysis of selected seaweeds from mandapam coast, India. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 2, p. 159-169, 2012. Doi: 10.7324/JAPS.2012.21030.
- RANGEL, L. M. Morphology-based functional groups as effective indicators of phytoplankton dynamics in a tropical cyanobacteria-dominated transitional river–reservoir system. **Ecological Indicators**, v. 64, p. 217-227, 2016.
- RAY, A. K.; GHOSH, K.; RINGO, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p.465-492, 2012.
- REBOUÇAS, L.O.S. *et al.* Qualidade física e sensorial do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em água doce. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.16, n.4, 2017.
- REBOUÇAS, R. H. *et al.* *Vibrio* spp. como patógenos na carcinicultura: alternativas de controle. **Arquivos de Ciências do Mar**. v. 50, n. 1, p. 163 – 179, 2017.
- RIBEIRO, P.A.P.; COSTA, L.S; LOGATO, P.V.R. Probióticos na aquicultura. **Revista eletrônica Nutritime**. v. 6, n. 1, p. 837-846, 2008.
- RINGØ. E. *et al.* Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. **Aquaculture Nutrition**. v. 22, n. 2, p. 219-282, 2016.
- RINGØ. E. Probiotics in shellfish aquaculture. **Aquaculture and Fisheries**. v. 5, n. 1, p. 1-27, 2020.
- ROBLES-PORCHAS, G. R. *et al.* The **nitrification** process for nitrogen removal in biofloc

- system aquaculture. **Review in aquaculture**. v. 12, n. 4, p. 2228–2249, 2020.
- ROCHA, I.P. As perdas de oportunidades pelo setor pesqueiro brasileiro, com ênfase para a carcinicultura marinha: histórico, entraves e perspectivas de recuperação. **Revista ABCC**, v. 16, n. 1, p. 19-23, 2014.
- ROCHA, I.P., ROCHA, D.M. Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, n 1, p. 18-23, 2010.
- ROCHA, R. S.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 105, n. 1, p. 337-340, 2016.
- RODRIGUES, D. P. *et al.* Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 589-592, 1993.
- ROMANO, L.H., *et al.* Review: Aplicação de Microorganismos e Biologia Molecular na Produção de Bioenergia. **Saúde em Foco**, Edição nº: 08, 2016.
- ROMERO, J.; FEIJOO, C.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. **Health and Environment in Aquaculture**. p. 159-196, 2012.
- ROTHFUSS, F.; BENDER, M.; CONRAD, R. Survival and activity of bacteria in a deep, aged lake sediment (lake constance). **Microbial Ecology**, v.33, p.69-77, 1997.
- RUDTANATIP, T. *et al.* Bioencapsulation efficacy of sulfated galactans in adult *Artemia salina* for enhancing immunity in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunology**. v. 94, p. 90–98, 2019.
- RUNGRASSAMEE, W. *et al.* N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 12–19, 2016.
- SAAD, S.M.I., Probióticos e prebióticos - o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.1, p.1-16, 2006.
- SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n.3, p. 197-215, 2000..
- SAHU, M. K. *et al.* **Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives**. **Indian J Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 299–308, 2008.
- SAMPAIO, F. G. *et al.* **Estratégias de monitoramento ambiental da aquicultura: portfólio de resultados do monitoramento ambiental da aquicultura Em água da União**. – São Paulo, iv, 95.; il.gráf. 2019.
- SANTIAGO, J. A. S. *et al.* Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados- revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**. v. 46, n. 2, p. 92 – 103, 2013.

- SCHMIDT, A. S.; MORTEN, S. B.; DALSGAARD, K. P. Occurrence of antimicrobial resistance in fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4908-4915, 2000.
- SCHORTEMAYER, M. *et al.* Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face). **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.1717-1724, 1996.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.
- SCHULTZ, D. Deciding fate in adverse times: Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 106, n. 50, p. 21027-34, 2009.
- SCOPEL, B. R. Mergulhando na Aquicultura Asiática Inovações e Tecnologias da Ásia para a Carcinicultura Brasileira **Revista ABCC**. v. 16, n. 1, p. 49-51, 2014.
- SEENIVASAN, R. *et al.* Antibacterial activity and phytochemical analysis of selected seaweeds from mandapam coast, India. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 2, p. 159-169, 2012. 10.7324/JAPS.2012.21030.
- SEQUEIROS, C. *et al.* Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. **Archives of Microbiology**. v. 197, p. 449-458, 2015.
- SHAH, N.P., RAVULA, R.R. Influence of water activity on fermentation, organic acid production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **Austr. J. Dairy Technology**, Sidney, v.55, n.3, p.127-131, 2000
- SHEFAT, S.H.T. Use of probiotics in shrimp aquaculture in Bangladesh. **Acta Scientific Microbiology**. v. 1, n. 11, p. 20-27, 2018.
- SIEW, S. *et al.* Characterization of bacterial communities in prebiotics and probiotics treated shrimp farms from Kuantan. **Malaysian Journal of Microbiology**. 19. v. 19, n. 4, p. 435-446. 2023. 435-446. 10.21161/mjm.220048.
- SILVA, B. Probióticos na Piscicultura. In book: *Piscicultura Continental com Enfoque Agroecológico*, Editors: IFSC. 2016.
- SILVA, E. F. B. *et al.* Uso de probióticos na produção de pós-larvas de camarão-rosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 869-874, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600019>
- SILVA, J.L.S. *et al.* Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v. 38, n. 3, p. 233-241, 2016.

- SOARES, D. C. E., *et al.* Preliminary evaluation of the use of bacteria isolated from the digestive tract of shrimp *Litopenaeus vannamei* as a source to accelerate the process of formation and development of bioflocs. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 3, n. 1, e52219. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.52219>
- SOARES, D. C.E. HENRY-SILVA, G. G. Emission and absorption of greenhouse gases generated from marine shrimp production (*Litopenaeus vannamei*) in high salinity, **Journal of Cleaner Production**. v. 218, p. 367-376, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.002>
- SOTO-RODRIGUEZ, S. A. *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1689-1699, 2015.
- SOTO-RODRIGUEZ, S. A. *et al.* Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Brightred” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 307-317, 2012.
- SOUZA JÚNIOR, E. A. **Efeitos de diferentes estratégias de aplicação de probióticos no cultivo de *Litopenaeus vannamei***. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Pesca e Aquicultura, 2008. 55 f
- SUGITA, H., MIYAJIMA, C., DEGUCHI H. Correlation between *in vitro* Mucus Adhesion and the *in vivo* Colonization Ability of Lactic Acid Bacteria: Screening of New Candidate Carp Probiotics. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**. Tsukuba, p. 511-515. 2010.
- SWAIN, S.M.; SINGH, C.; ARUL, V. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 697-703, 2009.
- TAHIM, E. F. *et al.* de Trajetória Tecnológica e Sustentabilidade Ambiental na Cadeia de Produção da Carcinicultura no Brasil. **Revista de economia e sociologia rural**, v. 57, n. 1, p. 93–108, 2019. <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790570106>
- TELLI, G. S. *et al.* Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. **Fish and Shellfish Immunology**, 39: 305-311, 2014.
- TENDENCIA, E. A.; PEÑA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, p. 193-204, 2001.
- TENDENCIA, E. A.; PEÑA, L. D. Level and percentage recovery of resistance to oxtetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v.

213, p. 1-13, 2002.

TOLEDO, A. *et al.* Impact of probiotics on growth performance and shrimp survival: A meta-analysis. **Aquaculture**. v.500, p. 196-205, 2019.

TORO, C. R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. PhD Theses, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil. 2005.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. Porto Alegre, Artmed, 10. ed., 934 p 2012

TSAI, C.; CHI, C.; LIU, C. The growth and apparent digestibility of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, are increased with the probiotic, *Bacillus subtilis*. **Aquaculture Research**, Nova Jersey, v. 50, p. 1475-1481, 2019.

TYMCZYSZYN, E. E. *et al.* Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 217-221, 2012.

UDDIN, G. M. N. *et al.* Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. **PloS One**, v. 10, n. 7, 2015.

ULLAH, A. *et al.* Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103, p. 7385–7397, 2019.

UNTERKIRCHER, M. V. *et al.* Segurança no uso de probióticos em pacientes imunocomprometidos. **JBT J Bras Transpl**. v. 15, p. 1651-1690, 2012.

VALENCIA-CASTAÑEDA, G. *et al.* Acute Toxicity of Ammonia, Nitrite and Nitrate to Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae in Low-Salinity Water. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 101, p. 229–234, 2018.

VANDENPLAS, Y. *et al.* Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**. v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VASEEHARAN, B; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 36, n. 2, p. 83-7, 2003.

VERSCHUERE, L. *et al.* Probiotic bacterias as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-71, 2000.

VIDAL, J.M.A. *et al.* Probiotic potential of *Bacillus cereus* against *Vibrio* spp. in post-larvae shrimps. **Revista Caatinga**. v. 31, n. 2, 2018.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Vibrioses em camarão cultivado. **Arquivos de Ciências Mar**, Fortaleza, v. 42, n.1, p. 112-120, Jan-jun 2009.

VINE, N.G., LEUKES, W.D., KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 30, p. 404–427, 2006.

- VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. *In vitro* growth characteristics of fish candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p.145-152, 2004.
- VOGELEY, J. L. Growth and immune gene expression of *Litopenaeus vannamei* fed *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* supplemented diets and challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society**. v. 27, n. 5, p.1451-1464, 2019.
- WANG, Y.C. *et al.* Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Penaeus vannamei*, than single probiotic strains. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 84, p. 1050-1058, 2019.
- WEESE, J. Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. The Canadian veterinary journal. **La revue vétérinaire canadienne**. v. 44. p. 982-320, 2004.
- WETZEL, R.G. **Limnology Lake and river ecosystems**. 3ed ed. Academic Press. California, USA. 2001.
- WILLISTON, E. H.; ZIA-WALRATH, P.; YOUMANS, G. P. Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type tubercle bacilli. **Journal of bacteriology**, v. 54, n. 5, p. 563, 1947.
- WON, S. *et al.* 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**. v. 8, n. 281, p. 2-15, 2020.
- WU, H. J. *et al.* Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus* strains in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Fish Shellfish Immunology**. v. 41, p. 156-162, 2014.
- XIMENES, L. F., VIDAL, M. F. Pesca e Aquicultura Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste. **ETENE**. 8, Nº 274, Março, 2023.
- YE, J. D. *et al.* Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture Nutrition**. v. 17, p. 902-911. 2011.
- ZHANG, Y.; ZHANG, H. The effects of probiotics on lipid metabolism. **In Lipid Metabolism; Baez, R.V., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, pp. 443–460, 2013.**
- ZHENG, X., WANG, Y., ZHANG, D. Effects of microbial products and extra carbon on water quality and bacterial community in a fish polyculture system. **Aquac. Res.** 50, 1220–1229. 2019.

ZHENG, Y. *et al.* Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. **Aquaculture**, v. 451, p. 163–169, 2016.

ZHOU, X. X. *et al.* Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 501-509, Sep 2010.

ZOKAEIFAR, H. *et al.* Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 36, p. 68-74, 2014.

ZOKAEIFAR, H. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 33, n. 4, p. 683-689, 2012.

ZORRIEHZAHRA, M. J. *et al.* Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Vet Q.** v. 36, n. 4, p. 228-241. 2016. Doi: 10.1080/01652176.2016.1172132.

ZUO, Z.H. *et al.* Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Penaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 86, p. 160-168, 2019.

APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

QUESTIONÁRIO

1. Perfil do Produtor

1. Qual é o tamanho total da sua área de produção?
2. Qual é a área total dos viveiros utilizados no cultivo?
3. Qual sistema de cultivo você utiliza?
4. Há quanto tempo você atua com o cultivo de camarões?
5. Qual é a densidade de estocagem utilizada em cada ciclo de cultivo (número de animais por metro quadrado)?
6. Qual foi a taxa de sobrevivência registrada no último ciclo de cultivo?
7. Qual é a produtividade média alcançada por hectare?

2. Uso de Probióticos

8. Você faz uso de probióticos?
 - () Sim
 - () Não
 - Se não, por que não utiliza probióticos?
9. Qual probiótico você utiliza?
10. Você considera importante utilizar probióticos?
 - () Sim
 - () Não
11. Qual é o alvo de aplicação dos probióticos?
 - () Água
 - () Solo
 - () Ração
12. O que levou você a escolher esse produto? Você realizou algum teste antes de utilizá-lo?
13. Há quanto tempo você usa probióticos na sua propriedade?

3. Saúde dos Animais e Doenças

14. Quais são os tipos mais frequentes de doenças observadas nos camarões cultivados?
15. Com que frequência você observa sintomas clínicos dessas doenças nos seus animais?
16. Durante o último ciclo de cultivo, você utilizou probióticos para:
 - () Prevenção de doenças
 - () Tratamento de doenças
 - () Ambos
17. Alguma mudança na sobrevivência ou produtividade foi percebida após o uso de probióticos?

4. Monitoramento da Qualidade da Água

18. Você realiza monitoramento regular da qualidade da água?
 - () Sim
 - () Não

19. Quais parâmetros de qualidade da água você monitora regularmente (como pH, oxigênio dissolvido, amônia, nitrito, entre outros)?
20. Alguma ação específica foi adotada para controlar a qualidade da água após o surgimento de doenças?

5. Metodologias e Manejo

21. Você segue as indicações do fabricante para o uso do probiótico?
22. Como é feita a ativação do probiótico antes da aplicação?
23. Em quais etapas do cultivo você utiliza os probióticos (berçário, engorda, outras)?
24. Com que frequência os probióticos são aplicados no cultivo?

6. Resultados e Desempenho

25. Depois que começou a utilizar probióticos, você observou melhorias no cultivo? Quais?
26. Quais benefícios você já percebeu com o uso de probióticos (crescimento, sobrevivência, qualidade de água, outros)?
27. Você já enfrentou problemas ou dificuldades com o uso de probióticos? Se sim, quais?

7. Conhecimento Técnico e Preferências

28. Você já recebeu treinamento ou orientação técnica sobre o uso de probióticos?
29. Você compreende o modo de ação dos probióticos utilizados?
30. Você realiza análises ou testes para verificar a eficácia dos produtos usados?
31. Existe alguma marca ou tipo de probiótico que você prefere? Por quê?
32. Quais características você considera importantes em um bom probiótico?
33. Quais melhorias você gostaria de ver nos probióticos disponíveis no mercado?

8. Considerações Finais

34. Existe alguma outra informação ou opinião que você gostaria de compartilhar sobre o uso de probióticos no cultivo?
35. Você estaria disposto a realizar novos testes ou adotar novas práticas no manejo de probióticos?

**APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)**

Você está sendo convidado a participar, como voluntário (a) da pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO USO E MANEJO DE PROBIÓTICOS COMERCIAIS SOBRE O DESEMPENHO DE PRODUÇÃO NA AQUICULTURA” conduzida pela discente do Programa de Pós-graduação em Ciências marinhas tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, Danyela Carla Elias Soares, sob orientação da Profa Dra Oscarina Viana de Sousa. Este estudo tem por objetivo avaliar se diferentes técnicas de manejo e uso dos probióticos em fazendas comerciais de aquicultura influenciam na eficiência do resultado dos mesmos. Você foi selecionado por ser uma pessoa atuante nessa área, operando como produtor ou técnico em fazendas de produção comercial de camarões ou peixes. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento, você poderá desistir de participar ou retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada de consentimento não acarretará prejuízo. Sua participação não é remunerada nem implicará em gastos. Sua participação nesta pesquisa consistirá em dados importantes para verificar a eficácia do uso de probióticos e os benefícios de sua utilização. Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação. O pesquisador responsável se compromete a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação de indivíduos ou instituições participantes. Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento, que possui duas vias, sendo uma delas sua, e a outra, do pesquisador responsável. Seguem os telefones e o endereço institucional do pesquisador responsável e do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC, onde você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação nele.

Dados do pesquisador responsável -

Nome - Danyela Carla Elias Soares

Instituição - Laboratório de microbiologia ambiental e do pescado - LAMAP

Endereço - Av. da Abolição, 3207 – Bairro - Meireles, 60165081 – Ramal 7027

Telefones para contato - email - dany.ces@hotmail.com

(84) 987011333/ (84) 996790121

ATENÇÃO - Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone - 3366-8346/44. (Horário - 08 - 00-12 - 00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

_____, ____anos, RG - _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante dessa pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, _____, _____, _____

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO USO E MANEJO DE PROBIÓTICOS COMERCIAIS SOBRE O DESEMPENHO DE PRODUÇÃO NA AQUICULTURA

Pesquisador: DANYELA CARLA ELIAS SOARES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 15133819.6.0000.5054

Instituição Proponente: Instituto de Ciências do Mar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.428.302

Apresentação do Projeto:

Probióticos são suplementos microbianos vivos que tenham efeito benéfico para o hospedeiro ou para o ambiente de cultivo e tem sido relacionado com a busca de uma aquicultura ambientalmente amigável. Nesse estudo serão realizadas entrevistas de caráter exploratório descritivo com abordagem qualitativa por meio da aplicação de um questionário aberto junto a 45 produtores da região semiárida no nordeste brasileiro desde o litoral leste do Ceará até a região oeste do Rio Grande do Norte, e que possuam influência significativa no processo decisório sobre a utilização do produto em questão.

aos produtores de aquicultura na região semiárida no nordeste brasileiro desde o litoral leste do Ceará até a região oeste do Rio Grande do Norte

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar as diferenças entre os diferentes probióticos, através do uso de probióticos comerciais de diferentes composições, sobre o potencial zootécnico, qualidade da água e resistência a doenças de *Litopenaeus vannamei* cultivadas em escala comercial para identificar se os diferentes probióticos utilizados atuam de acordo com as especificações indicadas.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: PORTALEZA

Telefone: (85)3366-4344

E-mail: comcep@ufc.br