



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAROLINA KROPNICZKI GOUVEIA

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* COM
POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO NA CARCINICULTURA**

Recife

2018

CAROLINA KROPNICZKI GOUVEIA

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* COM
POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO NA CARCINICULTURA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^o Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadores: Prof^a Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

Dr. José de Paula Oliveira

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/1728)

Gouveia, Carolina Kropniczki

Seleção e avaliação de bactérias do gênero *Bacillus* com potencial probiótico para uso na carcinicultura / Carolina Kropniczki Gouveia-2018.

165 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadores: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva e José de Paula Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndice e anexos

1. *Bacillus* 2. Probiótico 3. Camarão I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da (coorient.) III. Oliveira, José de Paula (coorient.) IV. Título

579.362

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-451

CAROLINA KROPNICZKI GOUVEIA

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* COM
POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO NA CARCINICULTURA**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Dr. Thiago Barbosa Cahú (Membro Externo – Titular)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Dr. Janilson Felix da Silva (Membro Externo – Titular)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (Membro Externo – Titular)
Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UFRPE

Profa. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva (Membro Externo – Titular)
Departamento de Pesca – UFRPE

A todos envolvidos nesse amadurecimento,
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Doutorado. Ao CNPq e FINEP, pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Dr. Ranilson de Souza Bezerra, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pela confiança depositada em mim e pelo exemplo profissional que representa.

Ao Dr. José de Paula Oliveira pela co-orientação, presteza, amizade e contribuições prestadas durante todo o trabalho, e ao Coordenador Geral da RECARCINA, Dr. Lourinaldo Cavalcanti, por toda atenção dedicada ao desenvolvimento do trabalho. À Dra. Márcia Barreto, pelos conselhos.

À minha co-orientadora, Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, um agradecimento especial, por ter aberto as portas do seu laboratório e ter tornado possível a realização do experimento, sem deixar de agradecer a sua atenção e presteza para com a minha tese e minhas dúvidas ao longo dessa caminhada.

Agradeço à Deus, por todas as bênçãos que recebi em minha vida. Aos meus pais, Gerson Gouveia e Edna Kropniczki, cujos ensinamentos e sábios conselhos foram essenciais para minha vida pessoal e profissional. À minha irmã Catharina Kropniczki, pelo carinho e amizade e, ao meu sobrinho, Davi Kropniczki pelos momentos de descontração. Agradeço a todos os meus familiares que sempre torceram por mim e estiveram ao meu lado.

À toda equipe do IPA, pelo acolhimento nesta grande família. Em especial, aos que fazem parte do Laboratório de Biologia do Solo e do Laboratório de Genoma. Agradeço imensamente a Alexandra Andrade, Aníbia Vicente, Eric Xavier, Jadson Emanuel, Josemir Junior, Luíza Bastos, Maria do Carmo Barreto, Marilene Cecília, Mário Leandro, Rogério Portela, Vanda Ribeiro e Vanilda Baiana por toda ajuda, companhia, carinho, momentos de descontração e ensinamentos durante toda minha fase do doutorado. Em especial a Josemir Júnior, Maria do Carmo, Alexandra e Vanda, por terem colocado a “mão na massa” nos testes realizados neste trabalho. À Clébia Almeida, pela ajuda e apoio na etapa de identificação molecular de microrganismos.

Aos membros do Laboratório de Enzimologia (LABENZ): Amália Medeiros, Claudia Nascimento, Cybelle Marques, Danielli Matias, Douglas Holanda, Flávia Thuane, Helane Costa, Janilson Felix, Juliana Interaminense, Karollina Lopes, Lidiane Cristina, Marina Marcuschi, Nathália Albuquerque, Raquel Pereira, Renata França, Renata Nascimento, Robson Coelho e Thiago Cahú pelo agradável convívio e permuta de conhecimentos.

Aos membros do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq): Allyne Lins, Álvaro Cirino, Ana Karolina, Aurino, Elizabeth Santos, Gisely Carla, Maria Carolina, Slayton Glason, Suzane Varela e Yago Vilarim.

Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que, nessa longa jornada, demonstraram toda dedicação ao ensino.

À secretária do Programa de Pós-graduação do CCB, Adenilda Eugênia, pelos grandes favores prestados e pela amizade. Ao técnico Marcelo, por toda atenção.

Aos amigos, Adrienne Bertolotti, Amanda Barreto, Ana Luna Freire, Antônio Cordeiro, Armando Araújo, Claudia Csillaz, Danilo Beltrão, Danilo Braga, Dirceu Sá, Fernanda Botelho, Greice Santos, Karolline Chaves, Luciana Pestana, Mariana Marzullo, Rafael Alves, Raissa Ferraz, Rodrigo Csillaz e Teresa Leal, pelo companheirismo e incentivo para o término do Doutorado.

À todos que, de alguma forma, contribuíram nesta etapa importante da minha vida, deixo o meu muito obrigada. Uma das coisas que aprendi foi que acasos e coincidências não existem, o que há de verdade são momentos e relações, únicos por excelência, que contribuíram de alguma forma, cada um, para que eu me tornasse o que sou hoje.

RESUMO

O sistema sustentável de cultivo moderno se baseia no estímulo da produção natural, traduzida em bioflocos ou aglomerados microbianos que se formam na água, e no controle microbiológico pela adição à dieta ou diretamente na água de bactérias probióticas. Bactérias do gênero *Bacillus* são as mais empregadas para este propósito na carcinicultura e se destacam pela elevada produção enzimática de poder inibitório a outros microrganismos, pela capacidade de competição por nutrientes e área de adesão, pela participação nos estímulos imunes e pela contribuição no aumento do balanço microbiano intestinal através da permanência nesta região. Na presente tese, os resultados obtidos foram apresentados em três capítulos: no primeiro, o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* foi cultivado em sistema de bioflocos e foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de fonte de carbono para atingir quatro relações C:N distintas (15:1, 20:1, 25:1 e 30:1) na qualidade da água de cultivo, desempenho do animal e nas concentrações de bactérias heterotróficas, quimioautotróficas e de bactérias do gênero *Vibrio*; deste estudo, foram tomados camarões saudáveis para o isolamento de bactérias presentes no hepatopâncreas e estômago para seleção *in vitro* de possíveis bactérias probióticas a serem usadas no segundo capítulo. No segundo capítulo, a caracterização morfo-fisiológica, bioquímica e molecular destas cepas selecionadas foi realizada e a avaliação através de excreção das enzimas digestivas protease, amilase e lipase, da atividade antagonista contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* e *Pseudomonas aeruginosa* e da formação de biofilme. No terceiro capítulo, duas cepas (IPA 58 e IPA 239) que se mostraram efetivas para as atividades enzimáticas e antagonistas aos patógenos selecionados no segundo capítulo foram ofertadas para pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* durante cultivo experimental por 30 dias, sendo avaliada a capacidade de modificação da microbiota de hepatopâncreas e intestino do animal, pela quantificação de bactérias totais, *Bacillus* spp. e *Vibrios* spp. De uma coleção heterogênea isolada de 107 isolados bacterianos do hepatopâncreas e estômago de *Litopenaeus vannamei*, apenas 20 foram positivos para as atividades de enzimas digestivas que funcionou como teste de seleção inicial e foram identificadas bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Shewanella*. As cepas *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 24, *B. subtilis* IPA 56, *Bacillus* sp. IPA 58, *B. pumilus* IPA 122 e *B. amyloliquefaciens* IPA 239 competem por substrato e produzem biofilme, apesar de apresentarem baixo padrão de sinergismo. Durante o experimento, IPA 58 manteve a característica de modificar a microbiota do camarão e ser mais eficiente na aderência tanto do hepatopâncreas quanto do intestino, compatibilizando com os resultados de produção de

biofilme; IPA 239 atuou como biocontrole, minimizando a presença de vibrios na água e no animal, foi eficiente na melhoria dos parâmetros de desempenho de PL de *M. rosenbergii*, além de ser uma espécie recente como probiótico na carcinicultura. Por fim, as cepas de *Bacillus* sp. IPA 58 e *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 239 podem ser utilizadas como probiótico em cultivo de PL de *M. rosenbergii* pela modificação e permanência na microbiota do hepatopâncreas e intestino do camarão no período avaliado, e promoção do crescimento do animal.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*. *Macrobrachium rosenbergii*. *Bacillus*. Probiótico. Camarão.

ABSTRACT

Modern farming systems are based on the stimulation of natural production, composed of bioflocs, microbial agglomerates that form in the water, and microbiological control by the addition of probiotic bacteria in the diet or directly on the water. Bacteria of the genus *Bacillus* are the most used for this purpose in shrimp farming, and are notable for the high enzymatic production of inhibitory potency to other microorganisms, the ability to compete for nutrients and adhesion area, their participation as immunological stimulants and their contribution in increasing intestinal microbial balance through the colonization in this region. Thus, the results obtained during the PhD course are presented in three chapters: in the first, the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* was cultivated in a biofloc system and evaluated the effect of the addition of different concentrations of carbon source to reach four C:N rations (15:1, 20:1, 25:1 and 30:1) in the quality of culture water, performance of the animal and in concentrations of heterotrophic, chemoautotrophic bacteria and bacteria of the genus *Vibrio*; from this study, healthy shrimp were taken for the isolation of bacteria present in the hepatopancreas and stomach for *in vitro* selection of possible probiotic bacteria. In the second chapter, the morpho-physiological, biochemical and molecular characterization of selected strains and the production of protease, amylase and lipase digestive enzymes and the antagonistic activity against *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus* and *Pseudomonas aeruginosa* and the biofilm formation. In the third chapter, two strains (IPA58 and IPA239) that represented effective values for enzymatic activity and antagonistic against selected pathogens from the second chapter were offered to juveniles of *Macrobrachium rosenbergii* during experimental cultivation by 30 days and the capacity of modification of the hepatopancreas and intestine microbiota of the animal was evaluated through the quantification of total bacteria, *Bacillus* spp. and *Vibrio* spp. From a heterogeneous collection of 107 bacterial isolates from the hepatopancreas and stomach of *L. vannamei*, only 20 were positive for the activities of hydrolytic enzymes that functioned as initial screening test and bacteria of the genera *Bacillus* and *Shewanella* were identified. The strains *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 24, *B. subtilis* IPA 56, *Bacillus* sp. IPA 58, *B. pumilus* IPA 122 and *B. amyloliquefaciens* IPA 239 compete for substrate and are able to produce biofilm, despite present low prevalence of synergy. During the experiment, IPA 58 maintained the characteristic of modifying the shrimp microbiota and being more efficient in the adhesion of both the hepatopancreas and the intestine compatibilizing with results of biofilm production; IPA 239 acted as a biocontrol, minimizing the presence of *Vibrio* in water and in the animal,

was efficient in improving the performance parameters of PL of *M. rosenbergii*, besides being a recent species as a probiotic in shrimp farming. Finally, the strains of *Bacillus* sp. IPA 58 and *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 239 may be used as probiotic for *M. rosenbergii* post-larvae due to the modification and establishment of hepatopancreas and intestine microbiota in the test period, besides the improvement in animal growth.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*. *Macrobrachium rosenbergii*. *Bacillus*. Probiotic. Shrimp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 -	Evolução da produção e área cultivada do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> no Nordeste brasileiro, entre 2000 e 2015.....	21
Figura 2 -	Desenho esquemático de definição de probiótico.....	26
Figura 3 -	Modo de ação dos probióticos no trato gastrintestinal dos animais.....	30

Capítulo I

Figura 1 -	Variação de contagem (UFC/mL) de a) Bactéria Heterotrófica Total (BHT), b) Bactéria Autotrófica Total (BAT) e c) <i>Vibrio</i> spp. na água de cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> utilizando sistema de bioflocos em diferentes relações carbono/nitrogênio e durante 31, 44 e 53 dias. Pontos dos dados simbolizam as médias ($\pm$ erro padrão).....	56
------------	---	----

Capítulo II

Figura 1 -	Formação de biofilme de cinco cepas selecionadas em monocultura e cocultura. Biofilme formado pelos isolados IPA 24 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>), IPA 56 (<i>Bacillus subtilis</i>), IPA 58 (<i>Bacillus</i> sp.), IPA 122 (<i>Bacillus pumilus</i>) e IPA 239 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subs. <i>amyloliquefaciens</i>) quando alíquotas iguais das culturas diluídas foram incubadas em coculturas de dois, três, quatro e cinco isolados. Ensaio para detecção de efeito sinérgico foram realizados com seis réplicas. Barras representam as médias ($\pm$ erro padrão) de seis réplicas..	98
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 -	Médias ($\pm$ erro padrão) das variáveis de qualidade de água, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH, salinidade (g/L), transparência (cm), nitrito ($\text{NO}_2 \text{ mg.L}^{-1}$), nitrato ($\text{NO}_3 \text{ mg.L}^{-1}$), sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}), amônia (TAN mg.L^{-1}) e alcalinidade ($\text{mg de CaCO}_3.\text{L}^{-1}$) do cultivo do camarão <i>L. vannamei</i> em diferentes relações carbono/nitrogênio 15:1 (15M), 20:1 (20M), 25:1 (25M) e 30:1 (30M)..	53
Tabela 2 -	Médias ($\pm$ erro padrão) para parâmetros de cultivo de <i>L. vannamei</i> em diferentes relações carbono/nitrogênio: peso inicial, peso final, taxa de crescimento específico (TCE), ganho de peso, sobrevivência, ganho de biomassa e produção.....	54
Tabela 3 -	Valores das médias ($\pm$ erro padrão) de contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT), bactérias autotróficas (BAT) e <i>Vibrio</i> spp. (TCBS) em amostras de água de cultivo de <i>L. vannamei</i>	55

Capítulo II

Tabela 1 -	Valores das médias ($\pm$ erro padrão) para atividades semiquantitativas de protease e amilase de cepas bacterianas isoladas do hepatopâncreas e estômago de <i>L. vannamei</i> de acordo com Diâmetro da Colônia (DC), Diâmetro do Halo de Degradação (DHD) e Índice Enzimático (IE).....	90
Tabela 2 -	Identidade da microbiota isolada de hepatopâncreas e estômago de <i>L. vannamei</i> com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa BLAST no <i>GenBank</i>	92
Tabela 3 -	Caracterizações morfológica e fisiológica de cepas bacterianas: forma, borda, superfície, transparência, cor, elevação, Gram, tamanho, tempo de crescimento, formação de muco e alteração no meio.....	94
Tabela 4 -	Determinações fisiológicas e/ou bioquímicas de cepas de <i>Bacillus</i> isoladas de hepatopâncreas e estômago de <i>L. vannamei</i>	96

Capítulo III

Tabela 1 -	Valores das médias ($\pm$ desvio padrão) das variáveis de qualidade de água, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), alcalinidade ($\text{mg de CaCO}_3.\text{L}^{-1}$), dureza ($\text{mg de Ca e Mg.L}^{-1}$), amônia total (NH_3
------------	--

	mg. L ⁻¹) e nitrito (NO ₂ mg. L ⁻¹).....	125
Tabela 2 -	Valores das médias (± erro padrão) e média de todos os tempos (dias) de contagem em meio TCBS de amostras de água durante o cultivo de <i>M. rosenbergii</i> , durante 7, 15, 22 e 30 dias nos diferentes tratamentos: PROB, IPA 58 (<i>Bacillus</i> sp.), IPA 239 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) e IPA 58+239.....	126
Tabela 3 -	Valores das médias (± erro padrão) de contagem nos meios AM, MYP e TCBS de amostras de hepatopâncreas de <i>M. rosenbergii</i> durante 15 e 30 dias de cultivo nos diferentes tratamentos: PROB, IPA 58 (<i>Bacillus</i> sp.), IPA 239 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) e IPA 58+239.....	127
Tabela 4 -	Valores das médias (± erro padrão) de contagem nos meios AM, MYP e TCBS de amostras de intestino de <i>M. rosenbergii</i> durante 15 e 30 dias de cultivo nos diferentes tratamentos: PROB, IPA 58 (<i>Bacillus</i> sp.), IPA 239 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) e IPA 58+239.....	128
Tabela 5 -	Valores das médias (± desvio padrão) para os parâmetros de cultivo: sobrevivência, peso médio final, ganho de biomassa, taxa de crescimento específico (TCE), taxa de crescimento semanal (TCS), fator de conversão alimentar (FCA) e produtividade.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
BLAST	sigla em inglês para Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais
CAS	Cromo Azurol S
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EDTA	Etileno diamino tetracético
FAO	sigla em inglês para Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentos
HDTMA	sigla em inglês para Brometo hexadeciltrimetilamonio
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IE	Índice Enzimático
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NCBI	sigla em inglês para Centro Nacional de Informação Biotecnológica
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
rRNA	RNA ribossomal
Taq	Enzima extraída da bactéria <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Solução tampão contendo Tris, ácido Bórico e EDTA
TE	Solução tampão de Tris-HCl e EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Geral.....	17
1.1.2	Específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	CARCINICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA.....	19
2.2	DOENÇAS BACTERIANAS EM ANIMAIS CULTIVADOS E O USO DE ANTIBIÓTICOS.....	23
2.3	PROBIÓTICO.....	25
2.4	MÉTODOS PARA ISOLAR E SELECIONAR CEPAS COM POTENCIAL PARA PROBIÓTICOS.....	26
2.5	BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA CARCINICULTURA E O GÊNERO <i>Bacillus</i>	27
2.6	MECANISMOS DE AÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	29
2.6.1	Equilíbrio da microflora benéfica intestinal.....	30
2.6.2	Melhoria da digestibilidade da dieta.....	31
2.6.2.1	Enzimas digestivas.....	32
2.6.3	Imunoestimulação e resistência à infecção por patógenos bacterianos e virais.....	34
2.6.4	Melhoria nos parâmetros de cultivo.....	35
3	EFEITO DE DIFERENTES RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO NA QUALIDADE DE ÁGUA, DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E COMUNIDADE BACTERIANA EM CULTIVO INTENSIVO DE <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i> (BOONE, 1931) EM BFT.....	37
4	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DA MICROBIOTA DE <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i> E AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> COMO PROBIÓTICO.....	58
5	AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>Bacillus</i> NO CULTIVO DE PÓS-LARVAS DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (DE MAN, 1879).....	99

CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICE A - PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS.....	145
ANEXO A - MATERIAL ADICIONAL/DADOS COMPLEMENTARES.....	146
ANEXO B - GUIA PARA AUTORES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS AO PERIÓDICO INTERNACIONAL “AQUACULTURE”.....	147
ANEXO C - PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL.....	165

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a carcinicultura é praticada em mais de 50 países do mundo, com maior destaque para os países asiáticos como China, Índia, Tailândia, Vietnã e Indonésia (FAO, 2014). Dentre os países com maior potencial para a aquicultura, o Brasil tem se desenvolvendo (MPA, 2013), em especial, a região Nordeste, no caso do cultivo de camarões, devido à grande extensão de costa marinha, as condições climáticas favoráveis ao cultivo, a disponibilidade de mão de obra, a localização estratégica para escoamento da produção para o Cone Sul, Europa e EUA e a demanda crescente (VIDAL; XIMENES, 2016). Porém, apesar da rápida expansão, o surgimento de doenças tem causado prejuízos significantes ao setor produtivo.

O uso de sistemas intensivos no cultivo de organismos aquáticos, como peixes e camarões, que utilizam densidades de estocagem e níveis de fornecimento elevados de ração, contribui para a redução da qualidade da água, prejudicando o desempenho do cultivo pelo processo de eutrofização, elevação dos compostos tóxicos nitrogenados e surtos de doenças causadas por bactérias e vírios. Esses patógenos podem ocasionar perdas no cultivo devido à morte dos animais, além de elevar os custos durante a produção devido aos gastos com tratamentos (MAGNOTTI, 2011).

As doenças que acometem os camarões marinhos podem ser causadas por diversos tipos de microrganismos (QUIAO et al., 2015), no entanto, os principais agentes causadores de bacterioses são provocados por algumas espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*. Como uma estratégia no controle de doenças, o uso de bactérias benéficas (probióticos) tem despertado interesse na aquicultura para prevenção de doenças e incremento da resistência a patógenos (QUIAO et al., 2015). Probióticos são definidos como microrganismos que estimulam o crescimento de outros organismos trazendo contribuições nutricionais e para a saúde do hospedeiro, podendo agir na região intestinal competindo por nutrientes e por espaço (ZHANG et al., 2011), resultando no equilíbrio da microflora benéfica e na redução da concentração de bactérias patogênicas.

Um sistema que tem demonstrado resultados promissores é atualmente conhecido como Sistema de Bioflocos ou BFT (*Biofloc Technology*). Neste tipo de sistema, através do controle dos microrganismos presentes, via relação de C:N específica, é possível reciclar os compostos nitrogenados em proteína microbiana, que serve como fonte de alimento, além de

manter a qualidade de água dentro dos limites recomendados para a produção dos crustáceos (FERREIRA et al., 2015). Além disso, tendo em vista a melhora do controle dos microrganismos presentes neste tipo de sistema, tem-se adotado a estratégia de adição de microrganismos probióticos (QUIAO et al., 2015). O isolamento de microrganismos do próprio animal cultivado é de grande importância já que bactérias benéficas são acostumadas a suportar condições extremas no trato digestivo e facilmente se aderem e colonizam células epiteliais do intestino (CAIPANG et al., 2011).

Entre as bactérias de interesse testadas para a utilização como probióticos na carcinicultura e em formulações comerciais, as espécies do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas como probióticos na carcinicultura (VIEIRA, 2010). Destacam-se por apresentar características como a capacidade de controlar a proliferação de patógenos como *Vibrio* spp., através da produção enzimática de poder inibitório a outros microrganismos, capacidade de competição por nutrientes e área de adesão, efeito no sistema imune e aumento do balanço microbiano intestinal através da permanência nessa região (XUE et al., 2016). Dentro do gênero *Bacillus*, a espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, vem despertando interesse na comunidade científica por produzir várias enzimas extracelulares, incluindo amilases, celulase e proteases. Essas enzimas aumentam a digestibilidade e a absorção de nutrientes além da função imunológica geral do intestino e tem apresentado efeito benéfico como probiótico na utilização em dieta de peixes (REDA et al., 2014; THY et al., 2017). No entanto, há uma escassez de estudos sobre seu uso na carcinicultura marinha.

Este trabalho teve por objetivo selecionar bactérias do gênero *Bacillus* potencialmente probióticas do trato digestivo de *Litopenaeus vannamei* cultivados em diferentes relações carbono/nitrogênio, e viabilizar em cultivos experimentais a fim de validação de possível produto probiótico para a carcinicultura.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Isolar e avaliar bactérias candidatas a probiótico do gênero *Bacillus* presentes em cultivos heterotróficos com o camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

1.1.2 Específicos

- Analisar o efeito de diferentes relações carbono/nitrogênio sobre a qualidade da água, desempenho zootécnico e concentração de bactérias heterotróficas, quimioautotróficas e *Vibrio* spp. presentes em cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos;
- Isolar e caracterizar cepas bacterianas candidatas a probiótico do hepatopâncreas e do estômago de *L. vannamei* cultivados em diferentes relações C:N usadas em sistemas de bioflocos;
- Avaliar o efeito da adição de cepas candidatas a probiótico na dieta de pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARCINICULTURA MUNDIAL E BRASILEIRA

A era moderna da carcinicultura surgiu na década de 1930, quando no Japão, o Dr. Motosaku Fuginaga alcançou a desova da espécie *Penaeus japonicus* em condições controladas, permitindo a produção comercial de pós-larvas em grande escala (CARVALHO et al, 2005). Na década de 1970, houve a propagação das técnicas de cultivo em países de regiões tropicais e subtropicais. A partir de então, a carcinicultura marinha começou a ganhar uma posição importante no cenário internacional. Nos anos 1980, com uma crescente demanda e valor econômico em ascensão, a produção de camarões em cativeiro evoluiu rapidamente (ABRUNHOSA, 2011).

Em 2013, alguns países da Ásia e da América Latina, experimentaram um declínio nas exportações, devido a problemas relacionados a enfermidades que reduziram a produção do camarão cultivado, entre estas, a Síndrome da Morte Súbita, o Vírus da Mionecrose Infecciosa e o Vírus da Síndrome da Mancha Branca. Esta redução de abastecimento causou uma elevação nos preços do produto em todo o mundo, afetando o consumo nos mercados tradicionais desenvolvidos, como a União Européia, Estados Unidos e Japão (FAO, 2014).

A carcinicultura marinha no Brasil iniciou na década de 1970, baseando-se inicialmente em modelos importados do Equador, Panamá e dos Estados Unidos, cujas validações e intenso aprimoramento interno, resultaram na definição de uma tecnologia apropriada e adequada à realidade nacional (ROCHA, 2011). Seu histórico encontra-se dividido em três fases:

A primeira fase datada do início da década de 1970 é caracterizada pela criação do “Projeto Camarão” pelo Governo do Rio Grande do Norte com o intuito de substituir a extração de sal, que estava em crise. Este estado realizou os primeiros experimentos com a espécie exótica, *Marsupenaeus japonicus* e, logo em seguida, com as espécies nativas *Farfantepenaeus subtilis*, *F. brasiliensis* e *Litopenaeus schmitti*. Naquela época, o estado de Santa Catarina também desenvolvia pesquisas de reprodução, larvicultura e engorda do camarão cultivado, obtendo as primeiras pós-larvas em laboratório da América Latina (ABRUNHOSA, 2011).

A partir de 1984, com o encerramento do prolongado período seco, a ocorrência de chuvas intensas e variações de salinidade nas águas estuarinas, ficaram evidenciadas as intransponíveis dificuldades para assegurar a maturação, reprodução e sobrevivência do

camarão *M. japonicus* em ambiente tropical, sendo sua viabilidade descartada em 1985/1986 (ABRUNHOSA, 2011).

No ano de 1993, outra espécie exótica surgiu para alavancar a carcinicultura no país, o camarão *Litopenaeus vannamei*, capaz de suportar as variações de temperatura e salinidade brasileiras (ABCC, 2016). Também conhecida como camarão branco do Pacífico, esta espécie é endêmica do oceano Pacífico, sendo encontrada de Sonora (México) até Thumbes (Norte do Peru). Com preferência por fundos lamosos, a espécie pode habitar desde a região do infralitoral até profundidades de 72 metros. Na natureza, pode chegar a 23 cm de comprimento e apresenta hábito alimentar onívoro. Apesar de exótica, conseguiu se adaptar totalmente às condições ambientais de cultivo. Devido a fatores tais como rápido crescimento, altas taxas de produtividade e rentabilidade, reprodução em cativeiro e rusticidade unidos à facilidade de nutrição e manejo nas mais diversas condições, que fizeram do *L. vannamei*, a espécie mais cultivada no Brasil e no mundo (SANTOS et al., 2009).

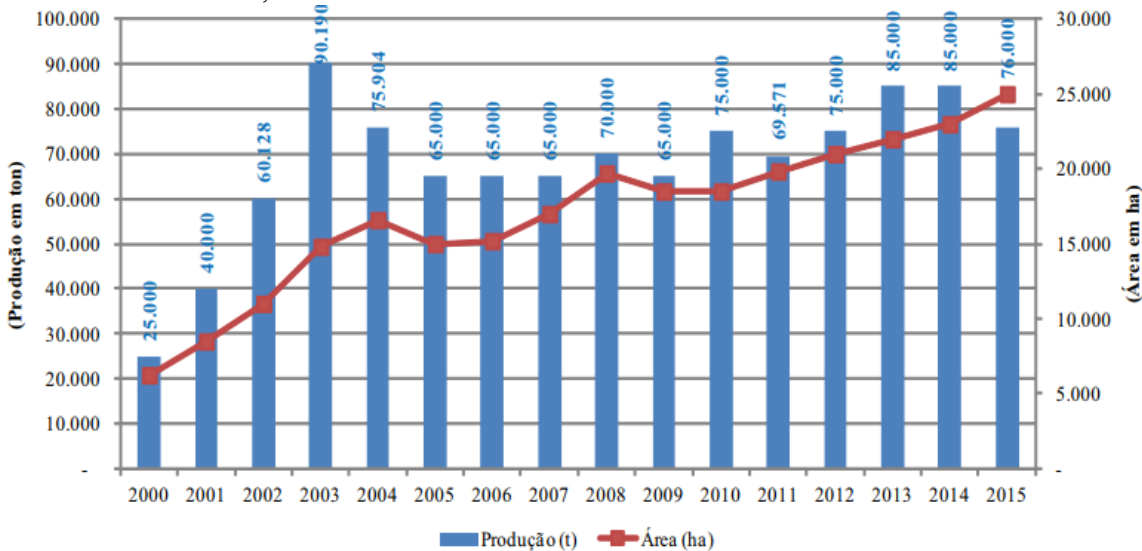
Na segunda fase, com início em 1995, houve a consolidação do *L. vannamei* devido a produção comercial de pós-larvas em laboratórios. Segundo Vidal e Ximenes (2016), entre 1999 e 2003, a atividade no Brasil crescia mais de 14 mil toneladas/ano, chegando a produzir 90 mil toneladas em 2003. Nesse período, o principal destino da produção brasileira era o mercado externo, com exportações de 58.455 t e US\$ 226 milhões de dólares. A produtividade deu um salto de 1.015 Kg/ha/ano para 6.084 Kg/ha/ano, colocando o país na condição de líder mundial no quesito produtividade, no ano de 2003. (ROCHA, 2011).

A partir de 2004, inicia-se a terceira fase, quando um conjunto de fatores afetou a atividade, caracterizando-se pela redução da produção de camarão no país (ABRUNHOSA, 2011). Neste período, houve uma ação *antidumping* imposta pelos Estados Unidos contra o camarão brasileiro e uma forte desvalorização do dólar americano, além de surtos de doenças virais (ABRUNHOSA, 2011).

Em virtude das condições climáticas favoráveis ao cultivo, o Nordeste brasileiro é o maior produtor nacional de camarão, com 88,6% do total de fazendas e 90,6% da produção nacional (ABCC, 2016), sendo o maior polo da carcinicultura, representado exclusivamente pelo *L. vannamei*, onde o Estado do Ceará é o principal produtor (42 mil toneladas), seguido do Rio Grande do Norte (KUBITZA, 2015).

Embora o setor tenha alcançado bom nível de estruturação, os entraves burocráticos têm dificultado o acesso ao crédito e, por conseguinte, retardado o crescimento do setor. Segundo a ABCC (2016), a produção de camarão em 2015 no Nordeste foi equivalente à produção de 2004 (76 mil toneladas) (Figura 1).

Figura 1 - Evolução da produção e área cultivada do camarão *Litopenaeus vannamei* no Nordeste brasileiro, entre 2000 e 2015.



Fonte: ABCC (2016).

Nas décadas de 80 e 90, as doenças tiveram um efeito devastador no cultivo de camarão marinho, causando um colapso na produção de grandes países produtores e grande impacto econômico na indústria (HERNANDEZ; NUNES, 2001). A partir de então, as enfermidades passaram a ser vistas como um obstáculo econômico e uma ameaça à viabilidade da atividade. Atualmente, a carcinicultura tem enfrentado doenças mais graves, que tem arrasado as criações no Brasil e mundo (LIGHTNER, 2012).

A aquicultura está embasada na produção lucrativa, na preservação do meio ambiente e no desenvolvimento social. A criação de camarões de água doce é uma atividade considerada de baixo impacto ambiental e alguns aspectos positivos estão relacionados à sua produção, como: menor suscetibilidade a doenças em comparação com camarões marinhos, a produção pode ser realizada em locais afastados da zona costeira, evitando conflitos de utilização de áreas, maior facilidade na manutenção de reprodutores e produção de pós-larvas, a produção pode ser realizada tanto em pequena quanto em larga escala, possibilitando a inclusão de comunidades de baixa renda na atividade e existe ainda a possibilidade de inclusão em sistemas de policultivo e cultivo consorciado com a agricultura (VALENTI, 2002).

Um sistema que tem demonstrado resultados promissores em termos de produtividade e sustentabilidade é atualmente conhecido como Sistema de Bioflocos (*Biofloc Technology System* – BFT) e é utilizado tanto para camarões de água doce quanto de água salgada. O princípio básico deste sistema é através do controle dos microrganismos presentes, sendo possível reciclar os compostos nitrogenados tóxicos em proteína microbiana que serve como fonte de alimento, além de manter a qualidade de água dentro dos limites recomendados para

a produção dos crustáceos (FERREIRA et al., 2015). Esse sistema de cultivo de camarão super-intensivo funciona estimulando a produção natural e tem surgido como alternativa para aumentar a produtividade, reduzindo os custos com captação e renovação de água, bem como a eliminação constante de efluentes para os ambientes adjacentes. Teve essa denominação devido à aparência de flocos dos aglomerados microbianos que se formam na água do cultivo (CRAB et al., 2010).

Os bioflocos constituem os sólidos em suspensão que permanecem distribuídos em toda a coluna de água de acordo com a dinâmica causada pela aeração. Essas partículas agregadas distinguem os sistemas de cultivo intensivo dos ambientes naturais pela grande quantidade de carbono orgânico particulado distribuído entre diferentes taxa de microrganismos (RAY et al., 2010). O carbono orgânico é empregado como fonte de nitrogênio e energia por bactérias heterotróficas presentes na água do cultivo, que assimilam a amônia ionizada como fonte de biomassa bacteriana que crescem como bioflocos (EBELING et al., 2006); além disso, o carbono orgânico possibilita o controle dos compostos nitrogenados tóxicos, como amônia e nitrito, provenientes da excreção dos animais e da decomposição da matéria orgânica.

Uma das estratégias para a formação de bioflocos é estimular o crescimento e o metabolismo das bactérias heterotróficas pela adição de fontes de carbono orgânico (C), equilibrando este substrato com o nitrogênio amônio total (N) através da relação C:N (AVNIMELECH, 1999). Pode-se dizer que os bioflocos podem ser divididos em duas fases cronológicas: na primeira predominam bactérias heterotróficas e na segunda, bactérias quimioautotróficas. Geralmente, o surgimento das bactérias autotróficas acontece entre 15-22 dias após o início da fertilização orgânica da água (AVNIMELECH, 2012). Entretanto, as vias heterotróficas e autotróficas de controle da amônia na água do cultivo não são excludentes e podem estar presentes simultaneamente ao longo de todo cultivo.

O bioflocos contém aglomerados de bactérias, além de microalgas, protistas, nematódeos e outros pequenos animais, exoesqueletos, fezes de camarões e restos de ração (BURFORD et al., 2003). São constituídos pela adição de uma fonte externa de carbono orgânico (melaço, farinhas, açúcar, dextrose, etc) na água rica em compostos nitrogenados, com suprimento de aeração para oxigenação, movimentação e mistura (DE SCHRYVER et al., 2008). Segundo Xu e Pan (2013), o crescimento das bactérias heterotróficas é favorecido pela manutenção da relação carbono/nitrogênio (C:N) na água acima de 10:1.

O bioflocos contendo bactérias probióticas pode atuar no cultivo favorecendo no incremento das taxas de crescimento e digestão, além de atuar no fortalecimento do sistema imunológico e na maioria das vezes não atua apenas em favor do animal cultivado, mas

também podem promover o desenvolvimento de várias outras espécies que são comuns no sistema heterotrófico como *Artemia*, *Chaetoceros* spp., *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum* e *Brachionus plicatilis* contribuindo no aumento da oferta de alimento no sistema (PURIVIROJKUL, 2013).

A manipulação de bactérias heterotróficas naturalmente presentes nos ambientes aquáticos desponta como promissora tecnologia aplicada à sustentabilidade em cultivo de camarões, bem como na redução dos custos com a alimentação. Sistemas heterotróficos de cultivo vêm sendo desenvolvidos a nível mundial, juntamente com a aplicação de agentes probióticos que favorecem a digestibilidade e, conseqüentemente, absorção dos nutrientes, proporcionando melhor resposta imunológica dos camarões (WANG, 2007). Desta forma, se torna importante o conhecimento sobre a fisiologia de camarões peneídeos para entender a interação bacteriana e absorção dos nutrientes.

2.2 DOENÇAS BACTERIANAS EM ANIMAIS CULTIVADOS E O USO DE ANTIBIÓTICOS

O desenvolvimento da criação de camarões marinhos no Brasil diminuiu o ritmo nos últimos anos, ocasionada por diversos fatores e, dentre eles, pelo surgimento de enfermidades virais e bacterianas, que por consequência, causam graves prejuízos econômicos (ZHANG et al., 2014).

As doenças que acometem os camarões marinhos podem ser causadas por praticamente todos os tipos microrganismos existentes como vírus, bactérias, fungos, entre outros, ocasionando infecções por um único ou múltiplos agentes patogênicos (QUIAO et al., 2015). No entanto, as bactérias se destacam por estarem naturalmente presentes na água, tendo um papel significativo nos ciclos biogeoquímicos dos ambientes aquáticos e são potenciais causadores de doenças de etiologia primária ou secundária (LAVORANTE et al., 2009). Segundo Franco e colaboradores (2010), mudanças bruscas no meio ambiente também interfere na sanidade dos camarões, pois debilita o sistema de defesa do organismo havendo um gasto de energia para sua adaptação às novas condições, podendo tornar-se susceptível a patógenos oportunistas (MENDES et al., 2009).

As principais bacterioses são provocadas por algumas pertencentes ao gênero *Vibrio*. Este gênero de bactéria da família *Vibrionaceae*, possui forma de bastonetes curvos e são Gram negativas, tendo como principais espécies que afetam os camarões Peneídeos: *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. vulnificus* (MORALES-COVARRUBIAS, 2008), *V. nigripulchritudo*

(GOARANT et al., 2006) e *V. orientalis* (ABRAHAM, 2004). Estas bactérias são de origem marinha ou estuarina, podendo ainda ser encontradas no estômago, brânquias e cutícula de camarões selvagens e de cultivo. São considerados os microrganismos mais importantes na aquicultura, pois podem atingir diversos organismos aquáticos, como crustáceos, peixes e moluscos (VANDENBERGHE et al., 2003).

As vibrioses são infecções oportunistas, que ocorrem em todos os estágios de vida do camarão. O processo de infecção da vibriose quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos pontuais no hepatopâncreas. O impacto da vibriose é variável, mas pode alcançar até 70% da população cultivada (SOTO-RODRIGUEZ et al., 2015). Os animais infectados apresentam extrema fraqueza (ficam no fundo do viveiro), nado desorientado, opacidade da musculatura abdominal, aumento da pigmentação e grampo na cauda. Esses microrganismos formam parte da microflora bacteriana que decompõe os detritos encontrados nos sedimentos e na água dos viveiros. O excesso de matéria orgânica, causadora do desequilíbrio do sistema de criação, também favorece o crescimento da biomassa destes patógenos, que encontram nos indivíduos debilitados condições ideais para a infecção e posterior septicemia. Ocorrem quando há estresse no sistema de cultivo, tais como diminuição de oxigênio, densidade de estocagem excessiva, manuseio inapropriado do estoque, lesão na cutícula dos animais, subalimentação e altas concentrações de compostos nitrogenados no ambiente (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2001).

Mendes e colaboradores (2009) encontraram *Vibrio* de várias espécies infectando camarões de viveiros no litoral de Pernambuco sem que estes apresentassem sinais de infecção, determinando um potencial risco aos trabalhadores das fazendas de cultivo que tem contato diário com estes animais contaminados. Apesar de ocorrerem naturalmente na água e sedimentos marinhos, assim como na microbiota gastrointestinal do camarão, a vibriose tem sido associada com alto grau de mortalidade em países produtores (GUIMARÃES, 2008). Estudos de Morales-Covarrubias e colaboradores (2010) relataram que nos ambientes de cultivo há invasão por bactérias oportunistas em geral da ordem das Vibrionáceas do gênero *Vibrio* e como também das *Aeromonas*. Segundo Tran e colaboradores (2013), cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram relatadas como agente etiológico da Hepatopancreatite Necrosante Aguda (AHPNS/ESM) provocando colapso nos cultivos na Ásia e no México (LOMELÍ-ORTEGA; MARTINEZ-DÍAZ, 2014).

O controle de doenças bacterianas em camarões marinhos é realizado principalmente pelo uso de antibióticos, geralmente usados no tratamento contra as vibrioses. No entanto, com o uso excessivo destes antibióticos surgiram as cepas de bactérias resistentes (KESARCODI et al., 2008). Foi correlacionada a resistência das cepas de *V. cholerae* com o

uso indiscriminado de antibióticos em fazendas de camarões marinhos. Diversos países eliminaram o uso de antibióticos no cultivo de camarão marinho, pois além de oferecer um risco de resistência bacteriana, ainda existia o problema dos resíduos que eram deixados na carne do camarão (VINE et al., 2006).

Atualmente existe grande pressão dos órgãos oficiais e até mesmo dos consumidores quanto ao emprego dos antibióticos nas rações animais. O uso massivo de antibióticos aumenta a pressão da seleção sobre os micro-organismos, promovendo o aumento da resistência bacteriana. Como uma estratégia no controle de doenças, o uso de bactérias benéficas (probióticos) tem sido sugerido em substituição ao uso de antibióticos (RAVI et al., 2007).

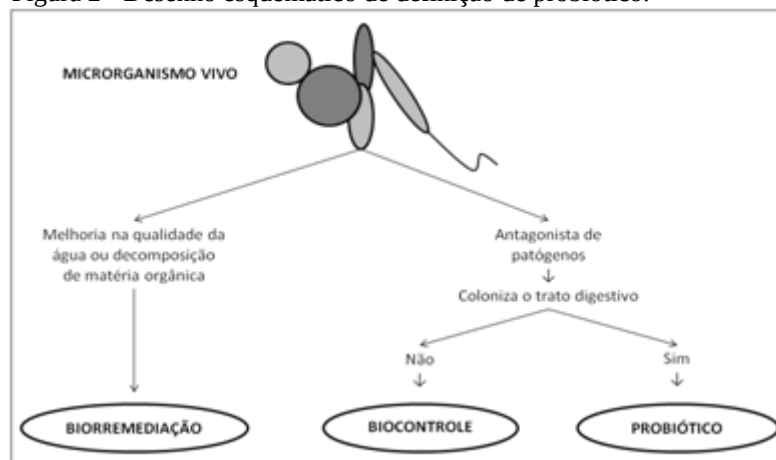
2.3 PROBIÓTICO

Desde o desencorajamento do uso do antibiótico, os probióticos foram eleitos como uma alternativa sustentável e têm sido extensivamente usados na aquicultura em substituição aos antibióticos (LAZADO e CAIPANG, 2014).

O termo probiótico é composto pela preposição “pro”, que significa “para” em latim ou “na frente de / antes” em grego, e “biótico”, um adjetivo grego relativo ao substantivo “bios” que significa “vida”, que significa “à favor da vida”. Para o nosso conhecimento, o termo probiótico foi mencionado pela primeira vez por Kollath (1953), definindo como “suplementos orgânicos e inorgânicos necessários para restaurar a saúde de pacientes malnutridos”. Estes suplementos foram considerados comuns em alimentos vegetais como vitaminas, substâncias aromáticas, enzimas ou possivelmente outras substâncias relacionadas com processos metabólicos vitais, sendo o último incluindo bactérias (RUSCH, 2002). Esta é talvez a primeira alusão feita ao uso indireto de microrganismos como probióticos. Vergin (1954) propôs então que o uso de uma dieta probiótica, incluindo produtos de fermentação, pudesse contribuir para o equilíbrio microbiano do corpo perturbado após um tratamento antibiótico. Kolb (1955) apoiou esta sugestão que, de certa forma, aborda a definição aceita hoje. Mais tarde, Lilly e Stillwell (1965) definiram os probióticos como fatores promotores do crescimento produzidos por microrganismos. Fujii e Cook (1973) que definiram os probióticos como "compostos que produzem resistência à infecção no hospedeiro, mas que não inibem o crescimento de microrganismos *in vitro*". Então, na época, os probióticos eram considerados “compostos e/ou microrganismos com diferentes funções que contribuíam para a restauração, a manutenção ou o aprimoramento da saúde através de rotas não relacionadas ao antagonismo microbiano ou competição”. Em 1974, Parker refinou a definição de

probióticos como agindo para o trato digestivo: "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal". Isso pode ser considerado como a primeira menção direta de probióticos no contexto da saúde. Elie Metchnikoff é considerado o primeiro pesquisador a trabalhar com o conceito de probióticos com a seguinte definição: “micróbios ingeridos com o objetivo de promover a boa saúde” (FULLER, 1992). Fuller (1989) ampliou a definição para “microrganismos vivos utilizados na alimentação, que afetam benéficamente o animal hospedeiro por melhorar seu balanço microbiano intestinal”. Em uma redefinição, adaptada para a aquicultura, os probióticos são “células microbianas administradas de tal modo a entrar no trato gastrointestinal, sendo mantidas vivas, com o objetivo de melhorar a saúde” (GATESOUBE, 1999). Essas células podem proteger seu hospedeiro de patógenos pela produção de metabólitos que inibem a colonização ou o crescimento de outros microrganismos ou pela competição por recursos como nutrientes ou espaço (VINE et al., 2006). No entanto, Verschuere e colaboradores (2000) sugeriram outra definição, pois a definição para ambientes aquáticos necessitava ser alterada e, segundo estes autores, probióticos são “microrganismos vivos que têm efeito benéfico sobre o hospedeiro, seja modificando a comunidade microbiana associada ao hospedeiro ou ao ambiente, seja melhorando o consumo ou absorção do alimento, seja fortalecendo o sistema imunológico, ou ainda melhorando a qualidade do ambiente de cultivo” (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático de definição de probiótico.



Fonte: Adaptado de Verschuere et al., (2000).

2.4 MÉTODOS PARA ISOLAR E SELECIONAR CEPAS COM POTENCIAL PARA PROBIÓTICOS

O isolamento de bactérias do sistema digestivo do animal de interesse é o primeiro passo para se obter sucesso no desenvolvimento do probiótico (BALCÁZAR et al., 2006). Por

não se conhecer as cepas isoladas, há a necessidade se realizar diversos testes de seleção *in vitro*, como: inibição de patógenos, produção de enzimas digestivas, tolerância a sais biliares e variações de pH e salinidade, produção de substâncias antimicrobianas, velocidade de crescimento e capacidade de adesão do epitélio intestinal (VINE et al., 2006). Os ensaios de inibição de patógeno são os mais utilizados e, neste caso, o mais indicado é avaliar o probiótico frente às bactérias patogênicas dos próprios organismos aquáticos a serem estudados (MOURIÑO et. al., 2010). As cepas com bons resultados devem ser identificadas e as que forem patogênicas para espécies aquáticas, descartadas. Se a finalidade for melhorar a digestibilidade das dietas oferecidas, o indicado é realizar testes de produção de enzimas digestivas, mas nada impede de realizar outros testes *in vitro* por não saber como estes organismos atuam. Vale ressaltar que as bactérias selecionadas no ambiente de cultivo muitas vezes não conseguem repetir os resultados *in vitro*, seja por não se adaptar ao meio ou pela ineficiência ao competir com os microrganismos ali presentes (MOURIÑO et. al., 2010).

O passo seguinte é a realização de ensaios em escala piloto (*in vivo*). As bactérias probióticas podem ser adicionadas à dieta ou diretamente na água. Neste passo é importante avaliar se a bactéria é capaz de colonizar o trato digestivo do animal e se não causa alguma patologia ao mesmo. Fatores como melhoria da relação da microbiota intestinal do animal (diminuição da carga de bactérias patogênicas), aumento da taxa de crescimento, melhoria da digestibilidade da dieta (diminuição da conversão alimentar), melhoria do sistema imunológico e maior resistência dos animais contra patógenos são relevantes. Caso a bactéria não traga nenhum benefício, deve-se iniciar o processo de seleção de outra cepa bacteriana. A última etapa é a avaliação do probiótico em escala comercial (campo), normalmente em conjunto com produtores, visando a repetição em condições de cultivo dos ensaios em pequena escala (MOURIÑO et. al., 2010).

2.5 BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA CARCINICULTURA E O GÊNERO *Bacillus*

A demanda por novos probióticos surgem todos os dias, principalmente os voltados para a carcinicultura, sejam eles utilizados na larvicultura ou na fase de engorda. Cepas probióticas estão adaptadas, através de processos naturais, para o uso em aquicultura fazendo com que o produto alcance o efeito desejado (KESARCODI-WATSON et al., 2008). Os microrganismos probióticos possuem capacidade de sobrevivência ao trato gastrointestinal; não provoca toxicidade e nem patogenicidade ao homem e nem aos animais; apresentam estabilidade durante o período de estocagem, permanecem viáveis por longos períodos em condições normais de armazenamento e tem capacidade de competir contra bactérias

intestinais não desejáveis, demonstrando efeitos positivos ao hospedeiro (FERREIRA et al., 2012).

Dentre gêneros de microrganismos Gram-negativos utilizados como probióticos, encontram-se: *Aeromonas*, *Agarivorans*, *Alteromonas*, *Bdellovibrio*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Neptunomonas*, *Phaeobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Roseobacter*, *Shewanella*, *Synechococcus*, *Thalassobacter*, *Vibrio* e *Zooshikella*; e, dentre os Gram-positivos, encontram-se: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brochothrix*, *Clostridium butyricum*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus acidilactici*, *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Vagococcus* e *Weissella* (NEWAJ-FYZUL et al., 2013).

Geralmente, microrganismos probióticos são administrados como alimentos vivos enriquecidos, adicionados à dieta ou à água de cultivo (PANIGRAHIA et al., 2005). Entre as bactérias de interesse testadas para a utilização como probióticos na carcinicultura e em formulações comerciais, as espécies do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas como probióticos na carcinicultura (VIEIRA, 2010). Pertencem à família *Bacillaceae*, têm sido empregadas na formulação de misturas probióticas e se destacam pela elevada produção enzimática de poder inibitório a outros microrganismos, capacidade de competição por nutrientes e área de adesão, participação nos estímulos imunes e no aumento do balanço microbiano intestinal através da permanência nessa região (XUE et al., 2016). São capazes de produzir enzimas que degradam substratos orgânicos, apresentam temperatura ótima de crescimento entre 28°C e 35°C, conseguem se multiplicar na faixa de pH que varia de 4,9 a 9,3.

Essas bactérias possuem formato de bastonete, são Gram-positivas, com baixo conteúdo de guanina/citocina e formadoras de esporos. Esse gênero pode produzir substâncias antibióticas durante a esporulação, com destaque para as bacitracinas, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (MADIGAN et al., 2004). Esses produtos têm sido muito eficientes na prevenção de enfermidades, sendo usado um número variável de espécies de *Bacillus*. Os produtos que utilizam esporos em sua composição possuem vantagens, pois os esporos podem sobreviver intactos à passagem pelo estômago, além de terem vida útil mais longa (MARTINS et al., 2013). Esse gênero é facilmente encontrado em sedimentos marinhos e naturalmente presente nas brânquias, cutícula e trato intestinal de organismos bentônicos como os camarões (SHARMILA et al., 1996), podendo ainda ser administradas tanto através do alimento como diretamente na água de cultivo.

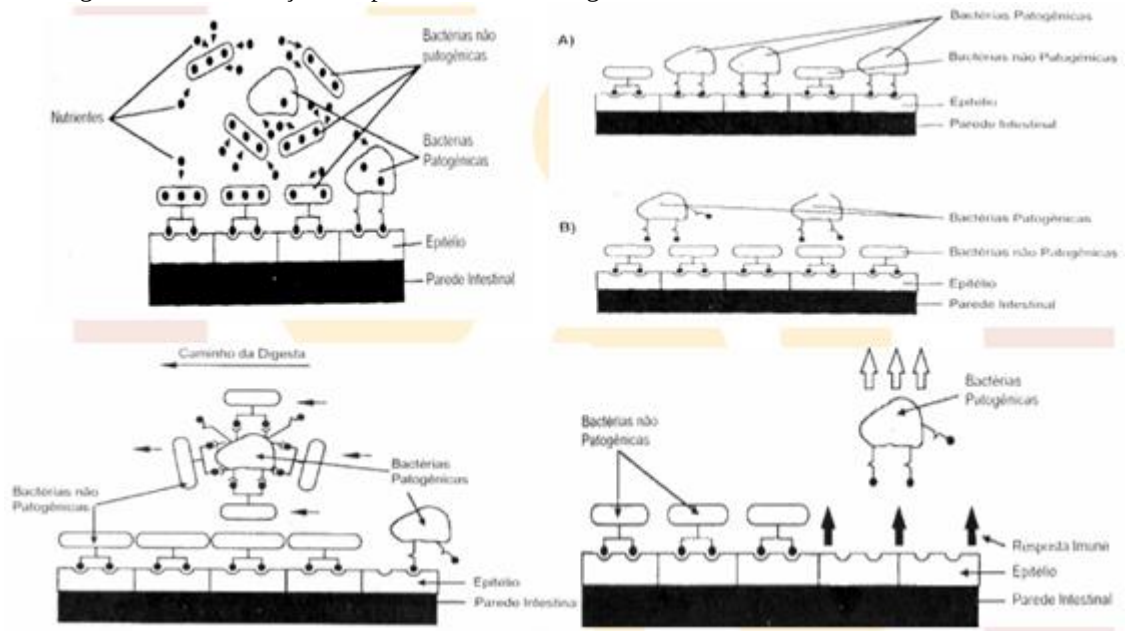
Ainda sobre o gênero, estudos diversos relatam o benefício do uso das espécies *Bacillus subtilis*, *B. fusiformis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* atuando de diversos modos na qualidade do cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Fenneropenaeus indicus*, *Penaeus monodon* e *P. japonicus*. *Bacillus amyloliquefaciens* é uma potencial espécie de *Bacillus* que produz várias enzimas extracelulares, incluindo α -amilases, celulase, metaloproteases e proteases que aumentam a digestibilidade e a absorção de nutrientes, além da função imune geral do intestino (LEE et al., 2008). Os probióticos compostos de esporos de *Bacillus amyloliquefaciens* são conhecidos por produzir α -amilase, que é usado em hidrólise de amido (GANGADHARAN et al., 2008). Tem sido relatado que o *Bacillus amyloliquefaciens* tem efeitos benéficos quando adicionado às dietas de peixe (CAO et al., 2011, REDA et al., 2014), e como probióticos em peixes e animais terrestres (DAS et al., 2013; KAEWKLOM et al., 2013; AHMED et al., 2014; GEERAERTS et al., 2015; THY et al., 2017); no entanto, existe falta de informação de seu uso na carcinicultura.

2.6 MECANISMOS DE AÇÃO DE PROBIÓTICOS

Visando o aumento da produtividade de camarões, vários estudos têm sido realizados buscando métodos, principalmente profiláticos, para diminuir a mortalidade por doenças, aumentar a sanidade, diminuir o consumo de água e produção de efluentes e, ainda, melhorar a digestibilidade e conversão alimentar dos animais (BARBIERI et al., 2016). Dentre estas novas tecnologias, incluem-se a utilização de probióticos, de imunoestimulantes, de fitoterápicos e de ácidos orgânicos (MINE; BOOPATHY, 2011).

Existem várias hipóteses para explicar o modo de ação dos probióticos, porém, a mais aceita é a teoria da “exclusão competitiva”. A exclusão competitiva é a incapacidade de uma população de microrganismos, em sua maioria patógenos, de se estabelecerem no intestino do animal devido à presença de outras populações desejáveis. Os probióticos, depois de ingeridos, encontram-se em meio favorável para sua multiplicação e colonizam o trato gastrointestinal (Figura 3). De acordo com a ilustração, surge um equilíbrio microbiano a favor da microflora benéfica, possibilitando uma redução de pH, com consequente redução de bactérias patogênicas. Este fato contribui para uma diminuição na produção de toxinas e na competição por nutrientes. Ocorre também uma estimulação da imunidade com aumento de anticorpos (ABCC, 2017).

Figura 3 - Modo de ação dos probióticos no trato gastrointestinal dos animais.



Fonte: Adaptado de Gatesoupe (1999).

Dentre os vários benefícios dos probióticos, pode-se citar a prevenção de doenças intestinais (NEWAJ-FYZUL et al., 2013), promoção de crescimento e eficiência alimentar (VENKAT et al., 2004), seleção de cepas resistentes (VIEIRA et al., 2000), alteração no balanço da microbiota intestinal atuando na melhoria da resposta imune e redução de populações de bactérias patogênicas em animais durante a fase de cultivo (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

2.6.1 Equilíbrio da microflora benéfica intestinal

A população microbiana do trato intestinal de organismos aquáticos é composta predominantemente por bactérias Gram-negativas como dos gêneros *Vibrio* e *Pseudomonas* (VINE et al., 2006). Os probióticos agem transformando a microbiota intestinal permitindo a colonização de bactérias benéficas e, consequentemente, impedindo a colonização por bactérias patogênicas no intestino do animal (GOMEZ-GIL et al., 2000). Estratégias como o uso de microrganismos probióticos têm inibido bactérias patogênicas por diferentes mecanismos: produção de compostos inibitórios como as bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, proteases, peróxido de hidrogênio, formação de amônia e diacetil, alteração nos valores de pH, competição por nutrientes, sítios de adesão e enzimas que resultam no melhoramento nutricional do cultivo animal (GÓMEZ et al., 2007).

A utilização das bactérias ácido-láticas no intuito de reduzir uma dominância de bactérias patogênicas em organismos aquáticos tem sido relatada; estas produzem compostos

antimicrobianos como bacteriocinas, reuterim, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (GILLOR et al., 2008). O gênero *Bacillus* também possui bactérias com grande potencial de compostos antimicrobianos como biosurfactantes, bacteriocinas e sideróforos (MUKHERJEE et al., 2009). Outros gêneros também têm sido alvo de estudo pela capacidade de produção de compostos antimicrobianos, como *Arthrobacter* e *Pseudomonas* (RATTANACHUAY et al., 2010).

Vários estudos relatam a inibição do crescimento de bactérias patogênicas *in vitro* pela ação de bactérias probióticas. Kesarcodi-Watson e colaboradores (2008) verificaram que probióticos produtores de sideróforos (quelantes de ferro) poderiam deprimir o crescimento de patógenos em condições de limitação de ferro. Rengpipat e colaboradores (2000) demonstraram que a adição de *Bacillus* sp. na água de cultivo diminuiu a população de *Vibrio* spp. na água de cultivo e no trato digestório de *P. monodon*. Gullian e colaboradores (2004) verificaram que em *L. vannamei* a microbiota intestinal foi modificada pela adição na água de cultivo de *Bacillus* P64 e *Vibrio* P62.

É evidente que a maioria dos probióticos para efeito nutricional compreende bactérias ácido-láticas, como *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. (IRIANTO; AUSTIN, 2002), porque estas são componentes importantes da microflora normal do trato gastrointestinal de peixes e mamíferos saudáveis (RINGO; GATESOUBE, 1998). Não há relatos de bactérias ácido-láticas em *Macrobrachium rosenbergii* como componente comum da microflora (VENKAT et al 2004; KEYSAMI et al., 2005), mas o gênero *Bacillus* sp. é conhecido por colonizar amplamente a microflora normal do *M. rosenbergii* (COLORNI, 1985; ANDERSON et al., 1989; KEYSAMI et al., 2005; DEESEENTHUM et al., 2007; KEYSAMI et al., 2007; RINISHA et al., 2010; KEYSAMI et al., 2012; SEENIVASAN et al., 2012c,d; KUMAR et al., 2013; SEENIVASAN et al., 2015).

2.6.2 Melhoria da digestibilidade da dieta

O ambiente aquático influencia de forma significativa na composição da população microbiana do trato digestivo. Os animais não regulam a temperatura corporal, e a associação de microrganismos no lúmen intestinal pode variar conforme a temperatura. A salinidade é outro fator importante na determinação desta população. Assim, a água dos tanques e a própria alimentação dos animais pode fornecer microrganismos que se associarão àqueles presentes no trato gastrintestinal.

Vários benefícios são atribuídos ao uso de probióticos como o incremento do estado nutricional dos animais através da produção de enzimas digestivas (VINE et al., 2006). O

mesmo autor, afirma que a utilização de probióticos na dieta pode fornecer ou estimular a produção de enzimas digestivas pelo hospedeiro.

Em camarões, apenas uma pequena parte das enzimas digestivas do trato digestório é proveniente da microbiota (ZIAEI-NEJAD et al., 2006). No entanto, o fornecimento de probióticos pode estimular a produção de enzimas pelo hospedeiro (ZHOU et al., 2009). A utilização de microrganismos que facilitem a digestão e absorção de proteínas é uma alternativa para a diminuição dos custos de produção, uma vez que a proteína é um importante nutriente limitante do crescimento para camarões peneídeos e o mais caro na composição das rações (LIU et al., 2009).

Algumas bactérias podem participar do processo digestório dos camarões pela produção de enzimas extracelulares como proteases, amilases e lipases (OCHOA; OLMOS, 2006). Entre proteases específicas, a tripsina e a quimotripsina são consideradas as mais abundantes enzimas proteolíticas dos camarões peneídeos e são responsáveis pela maior parte da digestão das proteínas dos alimentos. Segundo Dall (1992), a tripsina é a enzima mais importante para digestão de proteínas uma vez que esta é capaz de hidrolisar de 50% a 60% da proteína consumida pelo animal.

Alguns trabalhos relataram que bactérias isoladas de animais aquáticos apresentaram *in vitro* a capacidade de digerir quitina, amido, proteínas, celulose e lipídeos (BAIRAGI et al., 2002). Gullian e colaboradores (2004) relataram que cepas de bactérias de *Bacillus* P64 e *Vibrio* P62 isolados do trato digestivo de camarões adultos de *L. vannamei* apresentaram ação de exclusão competitiva contra a bactéria patogênica *V. harveyi*; adicionalmente, estas cepas mostraram-se eficientes na estimulação da enzima fenoloxidase. Ziaei-Nejad e colaboradores (2006) observaram em *Fenneropenaeus indicus* que as atividades das enzimas digestivas lipase e amilase foram superiores em camarões alimentados com *Bacillus* spp. Zhou e colaboradores (2009) demonstraram que houve um aumento da atividade específica de proteases, lipases e amilases em larvas de *L. vannamei* com a adição *B. coagulans* na água, que pode ter contribuído para uma melhor absorção do alimento e aumento da sobrevivência. Em outro estudo, concluiu-se que a adição de *B. coagulans* à dieta de juvenis de *L. vannamei* também resultou em um aumento da atividade das enzimas amilase, lipase e protease e em um significativo ganho de peso dos camarões (WANG et al., 2012). Nimrat e colaboradores (2013) encontraram um significativo aumento na atividade da tripsina e um maior ganho de peso nos camarões após adicionarem *B. subtilis* à dieta de juvenis de *P. monodon*.

2.6.2.1 Enzimas digestivas

Em conjunto, enzimas digestivas presentes nos hepatopâncreas de *L. vannamei* são capazes de hidrolisar uma variedade de substratos e vários fatores estão implicados em sua regulação. Entre esses fatores destacam-se a dieta (LE MOULLAC et al. 1996; GUZMAN et al., 2001; BRITO et al., 2001), variações ontogênicas (LOVETT e FELDER, 1990; LEMOS e RODRIGUEZ, 1998), tamanho corporal (LEE; LAWRENCE, 1985), ritmo circadiano (GONZALEZ et al., 1995; MOLINA et al., 2000), fases da muda (MOLINA et al., 2000; SÁNCHEZ-PAZ et al., 2003) e até mesmo um efeito estimulante da água de tanques tem sido reportado (MOSS et al., 2001).

O êxito no cultivo depende, em grande parte, de uma nutrição adequada e de um bom manejo alimentar. As proteases estão entre as enzimas de crustáceos que recebem maior atenção (FERNÁNDEZ-GIMENEZ et al., 2002), pois são responsáveis pela digestão de proteínas dos alimentos ingeridos, os componentes mais caros da alimentação de camarões (SÁNCHEZ-PAZ et al., 2003). Microrganismos produzem vários tipos de proteases que podem ser intracelulares (importantes nos processos celulares como esporulação e diferenciação, maturação de enzimas, reciclagem de proteínas e manutenção do “pool” de proteínas) e extracelulares (importantes na hidrólise de proteínas e habilitam a célula a absorver e utilizar os produtos dessa hidrólise) (GUPTA et al., 2002). A produção de proteases por microrganismos é grandemente influenciada pelos componentes do meio, como carbono, nitrogênio, íons metálicos, fatores físicos como temperatura, pH e tempo de incubação (PURI et al., 2002).

Para a realização da digestão do amido há a atuação de diversas enzimas. A α -amilase [EC 3.2.1.1] é uma endocarboidrase encontrada em eubactérias a eucariotos (OUDJERIOU et al., 2003) responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ no amido e glicogênio. Nesse processo são produzidos oligossacarídeos, α -dextrinas e maltose (VAN WORMHOUDT; FAVREL, 1988), que são hidrolisados à glicose pela ação complementar da α -glicosidase [EC 3.2.1.20], da sacarase-isomaltase [EC 3.2.1.48] e da α -dextrinase [EC 3.2.1.20]. Dentre essas, a α -glicosidase está diretamente relacionada à exo-hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ da maltose e demais oligossacarídeos formados após a atuação da α -amilase (LE CHEVALIER; VAN WORMHOUDT, 1998; DOUGLAS et al., 2000; ROSAS et al., 2000). Muitos microrganismos estão relacionados à produção de amilases neutras ou ácidas, especialmente do gênero *Bacillus* (HAGIHARA et al., 2001; IGARASHI et al., 1998). Muitas enzimas extracelulares são obtidas a partir de bactérias desse gênero pela facilidade de secreção de proteínas para o meio extracelular devido à ausência de uma membrana externa (STEPHENSON e HARWOOD, 1998).

2.6.3 Imunoestimulação e resistência à infecção por patógenos bacterianos e virais

O estresse ambiental é considerado um importante fator para o surgimento e/ou incremento das doenças em crustáceos. As mudanças físico-químicas da água, por exemplo, mudanças de temperatura, podem afetar o metabolismo, o crescimento, a sobrevivência e o sistema imune dos animais. No entanto, ainda são poucos os estudos que relacionam a competência do sistema imune com a susceptibilidade dos organismos a patógenos (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

Devido às particularidades do sistema imunológico dos peneídeos, os compostos biológicos denominados de imunoestimulantes, vêm despontando como perspectiva para incrementar a resistência dos camarões frente a infecções de origem viral (VARGAS-ALBORES et al., 1996). Os imunoestimulantes são produtos orgânicos, inorgânicos ou sintéticos, tais como bactérias mortas e produtos bacterianos, glucanos e certas vitaminas e hormônios, que operam com o princípio de estimular a imunidade inata; são a primeira linha de defesa contra patógenos invasores e levam à melhorias nas condições de saúde e resistência a agentes infecciosos.

Entre os mecanismos de defesa dos camarões está o sistema de ativação da pró-fenoloxidade (sistema proPO) que desencadeia o processo de melanização induzido pela ação da enzima fenoloxidade (PO) em resposta a identificação de intrusos pelos hemócitos (PEZZAROLO; BARRACCO, 1997). Estudos demonstram que os probióticos podem aumentar a resposta imune (NAVINCHANDRAN et al., 2014) e a resistência à infecção por patógenos (ZOKAEIFAR et al., 2012). A microbiota probiótica é capaz de produzir enzimas que melhoram a saúde dos organismos de cultivo ao promover estímulos ao sistema imune (LI et al., 2015).

Vários trabalhos relatam a imunoestimulação de camarões pelo uso de probióticos. No estudo realizado por Tseng e colaboradores (2009), a dieta suplementada com 10^8 UFC/Kg de *B. subtilis* aumentou a atividade da PO e a taxa de fagocitose de *L. vannamei*, aumentando a sobrevivência dos animais ao *V. alginolyticus*. Li e colaboradores (2009) demonstraram que a adição de *Bacillus* OJ na dieta de *L. vannamei* aumentou a sobrevivência dos animais ao desafio contra WSSV; os mesmos observaram que os animais submetidos a um estresse por baixa salinidade tiveram o sistema imunológico comprometido e tornaram-se mais vulneráveis à infecção por *V. alginolyticus*, uma vez que houve um aumento da mortalidade dos camarões previamente estressados. Zokaeifar e colaboradores (2012) ao suplementarem a dieta de juvenis de *L. vannamei* com *B. subtilis* encontraram uma melhor performance de crescimento, de resistência ao *V. harveyi* e atribuíram esses resultados à um incremento na

resposta imunológica dos camarões. Em 2014, os mesmos autores demonstraram que após oito semanas de administração de *B. subtilis* a juvenis de *L. vannamei* houve um aumento da expressão dos genes do sistema imunológico proPO, LGBP, PE e SP, neste estudo, após 24h de infecção os camarões foram significativamente mais resistentes à injeção de *V. harveyi* (ZOKAEIFAR et al., 2014)

2.6.4 Melhoria nos parâmetros de cultivo

O beneficiamento do probiótico na aquicultura ocorre através dos índices zootécnicos, como: maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar e por meio da redução da colonização intestinal por alguns patógenos e proliferação de microrganismos benéficos (VERSCHUERE et al., 2000).

Segundo Gomez-Gil e colaboradores (2000), o fornecimento de dieta suplementada com probiótico já no estágio de protozoa pode levar ao estabelecimento de uma microbiota bacteriana intestinal favorável, podendo ocupar um espaço que poderia ser ocupado por bactérias patogênicas. Podem ser citados alguns estudos, como o exemplo realizado por Zokaeifar e colaboradores (2012), que mostrou que os juvenis de *L. vannamei* que receberam a dieta suplementada com cepas de *B. subtilis* apresentaram valores significativamente superiores de peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específico e sobrevivência em comparação com o grupo controle. Keysami e colaboradores (2012) relatam que um isolado bacteriano composto de *B. subtilis* extraído do intestino do camarão foi administrado na ração para juvenis de *M. rosenbergii* e verificou que as propriedades probióticas desse isolado levaram a aumento do ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e sobrevivência desses animais. O uso de *B. coagulans* melhorou a sobrevivência na larvicultura de *L. vannamei* (ZHOU et al., 2009), assim como *Bacillus sp.* aumentou a sobrevivência de *L. vannamei* em larviculturas comerciais (DECAMP et al., 2008). Liu e colaboradores (2009), utilizando uma dieta suplementada com *Bacillus sp.*, observou uma melhoria no crescimento e conversão alimentar de *L. vannamei*. Wang (2007) utilizando a combinação de bactéria fotossintética e o *Bacillus sp.* em diferentes concentrações, adicionadas ao cultivo de *L. vannamei*, mostrou que todas as dietas suplementadas com probióticos aumentaram a performance de crescimento em camarões, com os valores de peso final, ganho de peso diário e taxa relativa de ganho de peso superiores aos do grupo controle.

Em 1991, alguns pesquisadores evidenciaram uma melhoria na qualidade da água e na produtividade de camarões de água doce em contato com bactérias nitrificantes e bactérias do gênero *Bacillus*. A introdução destes microrganismos nos tanques reduziu a demanda de

oxigênio, a quantidade de amônia e nitrito na água, além de aumentar a sobrevivência de pós-larvas (ABRUNHOSA, 2011). O sucesso de qualquer organismo aquático depende de vários fatores, como: densidade de estocagem, alimentação, condições ambientais e outros. Entre esses, podemos ressaltar a manutenção da qualidade da água do viveiro de criação como um dos mais importantes. De acordo com Abrunhosa (2011), o manejo das variáveis de qualidade de água dos viveiros de camarões influencia de maneira decisiva no processo produtivo dos camarões.

O uso de probióticos também tem sido especialmente associado à melhorias na qualidade da água como a remoção de matéria orgânica (SHAILENDER, 2012). Dalmin e colaboradores (2001) relataram que o uso de *Bacillus* sp. melhorou a qualidade da água, as taxas de sobrevivência e de crescimento e a saúde de juvenis de *Penaeus monodon*, além de reduzir o vibriose. Wang e colaboradores (2012) também reportaram que no cultivo de *L. vannamei* houve uma diminuição significativa das concentrações de nitrogênio total e de carbono total do sedimento, sendo observado também a redução de fósforo total e fósforo inorgânico total em certos períodos de cultivos com a aplicação de probióticos comerciais na água. Outros autores observaram redução significativa das concentrações de amônia e nitrato quando comparados o uso de probióticos com o grupo controle no cultivo da mesma espécie (RAHIMAN et al., 2010). Em *Macrobrachium rosenbergii*, alguns estudos comprovam o efeito benéfico de probióticos no desempenho do animal (VENKAT et al. 2004; DEESEENTHUM et al. 2007; KEYSAMI et al., 2007; SHINDE et al., 2008; SAAD et al., 2009; RINISHA et al. 2010; SEENIVASAN et al. 2011; PRASAD et al., 2012; SEENIVASAN et al., 2012a, b, c, d, e; ABDEL-HAKIM et al., 2013; GUPTA; DHAWAN, 2013; KUMAR et al., 2013; SEENIVASAN et al., 2015).

3 EFEITO DE DIFERENTES RELAÇÕES CARBONO/NITROGÊNIO NA QUALIDADE DE ÁGUA, DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E COMUNIDADE BACTERIANA EM CULTIVO INTENSIVO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) EM BFT

Carolina Kropniczki Gouveia, Fabiana Penalva de Melo, Rogério William Santos Portela, José de Paula Oliveira, Eudes de Souza Correia, Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, Ranilson de Souza Bezerra

Efeito de diferentes relações carbono/nitrogênio na qualidade de água, desempenho zootécnico e comunidade bacteriana em cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em BFT

Carolina Kropniczki Gouveia^a, Fabiana Penalva de Melo^b, Rogério William Santos Portela^a, José de Paula Oliveira^c, Eudes de Souza Correia^d, Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva^d, Ranilson de Souza Bezerra^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil, carolkrop@yahoo.com.br, portela.gene@gmail.com

^bCentro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Cidade Universitária Paulo IV, caixa postal 09, Brazil, fabianapenalva@gmail.com

^cInstituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50761-000, Brazil, jose.paula@ipa.br

^dDepartamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil, eudes.correia@gmail.com, suzianny.silva@ufrpe.br

*Corresponding author: tel: +55 (81) 2126-8540, ransoub@uol.com.br (R.S. Bezerra)

23 **Resumo**

24 Sistema de cultivo utilizando elevadas densidades de estocagem e, mínima ou nenhuma troca
25 de água, tem sido usado para uma aquicultura sustentável que integra produtividade e
26 produção mínima de efluentes. Neste sentido, a promoção de bioflocos sob diferentes relações
27 carbono/nitrogênio pode induzir à melhora da qualidade da água de *Litopenaeus vannamei* e
28 estimular a sucessão microbológica ao longo do tempo de cultivo. O objetivo do presente
29 trabalho foi avaliar o efeito de diferentes relações carbono/nitrogênio nas variáveis de cultivo
30 e contagens microbiológicas de *L. vannamei* mantidos em sistemas de bioflocos. O
31 delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando quatro tratamentos com
32 três repetições cada, consistindo da adição diária de melaço a fim de alcançar as relações de
33 C:N de 15:1, 20:1, 25:1 e 30:1. Foram usados animais com peso médio inicial de 1,4 g e
34 densidade de estocagem de 90 camarões/m². Amostras de água para análises microbiológicas
35 foram tomadas em três tempos (31, 44 e 53 dias) após início do povoamento, para contagem
36 de bactérias heterotróficas, quimioautotróficas e de *Vibrio* spp. O aumento das relações C:N
37 influenciou significativamente a transparência da água e a concentração de oxigênio
38 dissolvido ($p<0,05$). A taxa de crescimento específico atingiu de 3,7 a 4,0%/dia, sem
39 diferença significativa entre os tratamentos. As relações 25M e 30M proporcionaram um
40 melhor desempenho em produtividade (máximo de 816,1 g/m²) e sobrevivência (máximo de
41 85%), sendo significativo somente para sobrevivência ($p<0,05$), cujas médias variaram de
42 85,2% no tratamento 25M a 63,7% no tratamento 20M. Contudo, maior população de
43 bactérias heterotróficas ($1,57 \cdot 10^7$ UFC/mL) foi encontrada na relação 15:1 e não houve
44 relação de população de bactérias autotróficas e *Vibrio* com as diferentes relações C:N
45 ($p>0,05$). Nos três grupos bacterianos foi possível perceber um incremento na população de
46 cada grupo de acordo com tempo. O melaço pode ser utilizado como fonte de carbono e a
47 menor relação carbono/nitrogênio foi suficiente para manter os parâmetros físico-químicos da

água avaliados em níveis satisfatórios e para o estímulo da microbiota bacteriana heterotrófica durante todo o cultivo intensivo.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, engorda, carbono/nitrogênio, heterotrófico, bactérias.

1. Introdução

Um sistema que tem demonstrado resultados promissores no cultivo de camarões é o atualmente conhecido como Sistema de Bioflocos ou BFT (*Biofloc Technology*). Neste tipo de cultivo, através do controle dos microrganismos presentes, é possível reciclar os compostos nitrogenados tóxicos em proteína microbiana, que serve como fonte de alimento, além de manter a qualidade de água dentro dos limites recomendados para a produção de crustáceos (Ballester et al., 2010; Ferreira et al., 2015).

Uma das estratégias para a formação de bioflocos é estimular o crescimento e o metabolismo das bactérias heterotróficas pela adição de fontes de carbono orgânico (C), equilibrando este substrato com o nitrogênio amônio total (N) através da relação C:N (Avnimelech, 1999). Além disso, pode-se dizer que o bioflocos pode ser dividido em duas fases cronológicas: na primeira, predominam bactérias heterotróficas, e na segunda, bactérias quimioautotróficas. Geralmente, o surgimento das bactérias autotróficas acontece entre 15-22 dias após o início da fertilização orgânica da água. Entretanto, as vias heterotróficas e autotróficas de controle da amônia na água do cultivo não são excludentes e podem estar presentes simultaneamente ao longo de todo cultivo (Avnimelech, 2012).

Nos sistemas heterotróficos, onde o incremento das populações de microrganismos (fitoplâncton, bactéria, rotíferas, nematóides e protozoários) é feito através de fertilização orgânica aliada à inorgânica, o estudo das bactérias reveste-se de grande importância para o entendimento da dinâmica de mineralização dos compostos orgânicos. Este trabalho objetivou a avaliação da influência dos nutrientes (carbono e nitrogênio) com diferentes relações sobre a

qualidade da água e sobre o desempenho de juvenis de *Litopenaeus vannamei*, além do estímulo destas variações C:N sobre a concentração de bactérias heterotróficas, quimioautotróficas e de *Vibrio* spp.

2. Material e Métodos

O cultivo experimental foi realizado na Estação de Aquicultura do Departamento de Pesca e Aquicultura, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), durante 52 dias, utilizando doze tanques circulares de fibra de vidro com 800L de volume útil de água salgada (33 g/L) e supridos por um sistema de aeração contínuo. Durante o período experimental, não houve renovação de água, apenas reposição das perdas por evaporação. As análises microbiológicas foram realizadas nos Laboratórios de Biologia do Solo e de Genoma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

2.1. Preparo e condições experimentais do cultivo

A preparação da água utilizada no experimento teve início 15 dias antes do povoamento dos tanques de cultivo. Inicialmente, foi realizada fertilização inorgânica com monoamônio fosfato - MAP (11% N e 52% P₂O₅), nitrato de cálcio (15% N) e metassilicato de sódio (30% SiO₂) para alcançar as concentrações de 3-4 mg/L de nitrogênio, 0,15-0,2 mg/L de fósforo e 1-2- mg/L de silicato. Após a floração das algas, iniciou-se a fertilização orgânica com melaço para induzir o desenvolvimento bacteriano e, conseqüentemente, a formação de bioflocos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando quatro tratamentos com três repetições por tratamento, consistindo da adição de melaço nas diferentes relações C/N de 15/1 (15M), 20/1 (20M), 25/1 (25M) e 30/1 (30M). A quantidade de melaço adicionada diariamente aos tanques de cultivo para manter as relações C/N, considerou as concentrações de carbono e N-amônia contidas no melaço e na ração (Avnimelech, 1999; Ebeling et al., 2006).

Em cada tanque foram estocados aleatoriamente 90 juvenis/m² de *L. vannamei* com peso de 1,4 ± 0,4 g. Os animais foram alimentados com ração comercial (Carcimax[®], 35% proteína bruta, Irca do Brasil), ofertada duas vezes ao dia (8 e 16 horas) em uma quantidade variando de 8% a 3% da biomassa total por dia, do início ao final do cultivo. A sobra diária da ração foi coletada e armazenada sob refrigeração para posterior quantificação da matéria seca.

2.2. Análise da qualidade da água

Durante o período experimental, a temperatura da água, o oxigênio dissolvido (multiparâmetro: YSI modelo 550A) e o pH (pHmetro digital portátil WTW, 330i) foram mensurados diariamente (8 e 16 horas), enquanto que a transparência (disco de Secchi) e a salinidade (refratômetro de salinidade S-10E, Atago) foram aferidas semanalmente.

Para determinação de nitrogênio amoniacal total (TAN) foi utilizado o método de salicilato (Hach 10023, *Salicylate Method*); o nitrogênio-nitrito (N-NO₂) foi analisado segundo o método de diazotização (Hach 8507, *Diazotization Method*, absorbância a 507 nm) e o nitrogênio-nitrato (N-NO₃) pelo método de redução de cádmio (Hach 8039, *Cadmium Reduction Method*; 500 nm). A alcalinidade (expressa em equivalentes de CaCO₃) e a medição dos sólidos suspensos totais foram determinadas por kit colorimétrico e conforme APHA (1995), respectivamente. Estes parâmetros foram avaliados quinzenalmente utilizando espectrofotômetro Hach DR2800.

2.3. Contagem de bactérias heterotróficas, quimioautotróficas e *Vibrio* spp.

Amostras de água (n=3 por tratamento) para análises microbiológicas foram tomadas através de tubos falcon de 50 mL, cujo ponto de retirada foi o centro do tanque circular com aeração, em três tempos: após 31, 44 e 53 dias do início do povoamento dos tanques experimentais.

Após homogeneização das amostras em solução salina estéril (NaCl 0,85%), foram realizadas diluições sucessivas (1:10) em oito vezes (10⁻⁸). Foram inoculados 30 µL de cada amostra diluída em placas contendo os meios Ágar Marinho (AM, Himedia[®]) e Agar

Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia[®]) para contagem de bactérias heterotróficas e vibrios, respectivamente, e 1mL de cada amostra diluída foi inoculado em profundidade para o meio sólido específico de bactérias quimioautotróficas (0,5g (NH₄)₂SO₄, 0,5g NaHCO₃, 13,5g Na₂HPO₄ ou K₂HPO₄, 0,1g MgSO₄.7H₂O, 0,014g FeCl₃.6H₂O e 0,18g CaCl₂.2H₂O em 1000 mL de água destilada). As placas foram incubadas a 30°C por 24h e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

2.4. Desempenho zootécnico

Parâmetros de crescimento foram realizados quinzenalmente com amostras equivalentes a 10% da população de cada parcela experimental para avaliar o desempenho dos camarões através do ganho de peso (peso final - peso inicial), sobrevivência (nº final de camarões / nº inicial de camarões) x 100), peso médio final (biomassa final / nº de indivíduos ao final do cultivo), ganho de biomassa (biomassa final - biomassa inicial), taxa de crescimento específico [TCE %/dia = (ln peso final - ln peso inicial) / tempo de cultivo x 100] e produção (biomassa final / volume da unidade experimental).

2.5. Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar os efeitos da adição de melaço em diferentes relações C/N, complementada pelo teste de Duncan ao nível de probabilidade de 5%. Os dados de sobrevivência foram transformados pelas funções *arcsen* $x^{0,5}$. Nos casos onde persistiu a heterogeneidade de variâncias, foi aplicada a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis (p<0,05). As análises estatísticas foram realizadas de acordo com Zar (1996) e os cálculos foram desenvolvidos com o auxílio do software SysEAPRO v. 1.0.

Os dados de quantificação bacteriana foram previamente transformados em log (x). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey (p<0,05) utilizando o software SASM-Agri 8.1.

3. Resultados

3.1. Fatores de qualidade da água e desempenho zootécnico

As variáveis físico-químicas de qualidade da água estão sumarizadas na Tabela 1. Todas as variáveis estiveram dentro da faixa de conforto fisiológico para *L. vannamei* e não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos experimentais. Foram obtidos os valores médios de temperatura a 27,9°C, oxigênio dissolvido entre 4,9 e 5,2 mg/L, pH entre 7,6 e 7,8, salinidade em 33 g/L, transparência de 14 a 16 cm, sólidos suspensos entre 0,23 e 0,34 mg/L, alcalinidade entre 107,2 e 142,6 mg CaCO₃/L, nitrito entre 0,17 e 0,37 mg/L, nitrato entre 0,57 e 1,21 mg/L e amônia entre 0,47 e 0,75 mg/L.

Não houve influência das diferentes relações carbono/nitrogênio sobre o peso final, a taxa de crescimento específico (TCE), o ganho de peso, o ganho de biomassa e a produção até o final do cultivo (Tabela 2). Os pesos médios finais dos camarões entre os tratamentos apresentaram peso médio acima de 10 g. O ganho de biomassa nos tratamentos 25M e 30M apresentaram valores superiores aos demais (699,1 g e 592,0 g, respectivamente). As médias de TCE (%/dia) variaram entre 3,7 e 4,0; e maior produção em g/m² foi observada no tratamento 25M, seguida do 30M (Tabela 2). Os dados de sobrevivência diferiram significativamente ($p < 0,05$) e chegaram a valores de 85,2% e 79,6% nos tratamentos 25M e 30M, respectivamente, e menor média no tratamento 20M com 63,7% de sobrevivência (Tabela 2).

3.2. Contagem de bactérias da água de cultivo

Devido à fertilização orgânica aplicada, os experimentos conduzidos em sistema heterotrófico apresentaram elevadas quantificações de bactérias heterotróficas (Tabela 3). Diferenças significativas de contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT), de bactérias autotróficas totais (BAT) e de *Vibrio* spp. foram encontradas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Maior concentração de contagem de BHT foi encontrada em tanques onde a relação C/N foi de 15:1, atingindo uma média de contagem de $1,57 \cdot 10^7$ UFC/mL (Tabela 3). Tal dado

implica que não é preciso aumentar a fonte de carbono para atingir relações maiores de C:N a fim de promover um maior crescimento deste grupo de bactérias. A condição heterotrófica também favoreceu um crescimento significativo de BAT ($1,38.10^6$ UFC/mL no tratamento 30M). A menor concentração de vírios foi na relação 25:1 (25M) com uma população de $5,16.10^3$ UFC/mL, seguida da 30M (Tabela 3). Avaliando somente as relações C:N (15:1, 20:1, 25:1 e 30:1), as médias de contagem de BHT durante todo o período de cultivo seguiram a ordem da menor relação para a maior, não sendo observado essa tendência nas médias dos outros grupos de bactérias (BAT e *Vibrio* spp.) (Tabela 3).

O crescimento bacteriano heterotrófico (BHT) apresentou um acréscimo populacional com o tempo de cultivo, independentemente da taxa de fertilização com melaço aplicada (Figura 1a); o mesmo aconteceu com bactérias autotróficas e com a população de bactérias do gênero *Vibrio*, porém neste último grupo bacteriano avaliado esse acréscimo na contagem UFC/mL foi mais discreto (Figura 1b,c). Vale ressaltar que a menor variação de BHT com o tempo foi percebida no tratamento que utilizou a relação 30:1 (30M), que teve um comportamento quase linear. De acordo com os gráficos, nota-se que a população de BHT permaneceu mais concentrada durante todo o tempo de cultivo (Figura 1a).

4. Discussão

Os valores de pH se mantiveram abaixo de 8 (Pillay, 1990) e, a faixa de temperatura, próxima da ideal para a espécie *L. vannamei*, entre 26°C a 33°C (Nunes, 2002). A salinidade média ($33 \pm 2,47\%$) permaneceu dentro da faixa adequada para o cultivo da espécie (Audelo-Naranjo et al., 2011) e, por se tratar de uma espécie eurihalina, o *L. vannamei* suporta uma ampla variação de salinidade (0 a 50‰) (Bett e Vinatea, 2009; Kumlu et al., 2010).

As concentrações de amônia permaneceram abaixo dos níveis citados por Lin e Chen (2001) que recomendam uma faixa de segurança para juvenis de *L. vannamei* entre 3,55-3,95 mg.L⁻¹ (salinidade de 25-35‰) após testes de toxicidade aguda; porém, esses níveis mais

baixos não interferiram no desempenho do animal. De acordo com Samocha et al. (2007), a adição de melaço é uma ferramenta eficaz para manter baixos níveis de amônia, provavelmente devido à sua utilização por bactérias nitrificantes. A concentração de nitrato ($\text{NO}_3 \text{ mg.L}^{-1}$) é variável e pode mudar com os tipos de gestão de cultivo adotados (Correia et al., 2014). As tendências gerais ao longo do tempo das concentrações de amônia, nitrito e nitrato encontradas neste estudo foram esperadas, uma vez que a cultura foi iniciada usando água clorada limpa, e estas variáveis não se correlacionaram com as diferentes relações C:N.

A transparência é normalmente usada na aquicultura como parâmetro de gerenciamento no controle da qualidade de água; é utilizada como indicadora de concentração de fitoplâncton. Possivelmente, o maior aporte de carbono orgânico no sistema permitiu o desenvolvimento de flocos bacterianos, aumentando a quantidade de sólidos orgânicos suspensos, e consequentemente, reduzindo a entrada de luz e a transparência. Nas maiores relações (25:1 e 30:1), a maior disponibilidade de sólidos suspensos pode estar relacionada aos melhores valores de ganho de biomassa (g) e produção (g/m^2) do animal cultivado. Luis-Villaseñor et al. (2015) utilizando sistema BFT com *L. vannamei* na relação 7.1:1 (C:N) obteve valor referente à taxa de crescimento específico de $1,40 \pm 0,11$ (%/dia); neste estudo variou de 3,7 a 4,0 ($\pm 0,1$ %/dia), o que foi melhor devido ao incremento da fonte de carbono. Ainda em relação aos mesmos autores, foi observada uma sobrevivência de 70% (Luis-Villaseñor et al., 2015). Uma baixa influência no desempenho em sistemas de cultivo de camarão com troca de água zero ou limitada foi observada por Devaraja et al. (2002) e Patnaik et al. (2007), indicando que as melhorias de parâmetros zootécnicos em sistemas de bioflocos podem mudar de acordo com as condições de cultivo, como densidade de estocagem, por exemplo. Tanto Arantes (2007) quanto Samocha et al. (2007) não encontraram diferenças nos índices de crescimento e conversão alimentar de *L. vannamei* com diferentes fertilizações com melaço e consequente maior disponibilidade de bioflocos (sólidos suspensos).

Resultados referentes às contagens bacterianas indicaram predominância de bactérias heterotróficas na biorremediação da água de cultivo e no possível controle da população vibriônica. Devaraja et al. (2002), estudando mudanças em populações microbianas em lagoas tratadas com e sem probióticos comerciais, encontrou similarmente uma alta densidade de bactérias heterotróficas em todos os tratamentos. Burford et al. (2003) obtiveram um total de contagem de bactérias heterotróficas de $5,42 \cdot 10^7 (\pm 1,78)$ UFC/mL em um período de 47 dias de cultivo na relação C:N de aproximadamente 5:1 do material particulado encontrado no cultivo de *L. vannamei* em sistema intensivo, embora neste caso as bactérias tenham sido contadas por epifluorescência, o que produz valores mais altos do que o método utilizado neste trabalho (Maki e Remsen, 1981). Também foram encontradas populações de $8,15 \cdot 10^6 (\pm 2,9)$ UFC/mL de bactérias heterotróficas (meio AM) e de $1,58 \cdot 10^4 (\pm 0,4)$ UFC/mL de *Vibrio* na relação 7.1:1 em estudos em sistema BFT com *L. vannamei* realizados por Luis-Villaseñor et al. (2015). Resultados de contagem similares foram obtidos por Arantes (2007) em relação à quantificação de bactérias heterotróficas em sistema heterotrófico de cultivo de *L. vannamei* sob as condições 20:1 e 30:1 (C:N), onde atingiu médias de $1,4 \times 10^7$ e $1,7 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente; nessas mesmas relações, os autores encontraram uma população de víbrios de $6,1 \times 10^6$ UFC/mL em ambas. No presente estudo, a população de *Vibrio* foi menos representativa em todos os grupos experimentais.

Foi observado, também, que não foi preciso aumentar a fonte de carbono para aumentar o número de bactérias. Apesar das altas entradas de carbono orgânico e nitrogênio, resultando em relações de C:N mais altas, o crescimento bacteriano pode ter se limitado pela maior disponibilidade de C, como ocorreu com a população heterotrófica na relação 30:1; houve, também, menor disponibilidade de oxigênio dissolvido nesta relação, o que não relaciona ao consumo por bactérias. As bactérias heterotróficas contribuíram para os processos de nitrificação seguida de desnitrificação já que foram encontrados valores baixos de amônia, nitrato e nitrito nos quatro tratamentos. Além disso, o aumento da disponibilidade

de carbono orgânico se relacionou à diminuição do processo de nitrificação, visto na condição 30M cuja média para nitrato (mg/L) esteve mais elevada, condizendo com a menor população heterotrófica neste tratamento.

A concentração de *Vibrio* é um dos fatores mais importantes que afetam o desempenho do cultivo, e de acordo com Luis-Villaseñor et al. (2013), várias espécies de *Vibrio* presentes no bioflocos não são benéficas para o camarão, o que pode provocar perdas significativas no cultivo do animal. Concomitantemente, menor população de víbrios foi encontrada no tratamento 25M onde, no mesmo, foi encontrada a maior média de sobrevivência (85,2%). Não houve correlação dos melhores índices de sobrevivência (25M e 30M) com parâmetros físico-químicos, tornando possível fazer somente a ligação deste parâmetro com as menores concentrações de bactérias do gênero *Vibrio*. Houve o predomínio da população de bactérias heterotróficas e autotróficas em todos os tratamentos e durante todo o tempo de cultivo; este fato foi o principal responsável pela ação antagônica para o controle de *Vibrio* spp., já que competem pelo ambiente. O surgimento das bactérias autotróficas acontece entre 15-22 dias após o início da fertilização orgânica da água (Avnimelech, 2012). Entretanto, as vias heterotróficas e autotróficas de controle da amônia na água do cultivo não são excludentes e podem estar presentes simultaneamente ao longo de todo cultivo. Neste estudo, essas populações se mantiveram em uma leitura de 10^7 e 10^6 UFC/mL, respectivamente.

Sistema de bioflocos é uma alternativa eficiente contra patógenos, mantém a qualidade da água em níveis ótimos e aumenta a sobrevivência e o crescimento de camarão por ser uma técnica que se utiliza de um manejo controlado (Crab et al., 2010; Crab et al., 2012; Xu e Pan, 2013). Sistemas aquícolas baseados no aporte de fontes orgânicas de carbono demandam uma maior quantidade de oxigênio dissolvido e, portanto, necessitam de um sistema de aeração bastante eficiente que favorece a degradação de nitrogênio tóxico e outros compostos pela comunidade bacteriana (Avnimelech, 2009). Este fato explica a importância

do estímulo do proliferação de microbiota benéfica dentro do sistema de cultivo, atuando na melhoria da qualidade da água ou na decomposição de matéria orgânica, além de atuar como biocontrole do aumento populacional de bactérias do gênero *Vibrio*. Adicionalmente, o incremento populacional de bactérias heterotróficas está relacionado ao aumento de bioflocos (agregados microbianos) na água, e este serve de alimento direto para o camarão cultivado por ser onívoro.

5. Conclusão

A concentração de bactérias heterotróficas foi maior nas menores relações C:N e houve uma tendência à uma sucessão populacional microbiológica de acordo com o tempo de cultivo. O incremento na abundância de bactérias não contribuiu para aumentar a conversão alimentar e o crescimento dos camarões. A prevalência de bactérias heterotróficas e autotróficas provavelmente contribuiu para a baixa populacional de bactérias do gênero *Vibrio*.

Conflitos de interesse: não

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) – Brasil. Os autores gostariam de agradecer ao Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) pelo fornecimento de equipamentos e por possibilitar o experimento.

Referências

- 308 APHA/AWWA/WEF., 1995. Standart methods for the examination of water and
309 wastewater. 19 ed., Washington: APHA.
- 310 Arantes, R.F., 2007. O efeito da relação carbono-nitrogênio sobre a comunidade microbiana
311 no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação. Dissertação de
312 mestrado, Florianópolis: UFSC. 39p.
- 313 Audelo-Naranjo, J.M., Martínez-Córdova, L.R., Voltolina, D., Gómez-Jiménez, S., 2011.
314 Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* in experimental closed systems with artificial
315 substrates. Hidrobiológica. 22, 1-7.
- 316 Avnimelech, Y., 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems.
317 Aquaculture. 176, 227-235.
- 318 Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology: a practical guide book. The World Aquaculture
319 Society, Baton Rouge, Louisiana. 182p.
- 320 Avnimelech, Y., 2012. Biofloc Technology: A Practical Guide book. 2. Ed. Louisiana, United
321 States: The World Aquaculture Society. 283p.
- 322 Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., Abreu, L., Wasielesky, W. Jr.,
323 2010. Effect of pratical diets with different protein levels on the performance of
324 *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs
325 intensive system. Aquaculture Nutrition. 16, 163–172.
- 326 Bett, C., Vinatea, L., 2009. Combined effect of body weight, temperature and salinity on
327 shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. Braz. J. Oceanogr. 57, 305-314.
- 328 Burford, M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., Pearson, D.C., 2003. Nutrient
329 and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize.
330 Aquaculture. 219, 393-411.
- 331 Correia, E.S., Wilkenfeld, J.S., Morris, C., Wei, L., Prangnell, D.I, Samocha, T.M., 2014.
332 Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using

- 333 two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system.
 334 Aquacult. Eng. 59, 48-54.
- 335 Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture:
 336 beneficial effects and future challenges. Aquaculture. 356-357, 351-356.
- 337 Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The application of
 338 bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic
 339 *Vibrio harveyi*. J. Appl. Microbiol. 109, 1643-1649.
- 340 Devaraja, T.N., Yusoff, F.M., Shariff, M., 2002. Changes in bacterial populations and shrimp
 341 production in ponds treated with commercial microbial products. Aquaculture. 206, 245-
 342 256.
- 343 Ebeling, J.M., Timmons, M.B., Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry
 344 of photo-autotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in
 345 aquaculture systems. Aquaculture. 257, 346-358.
- 346 Ferreira, G.S., Bolívar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P.,
 347 Seiffert, W.Q., 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of
 348 *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 448, 273–279.
- 349 Kumlu, M., Türkmen, S., Kumlu, M., 2010. Thermal tolerance of *Litopenaeus vannamei*
 350 (Crustacea: Penaeidae) acclimated to four temperatures. J. Thermal. Biol. 35, 305-308.
- 351 Lin, Y.C., Chen, J.C., 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone
 352 juveniles at different salinity levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259, 109-119.
- 353 Luis-Villaseñor, I.E., Castellanos-Cervantes, T., Gomez-Gil, B., Carrillo-García, A.E.,
 354 Campa-Córdova, A.I., Ascencio, F., 2013. Probiotics in the intestinal tract of juvenile
 355 whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. World J.
 356 Microbiol. Biot. 29, 257-265.
- 357 Luis-Villaseñor, I.E., Voltolina, D., Audelo-Naranjo, J.M., Pacheco-Marges, M.R., Herrera-
 358 Espericueta, V.E., Romero-Beltrán, E., 2015. Effects of biofloc promotion on water

quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive culture. Italian Journal of Animal Science. 14:3, 3726.

Maki, J.S., Remsen, C.C., 1981. Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. Appl. Environ. Microb. 41, 1132-1138.

Nunes, A.J.P., 2002. Tratamento de efluentes e recirculação de água na engorda de camarão marinho. Revista Panorama da Aquicultura. 12, 27-39.

Patnaik, S., Samocha, T.M., Kilgen, M.B., 2007. Probiotics found ineffective against *Vibrio harveyi* in limited-exchange shrimp pond study. Global Aquacult. Advocate. 9/10, 94-96.

Pillay, T.V.R., 1990. Aquaculture: Principle and Practices. Fishing Book News, London, 575p.

Samocha, T.M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A., Brock, D.L., 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. Aquacult. Eng. 36, 184-191.

Xu, W., Pan, L., 2013. Enhancement of immune response and antioxidante status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating hight C/N ratio of feed input. Aquaculture. 412: 413, 117-124.

Zar, J.H., 1996. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall. 662p.

385 Tabela 1. Médias ($\pm$ erro padrão) das variáveis de qualidade de água, temperatura ($^{\circ}\text{C}$),
386 oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH, salinidade (g/L), transparência (cm), nitrito ($\text{NO}_2 \text{ mg.L}^{-1}$),
387 nitrato ($\text{NO}_3 \text{ mg.L}^{-1}$), sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}), amônia (TAN mg.L^{-1}) e alcalinidade
388 ($\text{mg de CaCO}_3.\text{L}^{-1}$) do cultivo do camarão *L. vannamei* em diferentes relações
389 carbono/nitrogênio 15:1 (15M), 20:1 (20M), 25:1 (25M) e 30:1 (30M).

Variáveis	Tratamentos			
	15M	20M	25M	30M
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	27,9 $\pm$ 1,6	28,0 $\pm$ 1,7	28,1 $\pm$ 1,8	27,8 $\pm$ 1,7
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,2 $\pm$ 0,6	5,1 $\pm$ 0,6	4,9 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,7
pH	7,6 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 1,1
Salinidade (g/L)	33 $\pm$ 2,5	33 $\pm$ 2,6	34 $\pm$ 2,3	34 $\pm$ 2,7
Transparência (cm)	16 $\pm$ 7,3	15 $\pm$ 7,1	15 $\pm$ 7,7	14 $\pm$ 8,1
Nitrito (mg/L)	0,37 $\pm$ 0,32	0,34 $\pm$ 0,29	0,22 $\pm$ 0,30	0,17 $\pm$ 0,22
Nitrato (mg/L)	0,78 $\pm$ 0,74	0,57 $\pm$ 0,39	0,88 $\pm$ 0,55	1,21 $\pm$ 1,26
Sólidos Suspensos (mg/L)	0,23 $\pm$ 0,17	0,30 $\pm$ 0,21	0,31 $\pm$ 0,22	0,34 $\pm$ 0,26
Amônia (mg/L)	0,69 $\pm$ 0,39	0,75 $\pm$ 0,30	0,75 $\pm$ 0,34	0,47 $\pm$ 0,38
Alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3 / \text{L}$)	107,2 $\pm$ 32,8	118,4 $\pm$ 34,7	123,4 $\pm$ 32,5	142,6 $\pm$ 26,1

390
391
392
393
394
395
396
397

398 Tabela 2. Médias ($\pm$ erro padrão) para parâmetros de cultivo de *L. vannamei* em diferentes
399 relações carbono/nitrogênio: peso inicial, peso final, taxa de crescimento específico (TCE),
400 ganho de peso, sobrevivência, ganho de biomassa e produção.¹

Variáveis	Tratamentos			
	15M	20M	25M	30M
Peso inicial (g)	1,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
Peso final (g)	11,3 $\pm$ 1,6	10,9 $\pm$ 1,2	10,6 $\pm$ 1,1	10,1 $\pm$ 1,0
TCE (%/dia)	4,0 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,1
Ganho de peso (g)	9,9 $\pm$ 1,7	9,4 $\pm$ 1,1	9,3 $\pm$ 1,1	8,6 $\pm$ 1,0
Sobrevivência (%)	69,3 $\pm$ 4,0 ^{ab}	63,7 $\pm$ 6,8 ^b	85,2 $\pm$ 2,3 ^a	79,6 $\pm$ 8,0 ^a
Ganho de biomassa (g)	571,3 $\pm$ 125,5	489,4 $\pm$ 109,2	699,1 $\pm$ 105,4	592,0 $\pm$ 137,5
Produção (g/m ²)	700,3 $\pm$ 118,8	622,3 $\pm$ 109,4	816,1 $\pm$ 110,8	726,1 $\pm$ 144,6

401 ¹Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas
402 entre os tratamentos (p<0,05).

403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413

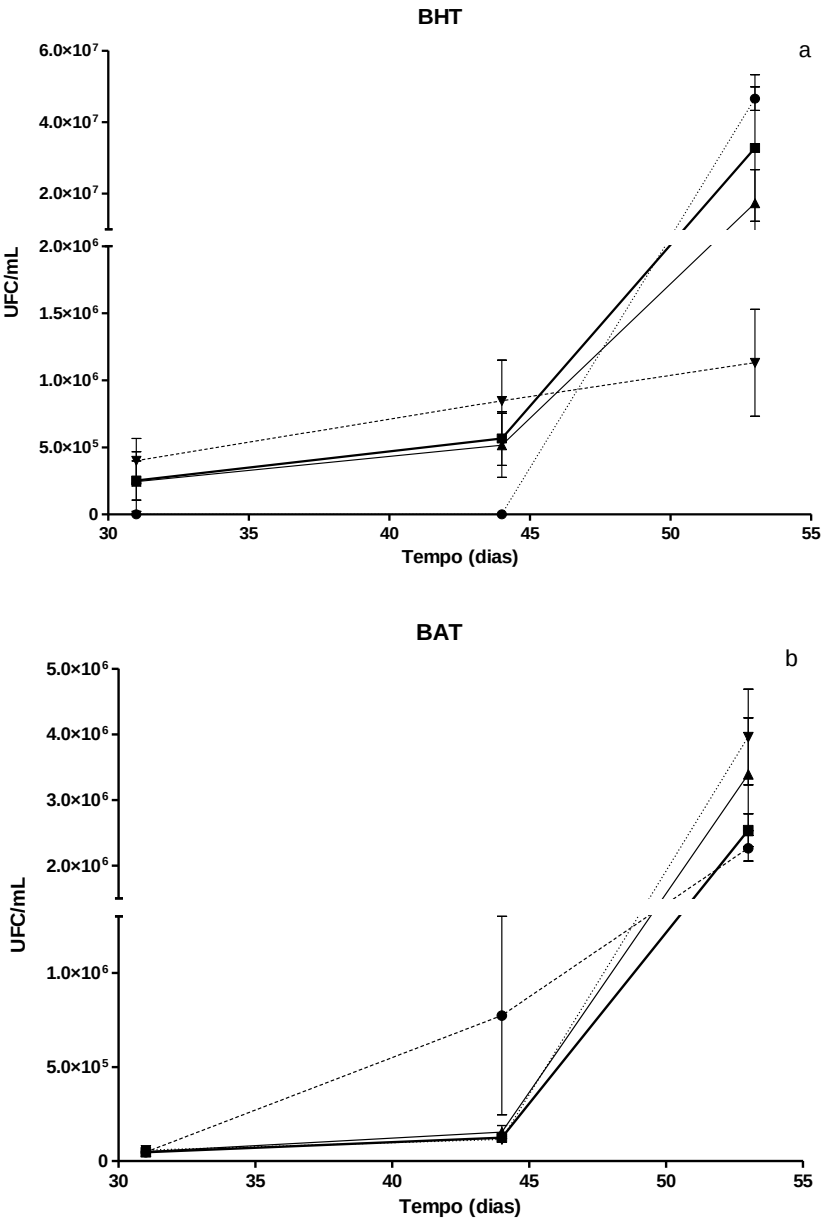
Tabela 3. Valores das médias (± erro padrão) de contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT), bactérias autotróficas (BAT) e *Vibrio* spp. (TCBS) em amostras de água de cultivo de *L. vannamei*.¹

Tratamentos	BHT (UFC/mL)	BAT (UFC/mL)	TCBS (UFC/mL)
15M	1,57x10 ⁷ ± 9,81x10 ⁶ ^a	1,03x10 ⁶ ± 4,38x10 ⁵ ^{ab}	1,59x10 ⁴ ± 6,23x10 ³ ^a
20M	1,12x10 ⁷ ± 8,64x10 ⁶ ^{ab}	9,04x10 ⁵ ± 5,22x10 ⁵ ^b	7,53x10 ³ ± 3,08x10 ³ ^{ab}
25M	6,04x10 ⁶ ± 4,32x10 ⁶ ^{bc}	1,19x10 ⁶ ± 7,28x10 ⁵ ^{ab}	5,16x10 ³ ± 3,59x10 ³ ^b
30M	7,93x10 ⁵ ± 1,92x10 ⁵ ^c	1,38x10 ⁶ ± 8,38x10 ⁵ ^a	6,29x10 ³ ± 3,31x10 ³ ^{ab}

¹Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05).

Legenda da figura

Figura 1. Variação de contagem (UFC/mL) de a) Bactéria Heterotrófica Total (BHT), b) Bactéria Autotrófica Total (BAT) e c) *Vibrio* spp. na água de cultivo de *Litopenaeus vannamei* utilizando sistema de bioflocos em diferentes relações carbono/nitrogênio e durante 31, 44 e 53 dias. Pontos dos dados simbolizam as médias ($\pm$ erro padrão).



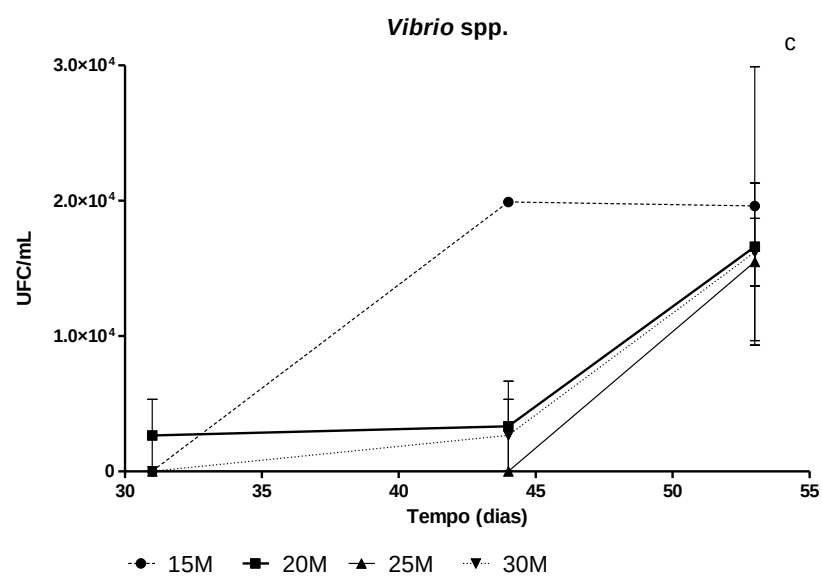


Figura 1

4 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DE *Litopenaeus vannamei* E AVALIAÇÃO *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillus* COMO PROBIÓTICO

Carolina Kropniczki Gouveia, Rogério William Santos Portela, José de Paula Oliveira, Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, Ranilson de Souza Bezerra

Isolamento e seleção de bactérias de *Litopenaeus vannamei* e avaliação *in vitro* de isolados de *Bacillus* como probiótico

Carolina Kropniczki Gouveia^a, Rogério William Santos Portela^a, José de Paula Oliveira^b,
Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva^c, Ranilson de Souza Bezerra^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco,
50670-901, Brazil, carolkrop@yahoo.com.br, portela.gene@gmail.com

^bInstituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50761-000, Brazil,
jose.paula@ipa.br

^cDepartamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois
Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil, suziannymaria@gmail.com

*Corresponding author: tel: +55 (81) 2126-8540, ransoube@uol.com.br (R.S. Bezerra)

19 **Resumo**

20 Adicionadas à dieta ou diretamente na água, as bactérias probióticas têm sido utilizadas para
21 controle biológico e aumento da digestibilidade alimentar e do sistema imune de camarão. O
22 isolamento de bactérias do próprio órgão do animal cultivado é o primeiro passo para a
23 seleção de um probiótico, pois demonstra a capacidade desses microrganismos de não serem
24 afetados pela atividade enzimática do hospedeiro. Partindo desse contexto, o objetivo deste
25 trabalho foi caracterizar e avaliar cepas isoladas de estômago e hepatopâncreas de
26 *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema heterotrófico através de testes *in vitro* para
27 seleção de probiótico. Primariamente, foi realizada uma pré-seleção conforme atividades
28 positivas para protease e amilase, seguida de identificação pelo sequenciamento do gene 16S
29 rRNA utilizando os primers fD1 e rD1. Os isolados do gênero *Bacillus* foram caracterizados
30 morfo-fisiologicamente e bioquimicamente, sendo também testados contra *Vibrio*
31 *parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V.alginolyticus* (IAL 1957), *V. mimicus* (DBBM/CDC
32 2279-80) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), e avaliados pela formação de biofilme
33 em monocultura e em cocultura. Foi obtida uma coleção heterogênea de 107 isolados
34 bacterianos do hepatopâncreas e estômago de *Litopenaeus vannamei*, porém apenas 20 foram
35 positivos para as atividades enzimáticas testadas. Os amplicons após sequenciamento do DNA
36 apresentaram tamanho maior que 1,1Kb e homologia com as bactérias dos gêneros *Bacillus* e
37 *Shewanella*. A cepa IPA 24 (*Bacillus amyloliquefaciens*) foi satisfatória em relação a
38 atividades enzimáticas e inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto as cepas IPA 56 (*B.*
39 *subtilis*) e IPA 58 (*Bacillus* sp.) tiveram maiores valores de Índice Enzimático para excreção
40 de amilase e atividade antagônica para o *Vibrio mimicus*. A cepa IPA 122 (*B. pumilus*)
41 apresentou maior IE quanto à excreção de protease e maior atividade de lipase, e IPA 239 (*B.*
42 *amyloliquefaciens*) elevada atividade de lipase. Todas as cepas produziram sideróforos e o

isolado IPA 58, em monocultura, se destacou pela formação de biofilme. Resultados indicaram bactérias candidatas a probiótico.

Palavras-chave: *Bacillus*, enzimas digestivas, composição bioquímica, 16S rRNA, camarão

1. Introdução

Apesar da rápida expansão da carcinicultura, o surgimento de doenças e deterioração das condições ambientais têm causado sérios prejuízos econômicos a este setor produtivo. A indústria do camarão experimentou severos recuos como resultado de surtos frequentes de doenças epidêmicas, particularmente causadas por *Vibrio* spp. ou vírus (Zheng e Wang, 2016).

Diante das grandes perdas na produção, desde a década de 1980, os probióticos são utilizados mundialmente na aquicultura como controle biológico de bactérias patogênicas e aumento do sistema imune dos camarões cultivados e da digestibilidade alimentar. No último caso, quando adicionados ao alimento, facilitam a digestão por causa das enzimas produzidas por estes microrganismos benéficos introduzidos que complementam a atividade enzimática total no sistema digestivo do animal (Ziaei-Nejad et al., 2006).

Microrganismos probióticos devem possuir a capacidade de sobrevivência no trato gastrointestinal, não provocar toxicidade e nem patogenicidade ao homem e nem aos animais, apresentar estabilidade durante o período de estocagem, permanecer viável por longos períodos em condições normais de armazenamento e ter capacidade de competir contra bactérias intestinais não desejáveis, demonstrando efeitos positivos ao hospedeiro (Ferreira et al, 2012). Vários autores confirmam o uso benéfico de microrganismos do gênero *Bacillus* na aquicultura pela capacidade de reduzir a quantidade de bactérias patogênicas e diminuir as concentrações de matéria orgânica na água, melhorando o ambiente de cultivo.

Adicionalmente, algumas espécies colonizam o trato intestinal de organismos aquáticos quando incorporados às dietas (Mouriño et al., 2010). Uma grande vantagem do uso deste tipo bacteriano é a sua capacidade de esporular, o que facilita a manipulação e inclusão em dieta deste microrganismo devido à resistência dos esporos ao processo de peletização. Além disso, são facilmente produzidos em escala comercial e incorporados em produtos comerciais (Ochoa-Solano e Olmos-Soto, 2006).

As espécies mais utilizadas na carcinicultura são *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. fusiformis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e, principalmente, *B. subtilis*. Espécies de *Bacillus amyloliquefaciens* são fenotipicamente similares a *B. subtilis* (Welker e Campbell, 1967). Entretanto, pesquisas que descrevam o uso de *B. amyloliquefaciens* como probiótico na aquicultura são escassas. O objetivo desse trabalho foi avaliar e caracterizar cepas bacterianas isoladas de estômago e hepatopâncreas de *L. vannamei* através de testes *in vitro* de excreção de enzimas, exclusão competitiva, antagonismo a patógenos comuns na carcinicultura e detecção de formação de biofilme para posterior utilização em cultivo de camarão em escala piloto.

2. Material e métodos

As cepas bacterianas foram tomadas de dois cultivos experimentais heterotróficos distintos realizados na Estação de Aquicultura (Base de Piscicultura) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e, as análises desta pesquisa, foram realizadas no Laboratório de Enzimologia (LABENZ) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e nos Laboratórios de Biologia do Solo e de Genoma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

O primeiro cultivo experimental com o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* foi realizado em 2008 na Estação de Aquicultura do Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), durante 52 dias, utilizando doze tanques circulares de fibra de vidro com água salgada (33 g/L), supridos por um sistema de aeração contínuo e sem renovação de água. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos e três repetições para cada uma das diferentes relações C:N, 15:1, 20:1, 25:1 e 30:1, usando uma densidade de estocagem de 90 camarões/m² (peso médio de 1,4 g). No segundo cultivo, camarões também da espécie *L. vannamei* (peso médio de 1,58 g) foram submetidas a quatro tratamentos e três repetições para cada por um período de 90 dias, sendo dois tratamentos experimentais em sistema heterotrófico com o uso de dois probióticos comerciais (HP1 e HP2) e dois controles: um em sistema autotrófico (Aut) e outro em heterotrófico (Het), ambos sem uso de probióticos.

2.1. Isolamento bacteriano

Amostras de camarões para isolamento de colônias bacterianas foram tomadas ao final do experimento em ambos os cultivos. De antemão, apenas as bactérias crescidas e isoladas de camarões cultivados nos tratamentos sem uso de probiótico foram submetidas às etapas seguintes ao isolamento, para seleção de bactérias candidatas de acordo com testes *in vitro*.

Os animais adultos (n=32) de peso médio final de 10,8 g (média de 10,7 g do primeiro cultivo e média de 10,9 g do segundo cultivo) foram sacrificados em banho de gelo e o hepatopâncreas e o estômago foram extirpados em condições estéreis. A desinfecção seguiu imersão em álcool 70% por 15 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) com 0,1% de tween-80 por 15 minutos e enxague por três vezes em água destilada esterilizada. O conteúdo interno foi semeado em placas contendo os meios Agar Marinho (AM, Himedia®) e Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia®), e incubados a

30°C por 24h em estufa bacteriológica. Todo material microbiológico crescido nas placas foi coletado por alça de platina, submetido à etapa de diluições sucessivas (1:10) em oito vezes (10^{-8}) em solução salina a 0,85% e foram inoculados 30 µL de cada amostra diluída nos mesmos meios sólidos para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) após incubação sob as mesmas condições. A partir da diluição 10^{-1} foram escolhidas as placas com maior diversidade morfológica de colônias para isolamento e, posterior estudo de excreção de enzimas digestivas e de identificação molecular da microbiota.

2.2. Seleção *in vitro* da coleção bacteriana

Para caráter de utilização como probiótico, a escolha se baseou prioritariamente pela excreção extracelular de enzimas como a protease (Price et al., 1982) e a amilase (Buzzini e Martini, 2002) através da formação de halo transparente ao redor da colônia (halo de degradação). A avaliação da atividade proteolítica foi realizada utilizando leite desnatado comercial como substrato e ágar bacteriológico na proporção de 1:1 (v/v) e a excreção de amilase foi avaliada através de Agar Amido (SA, Himedia®) com a adição de 1 mL de tintura de iodo após incubação para visualização do halo. Os testes foram conduzidos em triplicata.

A atividade hidrolítica das bactérias para as duas enzimas testadas foi estimada semiquantitativamente determinando o Índice Enzimático (IE) que expressa a relação direta do diâmetro do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (Rao et al., 1998).

2.3. Identificação por técnicas moleculares

Inicialmente, os isolados bacterianos com atividade enzimática foram submetidos à caracterização morfoquímica através da coloração de Gram. Esta definição foi necessária para a etapa posterior de extração de DNA cujo protocolo do kit utilizado se diferencia em um momento para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A bactéria *Bacillus subtilis*

(ATCC 6633) cedida pelo Departamento de Antibióticos da UFPE foi utilizada como controle do sequenciamento.

2.3.1. Extração do DNA

A extração de DNA bacteriano foi realizada por kit comercial da Axygen®, conforme as instruções do fabricante, recomendado para o isolamento rápido de até 20µg de DNA a partir de 1mL de amostra bacteriana ($\approx 10 \times 10^9$ colônias). A integridade do DNA extraído das bactérias foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 1X pH 8,0, a 76V durante 1 h, com marcador de massa molecular para quantificação de 100pb a 2000pb (*Low DNA mass Ladder* Invitrogen™), corado com Syber Gold (Invitrogen™), visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado (Loccus L-PIX HE).

2.3.2. Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

A sequência completa do gene 16S rRNA foi obtida por PCR utilizando os oligonucleotídeos fd1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e rd1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') para o domínio bactéria, segundo Weisburg et al. (1991). A reação foi realizada para um volume final de 25µL, contendo: 1x tampão PCR, MgCl₂ (2,6mM), dNTP (0,5mM), 1µM de cada *primer*, *Taq* DNA-polimerase (2,5U/µL Invitrogen™) e DNA (20ng/µL). As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler - BioRad), programado com um ciclo inicial de 3min a 94°C, seguido de 30 ciclos em desnaturação a 92°C por 50 seg, anelamento a 62,3°C por 50seg, e extensão 72°C por 1min e 45 segundos, finalizando com uma extensão a 72°C por 7min (Weisburg et al., 1991).

Os produtos de PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1,2% (p/v) com o marcador de peso molecular “100pb DNA Ladder” (Invitrogen™), purificados segundo Lyra (2001) e sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares localizada no Campus do Vale da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

2.3.3. Análise das sequências

As sequências do gene 16S rRNA obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados *Genbank* através do programa BLASTn (NCBI-www.ncbi.nih.gov) para o alinhamento local. Com o auxílio do programa CodonCode Aligner foi realizada a criação de sequências *contigs* entre os fragmentos sequenciados. Para a criação do banco de dados das cepas sequenciadas foi utilizado o programa OligoCalculator disponível no *website* <http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>. Através deste, foram obtidas informações sobre tamanho do fragmento do DNA de cada cepa bacteriana, peso molecular, conteúdo de guanina (G) e citosina (C), e temperatura de fusão (*Melting Temperature*) em °C.

2.4. Caracterização morfofisiológica e bioquímica

Foi realizada uma caracterização dos isolados do gênero *Bacillus* após sequenciamento quanto à similaridade morfofisiológica e bioquímica, sendo comparados aos controles, a dizer: *B. amyloliquefaciens* (UFPEDA 324), *B. subtilis* (ATCC 6633), *B. subtilis* (ATCC 19659) e *B. pumilus* (ATCC 14884). As duas primeiras foram cedidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e as duas últimas são procedentes da coleção do Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As bactérias ATCC (American Type Culture Collection) liofilizadas foram inicialmente recuperadas em meio TSB (caldo triptona de soja) e foram posteriormente semeadas em placas de Petri com meio de cultura TSA (ágar triptona de soja) acrescida de 2% NaCl para seguimento dos testes propostos.

A análise morfológica e fisiológica foi realizada em placas de Petri no meio Agar Nutriente (AN). Foram observadas as seguintes características morfológicas das colônias isoladas: forma (circular, puntiforme, irregular); borda (inteira, filamentosa, ondulada, lobada,

denteada); superfície (lisa, rugosa, lobulada); transparência (translúcida, opaco, transparente); cor (incolor, branca, creme, amarela, laranja, rosa, etc); elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada); e tamanho (<1mm, >1mm). Dentre as características fisiológicas avaliadas, encontram-se: tempo de crescimento (<24h, >24h); formação de muco (ausente, presente); e alteração no meio (ácido, alcalino, neutro) (Costa Júnior et al., 2009). A formação de ácidos e álcalis foi obtida através do meio 79 modificado (Reis et al.; 2011) com indicador azul de bromotimol e pH 7.

Para todas as determinações fisiológicas e/ou bioquímicas dos isolados foram realizadas três repetições de cada cepa bacteriana avaliada. Os testes realizados foram: produção de indol e de sulfeto de hidrogênio (H₂S), assim como a prova de motilidade (prova fisiológica) conduzidos usando-se o meio SIM (Sulfito, Indol e Motilidade) semi-sólido (0,5% de ágar) (Duff et al., 1957); oxidase em fitas comerciais (Probac do Brasil) seguindo instruções do fabricante (Mac Faddin, 1976); catalase utilizando H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) a 3% (Yano et al., 1991); atividade da enzima lipase com 0,001% de rodamina B acrescido de 1% de azeite de oliva ao ágar bacteriológico e avaliação através da irradiação de luz UV (359nm) com aparecimento de fluorescência ao redor das colônias (Stamford et al., 1998); degradação enzimática da uréia pela urease utilizando caldo de uréia (com vermelho de fenol e pH neutro) (Roberge e Knowles, 1966); detecção da produção de sideróforos adaptado de Schwyn e Neilands (1987) em meio TSL 1/10 (meio líquido de Tripticaseína de Soja diluído 10 vezes para diminuir o teor de ferro), através da incubação sob agitação constante (180rpm) a 30°C por 24h e adição da solução CAS após procedimento (ver Apêndice 1); e avaliação da capacidade de esporulação; para esta última, verificou-se a capacidade de produção de esporos resistentes ao calor baseado no choque térmico com aquecimento a 80°C

por 10 minutos e posterior resfriamento em gelo a -10°C por 10 segundos para confirmação do gênero *Bacillus* sp. (Leuschener et al., 2003) e posterior visualização em microscópio.

O teste qualitativo de crescimento bacteriano em diferentes temperaturas (5 °C, 30 °C e 50°C), pH (6, 7 e 8) e concentrações de cloreto de sódio (0, 17,5% e 35%) foi conduzido em meio Luria Bertani (LB) sólido.

Também foi realizada a avaliação por coloração do metabolismo bacteriano pelo meio Ágar TSI (tríplice-açúcar-ferro) distribuído em tubos inclinados e cuja constituição constou de glicose (0,1%), lactose (1,0%) e sacarose (1,0%), peptonas, aminoácidos, incluindo sulfurados, tiosulfato de sódio e citrato férrico amoniacal (indicador da produção de H₂S), com pH neutro e um indicador de pH (vermelho de fenol). Após incubação a 37°C por 24h, puderam-se observar os processos fermentativos dos açúcares (Edwards e Ewing, 1962).

2.5. Inibição de patógenos *in vitro*

A análise da produção de metabólitos com capacidade antimicrobiana foi realizada pelo teste de difusão em poço. Primeiramente, inóculos padronizados em solução salina 0,85% com 10⁸ cél/mL (escala 0,5 MacFarland) de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V. alginolyticus* (IAL 1957), *V. mimicus* (DBBM/CDC 2279-80) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) procedentes da coleção do Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foram semeados em superfície em meio Agar TSA (agar triptona de soja) com 2% de NaCl. Em seguida, culturas das bactérias em estudo foram crescidas por 24h a 30°C em meio TSA com 2% de sal e suspendidas em solução salina 0,85%, e ajustadas à mesma escala. Uma alíquota de 20µL dessas bactérias foi depositada em poços (6 mm) feitos com pipeta Pasteur de vidro nas placas com cada bactéria patogênica previamente semeada. Os testes foram conduzidos em triplicata e as placas foram incubadas a

uma temperatura de 37°C por 24h. Como controle negativo, foi utilizado 20µL de solução salina 0,85% para cada cepa patogênica testada.

A inibição de patógenos foi determinada pelo aparecimento de um halo (zona clara) inibitório produzido ao redor do poço impregnado com as bactérias em estudo. Os diâmetros dos halos foram mensurados (em mm) com o auxílio de paquímetro digital Zaas Precision® (300 mm), subtraindo-se o diâmetro dos poços.

2.6. Detecção de formação de biofilme

Foi realizada através do método de cultura de tecidos em placas (TCP) e de acordo com Christensen et al. (1985). As cepas de *Bacillus* IPA24 (*B. amyloliquefaciens* MF581452.1), IPA56 (*B. subtilis* AY905693.1), IPA58 (*Bacillus* sp. HM021765.1), IPA122 (*B. pumilus* DQ837545.1) e IPA239 (*B. amyloliquefaciens* HQ844500.1) foram testadas separadamente e em possíveis combinações de duas, três e quatro cepas. A escolha dessas cepas bacterianas se baseou de acordo com os resultados de atividades enzimáticas e da resposta antagônica aos víbrios testados.

Foram previamente crescidas em meio Caldo Soja Trypticaseína (TSB, Acumedia®) com 1% de glicose por 24h em estufa a 37°C. Em seguida, a biomassa crescida foi diluída 1/100 (volume/volume) em mesmo meio estéril. Os poços da microplaca estéril de poliestireno de fundo plano foram preenchidos com uma alíquota de 200µL das culturas diluídas e com o meio estéril sem cultura (controle) para checar esterilidade e ligação não específica do meio. As placas foram novamente incubadas por 24h a 37°C e, após o período, seguiram as etapas: remoção do conteúdo dos poços com inversão da placa; lavagem com 200µL de tampão salina fosfato (PBS pH 7,2) por quatro vezes; fixação das culturas com acetato de sódio 2%; e coloração com cristal violeta 0,1% (peso/volume) sendo o excesso de mancha removido com lavagens com água deionizada. Após secagem, a leitura da densidade

óptica (Abs 570nm) das bactérias aderentes foi realizada através de método imunoenzimático (ELISA). Para compensar a absorção de fundo, foi considerada a leitura do meio estéril, fixador e corante.

2.7. Análise estatística

Os resultados das atividades enzimáticas avaliadas foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA) e, posteriormente, as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) através do software SASM-Agri 8.1.

O experimento de biofilme foi realizado com seis réplicas para cada combinação. As análises estatísticas foram realizadas com análise de teste de variância unifatorial (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) através do software SASM-Agri 8.1.

3. Resultados e Discussão

3.1. Seleção e identificação da microbiota de camarão

As médias de contagem de UFC/mL de amostras de camarão para quantificação de bactérias heterotróficas em meio AM e de víbrios em meio TCBS revelaram a presença de uma concentração de 10^6 e 10^4 , respectivamente. Existe uma população microbiota dominante que é representado por bactérias heterotróficas, seguida por uma população sub-dominante de bactérias lácticas e uma população residual composta de uma grande variedade de microorganismos, incluindo víbrios, que pertencem à flora autóctone do meio ambiente marinho (Albinati, 2012). Vieira et al. (2010) e Mendes et al. (2009) relatam uma população semelhante desses grupos bacterianos no trato digestivo de *L. vannamei* no início do

experimento (tempo zero) chegando à uma população heterotrófica de 10^6 e vibriônica de 10^5 .

Do total de 107 bactérias isoladas dos órgãos dos animais cultivados, aproximadamente 56% (60 cepas) foram do meio AM e, os outros 44 % (47 cepas), do meio TCBS. Apesar da alta seletividade do meio TCBS para o gênero *Vibrio sp.*, de acordo com os resultados das análises feitas por identidade das sequências pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (apresentadas posteriormente), observou-se que o meio de cultura não possibilitou exclusivamente o isolamento do gênero de bactérias para o qual foi determinado, pois algumas cepas foram identificadas molecularmente como dos gêneros *Bacillus* e *Shewanella*.

Das bactérias isoladas, apenas 20 ($\approx 19\%$) foram positivas para alguma atividade enzimática testada de acordo com a Tabela 1. De um modo geral, a maioria das cepas apresentou atividade proteolítica com índices enzimáticos próximos, apesar de haver diferenças significativas, excetuando apenas os isolados IPA 55 e IPA 272, que não apresentaram esta atividade. Esta última cepa se mostrou eficiente quanto à excreção de amilase (IE = 7,67). Adicionalmente, as bactérias que obtiveram os maiores IE para protease, e que diferiram significativamente das demais, não apresentaram atividade amilolítica. Apesar de apenas aproximadamente 9% do total de isolados serem capaz de excretar amilase, os índices foram superiores em sua maioria aos mostrados pela atividade de protease (Tabela 1).

O Índice Enzimático (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais utilizados para avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido, pois o processo de seleção de microrganismos considerados como produtores de enzimas inclui a correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa dos mesmos (Oliveira et al., 2006). Esses autores recomendam um $IE \geq 2,0$ para considerar um microrganismo como produtor de enzimas em meio sólido. Em concordância a estes autores,

apenas as cepas IPA 34, IPA 54, IPA 264, IPA 273 e IPA 276 não foram satisfatórias quanto ao IE para uma ou duas atividades testadas e, dessa forma, não foram sequenciadas (Tabela 1).

Em relação à caracterização macromorfológica em placa contendo meio Ágar Nutritivo, as colônias positivas para as atividades enzimáticas supracitadas ($IE \geq 2,0$ para uma ou duas atividades testadas) se dividiram em apenas dois grupos com diferença na coloração da colônia entre branca e laranja, com exceção das cepas IPA 17, IPA 55 e IPA 272, cujas colônias são amarelas, sendo a IPA 17 diferente das outras duas. Dentre as cepas de colônia branca ou branca transparente, de tamanho médio a grande, borda irregular e variando entre seca e viscosa encontram-se: IPA 13, IPA 14, IPA 24, IPA 34, IPA S.51, IPA 56, IPA 58, IPA 122, IPA 239, IPA 240 e IPA 264. As cepas IPA 54, IPA S.252, IPA 273, IPA 275, IPA 276 e IPA 277 apresentam colônias alaranjadas circulares, bem similares, de borda lisa, tamanho médio e sem viscosidade.

Os isolados IPA 13, IPA 14, IPA 24, IPA 56, IPA 122, IPA 239, IPA 240, IPA 272 e IPA 275 foram caracterizados como Gram-positivos e, os demais, como Gram-negativos. A qualidade do DNA extraído foi vista por meio de eletroforese em gel de agarose e o aparecimento de uma única banda íntegra de alto peso molecular indicou que o processo foi bem sucedido.

Todas as cepas apresentaram *contigs* com tamanho superior a 1100pb, tamanho este esperado para o gene em questão. Com o programa BLASTn realizou-se uma pesquisa para comparação com o banco de dados genômicos. Todos os *contigs* apresentaram homologia com sequências depositadas no *GenBank* e cada isolado foi relacionado a uma espécie (acesso mais bem pontuado) de acordo com o menor valor E (E-value) e a maior similaridade (Tabela

2). A cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B.s.) utilizada como testemunha do sequenciamento validou os resultados.

As cepas apresentaram similaridade acima de 97%, excetuando-se a IPA 272 que apresentou 83% de similaridade com as sequências presentes no *GenBank* para uma bactéria não cultivável (Tabela 2). Quanto maior o *score*, melhor a porcentagem de identidade das cepas às sequências depositadas no *GenBank*. Segundo López et al. (2006), a identificação das bactérias em nível de espécie pode ser inferida quando a sequência do fragmento, comparada às outras sequências de 16S rRNA, apresentar valores acima de 97% de similaridade (Tabela 2).

No que se refere à identificação dos isolados, erros devido ao sequenciamento completo do gene 16S rRNA podem ocorrer devido a incongruências taxonômicas já existentes, como ocorreu com a cepa IPA 272 com 83% de identidade entre a sequência do isolado do camarão e o microrganismo relacionado do banco de dados (Wang et al., 2007). Além disso, a alta taxa de transferências horizontais de materiais genéticos em bactérias torna os genomas dinâmicos ocorrendo comumente perdas e incorporações de materiais genéticos (Gevers et al., 2005).

Os resultados mostraram dois grupos de bactérias: isolados da ordem Bacillales da classe Bacilli, dentro do filo Firmicutes, com a presença de apenas uma família, a Bacillaceae, contendo as cepas: IPA 14, IPA 24, IPA S.51, IPA 56, IPA 58, IPA 122, IPA 239 e IPA 240; e isolados do filo Proteobacteria, classe γ -proteobacteria e ordem Alteromonadales que compreende a família Shewanellaceae com os isolados IPA S.252 e IPA 277. Porém, as bactérias do filo Proteobacteria não foram consideradas para as etapas seguintes de seleção de probiótico.

Todos os isolados bacterianos apresentaram atividade de excreção de protease e a avaliação da capacidade de produção desta enzima foi determinada pela degradação da caseína. Proteases produzidas por espécies de *Bacillus* são de longe o grupo mais importante de enzimas explorado (Ochoa-Solano e Olmos-Soto, 2006). A exigência de proteína para camarões é uma importante consideração nutricional porque a proteína é o principal nutriente limitante para o crescimento (Kureshy e Davis, 2002) e o componente caro do alimento para camarão. Os microrganismos probióticos são frequentemente utilizados como aditivos para alimentação de animais de fazenda e animais de estimação e o gênero *Bacillus* é amplamente empregado para este propósito. Em alimentos para camarão, as bactérias probióticas podem facilitar a digestão de todas as proteínas constituintes, porque as enzimas produzidas pelas bactérias podem complementar a atividade da protease do camarão, aumentando digestibilidade alimentar. Além disso, as enzimas probióticas têm uma gama de pH mais larga do que as enzimas de camarão, resultando em um prolongamento do tempo de digestão do hospedeiro (Ochoa-Solano; Olmos-Soto, 2006). Das enzimas digestivas presentes no trato digestório de camarões, somente uma pequena parte é proveniente da microbiota (Ziaei-Nejad et al., 2006). Entretanto, o fornecimento de bactérias com essa atividade pode estimular a produção de enzimas pelo hospedeiro, incrementando o seu crescimento (Zhang et al., 2010).

A produção de amilase pelas bactérias auxilia na quebra do amido em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares. Para esta atividade, apenas os representantes do Grupo I foram capazes de excretar amilase, exceto a cepa *B. pumilus* IPA 122 que não hidrolisa amido. Bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. liqueniformis* destacam-se na produção de amilases ativadas em altas temperaturas. Por serem da família das endoamilases e catalisarem a hidrólise de ligações glicosídicas do amido, glicogênio e outros carboidratos,

estas enzimas possuem um papel importante no metabolismo de carboidratos em animais, plantas e outros organismos (Sajedi et al., 2005). De acordo com Abate et al. (1999), *Bacillus amyloliquefaciens* é uma das espécies mais amplamente utilizadas para a produção de α -amilase e proteases. *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* possuem, em média, de 17 a 36% de homologia entre as sequências de DNA (Seki e Oshima, 1989) e, apesar de ser eventualmente confundido com *B. subtilis*, as amilases que produzem possuem diferentes propriedades (Priest, 1993).

Informação sobre o metabolismo dos carboidratos dos crustáceos é limitado. Em geral, carboidratos complexos como amido ou glicogênio têm um maior valor nutricional para camarões peneídeos do que simples açúcares (Ochoa-Solano e Olmos-Soto, 2006). Por esse motivo, muitos pesquisadores têm sugerido o uso de carboidratos complexos em dietas de camarão como o amido, que sofre hidrólise enzimática antes da assimilação (Ochoa-Solano e Olmos-Soto, 2006). Neste estudo, foram selecionadas bactérias que excretam amilase para serem usadas como probióticas na dieta de camarão, por serem estas, capazes de induzir à uma melhor assimilação de carboidratos. O aumento de atividade de protease, amilase e lipase de protozoas, mysis e pós-larvas em *Fenneropenaeus indicus* utilizando *B. subtilis* foi reportado por Ziaei-Nejad et al. (2006), com resultados semelhantes reportados em *L. vannamei* em larvas e juvenis com adição de *B. coagulans* na água (Zhou et al., 2009).

3.2. Caracterização e avaliação dos isolados do gênero *Bacillus*

No meio utilizado para a caracterização morfofisiológica, as colônias não apresentaram variação para forma, transparência, cor e tamanho das colônias entre as cepas isoladas. Dentre as outras características, das oito cepas isoladas, pôde-se avaliar que: a borda variou entre borda inteira e ondulada; para a característica da superfície da colônia, apenas a IPA 56 e a IPA 122 apresentaram superfície lisa; somente duas cepas são Gram-negativas

(IPA S.51 e IPA 58); e a característica que mais variou foi a elevação da colônia compondo na maioria na forma umbonada (IPA 14, IPA S.51, IPA 58, IPA 239 e IPA 240), seguida da lente (IPA 24 e IPA 56) e apenas a IPA 122 apresentou-se com elevação umbilicada (Tabela 3).

Todas as cepas têm um crescimento rápido em estufa a 30°C com menos de 24h de incubação. As colônias das bactérias IPA S.51, IPA 56 e IPA 58 apresentaram formação de muco, sendo ausente nas demais, incluindo as ATCC. A característica que mais variou na avaliação fisiológica entre as cepas isoladas foi a alteração do meio 79 quanto à acidificação e/ou alcalinização, ou mesmo mantendo o meio em pH neutro. As cepas IPA 14, IPA 24, IPA 122 e IPA 239 acidificaram o meio de cultura, enquanto que as cepas IPA S.51, IPA 56, IPA 58 e IPA 240, não alteraram o pH (Tabela 3).

Todas as cepas isoladas foram negativas para urease, H₂S e indol. Resultados positivos foram em relação à motilidade, à formação de esporos e à catalase (Tabela 4). A leitura para a presença indireta de flagelos nas bactérias foi traduzida por motilidade positiva e é tida como característica do gênero *Bacillus* em sua maioria. O fenômeno de formação de endosporos (um só esporo por célula vegetativa) foi visualizado em microscópio e, para todos os isolados, apresentaram esporo central ou terminal, de forma esférica ou elipsoidal e não deformou a célula (Tabela 4). As bactérias catalase positiva evitam a toxicidade celular, podendo ser usadas no combate ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, é considerado como um mecanismo de proteção (Mbai et al., 2013).

O teste de oxidase para o gênero *Bacillus* varia muito entre as espécies, porém a maioria foi oxidase positiva, exceto a cepa IPA 122 (Tabela 4). A oxidase também conhecida como SOD (superóxido dismutase) está relacionada à proteção contra a toxicidade, assim como a catalase, e define praticamente se a espécie bacteriana é aeróbia (Mbai et al, 2013).

Os metabolismos das cepas bacterianas isoladas, juntamente com as bactérias tomadas como controle, fermentaram somente a glicose (Tabela 4).

Todas as cepas foram capazes de resistir à 50°C em estufa bacteriológica, porém cessaram crescimento após essa temperatura (55-60°C) e à 4°C quando estocadas em BOD. As bactérias isoladas foram tolerantes às concentrações de 17,5% e 35% de NaCl, além de crescerem em diferentes pH (6, 7 e 8) (Tabela 4).

De acordo com Cottrel e Kirchman (2004), existe uma relação entre a abundância de determinados grupos de bactérias ao longo de um gradiente salino, podendo haver um crescimento bacteriano lento em condições de alta salinidade. Dependendo da região, época do ano e índice de pluviosidade, a salinidade nos cultivos pode variar desde valores próximos a zero até com salinidade superior à oceânica (Araneda et al., 2008). De acordo com os resultados, as bactérias selecionadas suportam variações de salinidade, o que implica em uma melhor eficiência em distintos ambientes salinos, ou até em água doce.

Semelhante à salinidade, o pH não é constante em cultivos podendo variar desde próximo a 6, quando em sistema superintensivo (Vinatea et al., 2010), até 9 sob condição eutrofizada (Momoyama, 2004). Toro (2005), avaliou o pH do hepatopâncreas de camarões *L. vannamei*, submetidos a cultivo experimental, encontrando nestas condições pH variando entre 3,5 e 3,8. Entretanto, e de acordo com Gibson (1979), o pH do suco gástrico dos crustáceos decápodos varia do ácido à neutralidade (pH de 4,7 a 7,0). Como as cepas foram retiradas dos órgãos de camarões *L. vannamei* cultivados sob condições heterotróficas, supõe-se que também são resistentes à gradientes mais baixos de potencial hidrogeniônico.

O gênero *Bacillus* é extremamente heterogêneo tanto geneticamente (o conteúdo G/C das diversas espécies variam de 32% a 69%) quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc) e é composto por 141 espécies,

segundo Ash et al. (1991). Porém, não houve tanta variação dos ideótipos encontrados no interior dos órgãos extirpados do camarão que foram positivas para as atividades de protease e amilase, escolhidas como critério de seleção. Apesar das cepas IPA S.51 e IPA 58 serem Gram-negativas, a literatura descreve que uma colônia jovem de qualquer espécie desse gênero pode também responder como Gram-negativa. Sendo assim, não há como identificar bactérias por testes bioquímicos, e sim caracterizar. O isolado IPA 14 possui características morfológicas idênticas às cepas IPA 24, IPA 239 e IPA 240, cujos alinhamentos mais significativos pelo NCBI/GenBank, sugeriram *B. amyloliquefaciens*.

Foi verificado que todos os isolados bacterianos apresentaram atividade positiva para a enzima lipase (Tabela 4), observada pela emissão de fluorescência das colônias sob luz UV, merecendo destaque as cepas IPA 122 e IPA 239 por terem emitido forte fluorescência dos cristais formados, seguindo das cepas IPA 14, IPA 24, IPA 56 e IPA S.51, em ordem decrescente de intensidade de emissão. As estirpes Bs 19659 e Bp 14884 não apresentaram essa atividade, o que corrobora com a especiação ou perda devido ao processo de liofilização. Lipases bacterianas são principalmente extracelulares e os gêneros de bactérias produtoras desta enzima incluem *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Jaeger e Arpingy, 1999). A seleção de bactérias excretoras de lipase e, a inclusão destas na dieta de camarão, poderiam aumentar a digestibilidade e a assimilação de lipídios.

No método para detecção de produção de sideróforos (quelantes de ferro), a conversão da cor azul da solução CAS para amarelo dentro de 15min indicou a produção de sideróforos pelas cepas bacterianas IPA 24, IPA S.51, IPA 56, IPA 58, IPA 122 e IPA 239 (Tabela 4). O ferro é importante para crescimento da maioria das bactérias, porém é encontrado em baixas concentrações nos fluidos dos animais e na forma insolúvel $F3^{3+}$ (Verschuere et al., 2000).

Probióticos produtores de sideróforos podem deprimir o crescimento de patógenos em condições de limitação de ferro (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

Das cepas isoladas, apenas três apresentaram efeito antimicrobiano frente às cepas patogênicas testadas: a IPA 24 formou halo inibitório de $9,87 \pm 0,34$ mm para *P. aeruginosa*; a IPA 56 e a IPA 58 inibiram *V. mimicus* formando halos de $8,71 \pm 0,27$ e $8,62 \pm 0,24$ mm, respectivamente. Semelhante inibição *in vitro* foi relatada por *Bacillus pumilus* isoladas de tilápia (Aly et al., 2008) e *Bacillus* sp. (P64) isolado de hepatopâncreas de *L. vannamei* (Gullian et al., 2004) contra *V. harveyi* S2 com zona inibitória de 15,3 mm de diâmetro. *Bacillus* isolados de intestino de *L. vannamei* apresentaram atividade antagônica aos patógenos *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* com zonas de inibição de diâmetro de 11 e 17,5 mm, respectivamente (Luis-Villaseñor et al., 2011).

A atuação de um probiótico do gênero *Bacillus* no ambiente como biocontrolador inibindo o crescimento de bactérias patogênicas pode ser realizada por exclusão competitiva ou pela liberação de compostos antimicrobianos como biosurfactantes, bacteriocinas e sideróforos (Mukherjee et al., 2009).

3.3. Formação de biofilme em microplaca

Todas as culturas estavam numa concentração entre $4,1 \times 10^8$ UFC/mL (IPA 56) a $5,8 \times 10^8$ UFC/mL (IPA 24) no TSB_{GLU} após 24h de crescimento. Das 30 possíveis combinações entre as cinco bactérias testadas, os biofilmes de duas, três, quatro e cinco espécies combinadas estão representadas na Figura 1. As cepas IPA 24, IPA 122 e IPA 239 formaram menor biofilme quando em monocultura; porém, a IPA 122 quando em combinação com IPA 56 e/ou IPA 58, a formação foi estimulada, apresentando padrão de sinergismo. Tal fato pode indicar que interações interespecíficas levaram à formação cooperativa de biofilme. Houve interações nas combinações IPA 56+58, IPA 58+122 e IPA 56+58+122 baseadas na

densidade celular aumentada quando as culturas individuais IPA 56 e IPA 58 foram combinadas com a IPA 58, corroborando para a ideia de que o melhor formador de biofilme domina o biofilme (visto na IPA 58). Na combinação IPA 56+122 houve cooperação interespecífica. Nas outras combinações (quatro e cinco bactérias) ficou claro que não cooperaram para a indução de sinergismo (Figura 1).

A ideia de cooperação entre comunidades bacterianas se baseia na hipótese de ser uma consequência de espécies que se adaptam à presença uma da outra, levando à uma comunidade dependente. A habilidade individual de formação de biofilme não é necessariamente um indicador de potencial de formação de biofilmes com multiespecies (Burmølle et al., 2006; Bharathi et al., 2011). Esta mudança de padrão de biofilme de fraco para moderado ou forte pode ser o resultado de interações metabólicas (Møller et al., 1998), coagregação melhorada (Rickard et al., 2003), distribuição espacial organizada (Skillman et al., 1998) e/ou por facilitarem a ligação inicial da superfície (Simões et al., 2008; Klayman et al., 2009). Assim, espécies que não formam biofilmes podem se beneficiar das vantagens associadas à formação de biofilmes, incluindo proteção aprimorada ao estresse externo e disponibilidade de nicho expandida, através do engajamento com comunidades multiespecíficas. As cepas IPA 24 e IPA 239 foram determinantes na redução do biofilme quando foram combinadas, em comparação com as que melhor formaram biofilme, indicando alta prevalência de concorrência.

Lee et al. (2014) abordaram o efeito protetor de espécies resistentes em biofilme com três espécies de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas protegens* e *Klebsiella pneumoniae*). A espécie resistente protege a espécie mais sensível de compostos inibitórios e o conjunto dessas três permaneceu constante, o que implica que mecanismo de resistência são adquiridos em biofilmes multiespécies. Os exemplos são todos indicativos de sinergismo na

formação de biofilme, mas a prevalência e impacto desses efeitos entre as bactérias isoladas de ambientes naturais ainda não foram abordados.

Na dinâmica de cultivo de animais aquáticos, a velocidade e facilidade de expansão populacional de bactérias probióticas aliadas à capacidade de aderência à mucosa intestinal e à capacidade de formação de biofilme incrementam tanto na produção primária quanto em benefícios ao hospedeiro pela competição (exclusão competitiva) com patógenos oportunistas. Porém, não há estudos com bactérias isoladas de camarões para fazer a comparação da formação de biofilme e eventuais sinergismos entre multiespécies.

4. Conclusões

Dentre os caracteres avaliados para seleção, as cepas de *Bacillus* isoladas de *Litopenaeus vannamei* cultivados em experimento heterotrófico potencialmente probióticas mais promissoras foram: (1) IPA 24 (*B. amyloliquefaciens*) pelas atividades enzimáticas e por inibir *P. aeruginosa*; (2) e (3) IPA 56 (*B. subtilis*) e IPA 58 (*Bacillus* sp.) por apresentarem maiores valores de IE para excreção de amilase e por ambas apresentarem atividade antagônica ao *V. mimicus*; (4) IPA 122 (*B. pumilus*) por apresentar maior IE quanto à excreção de protease e maior atividade de lipase; e (5) IPA 239 (*B. amyloliquefaciens*) pela forte atividade de lipase, sendo estas também resistentes a variações de pH e NaCl. Resultados mostraram que a metodologia adotada para detecção de formação de biofilme pode servir como uma ferramenta quantitativa confiável para esta determinação, e a cepa IPA 58 atuou como dominante na formação de biofilme mostrando-se com elevada cooperação interespecífica quando em cocultura.

Conflito de interesses: não.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) – Brasil. Os autores gostariam de agradecer à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) pelo fornecimento de equipamentos e por possibilitar o experimento.

Referências

- Abate, C.M., Castro, G.R., Siñeriz, F., Callieri, D.A.S., 1999. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*. 21 (3), 249-252.
- Albinati, F.L., 2012. Isolamento e seleção de bactérias candidatas a probiótico para utilização em cultivo do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2012.
- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*. 25, 128-136.
- Araneda, M., Perez, E.P., Gasca-Leyva, E., 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. *Aquaculture*. 283, 13-18.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., COLLINS, M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters Applied Microbiology*. 13, 202-206.

- 563 Bharathi, P., Bhowmick, P., Shekar, M., Karunasagar, I., 2011. Biofilm formation by pure and
564 mixed culture of *Lactobacillus isolates* on polystyrene surface in varying nutrient
565 conditions. *Biotechnol Bioinf Bioeng.*, 1: 93–98.
- 566 Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S., 2006.
567 Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and
568 bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl*
569 *Environ Microbiol.*, 72, 3916–3923.
- 570 Buzzini, P., Martini, A., 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like
571 strains isolated from tropical environments. *Journal Applied Microbiology.* 93 (6), 1020-
572 1025.
- 573 Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.A., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton,
574 D.M., 1985. Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures a
575 quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin*
576 *Microbiol.* 22, 996–1006.
- 577 Costa Júnior, C.R., Silva, L.D.A., de Oliveira, A.V., de Sousa, C.A., Coutinho, A.E., Costa,
578 A.L., Lira Junior, M.A., 2009. Isolamento e caracterização morfológica de bactérias em
579 nódulos de leguminosas forrageiras. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão –
580 JEPEX. Recife –PE, Brasil.
- 581 Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2004. Single-cell analysis of bacterial growth, cell size and
582 community structure in the Delaware estuary. *Aquatic Microbial Ecology.* 34, 139-149.
- 583 Duff, J.T., Klerer, J., Bibler, R.H., Moore, D.E., Gottfried, C., Wright, G.G., 1957. Studies on
584 immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. II. Production and purification of type B
585 toxin for toxoid. *J Bacteriol.* 5, 597–601.

- 586 Edwards, P.R., Ewing, W.H., 1962. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing,
587 South Street, Minn., USA, 258p.
- 588 Ferreira, A.H.C., Araripe, M.N.B.A., Monteiro, C.A.B., Lopes, J.B., Araripe, H.G.A., 2012.
589 Uso de probióticos na aquicultura. Revista Eletrônica Nutritime. 9:5, 1965-1980.
- 590 Gervers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt,
591 E., Van de peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J., 2005. Opinion: Re-
592 evaluating prokaryotic species. Nature Reviews Microbiology. 3, 733-739.
- 593 Gibson, O., Barker, P.L., 1979. The decapod hepatopancreas. Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev.
594 17, 285-346.
- 595 Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of
596 their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 233, 1-14.
- 597 Jaeger, K.E., Arpingy, J., 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. J.
598 Mol. 343, 177-183.
- 599 Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture:
600 The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture.
601 274, 1-14.
- 602 Klayman, B.J., Volden, P.A., Stewart, P.S., Camper, A.K., 2009. *Escherichia coli* O157: H7
603 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell. Environ Sci
604 Technol., 43, 2105–2111.
- 605 Kureshy, N., Davis, D.A., 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight
606 gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 204, 125-143.
- 607 Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., Rice, S.A., 2014. Biofilm
608 development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community
609 biofilm. The ISME Journal, 8, 894–907.

- 610 Leuschner, R.G.K., Bew, J., Cruz, A., Adler, A., Auclair, E., Bertin, G., Braconnier, M.,
 611 Domig, K., Jones, P., Kneifel, W., Krause, M., Marmo, S., Michard, J., Mietke, H.,
 612 O'Briain, A., Olofson, A.S, Ruppitsch, W., Thalmann, A., Voets, A., Warmerdam, C.,
 613 2003. Enumeration of Probiotic *Pediococci* in Animal Feed: Interlaboratory Study. J.
 614 AOAC Internat. 86, 568-75.
- 615 López, M.A., Serna, F.J.Z.D., Jan-Roblero, J., Romero, J.M., Hernández-Rodríguez, C., 2006.
 616 Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of
 617 Mexico. FEMS Microbiology Ecology. 58, 145-154.
- 618 Lyra, M.C.C.P., 2001. Estudios genéticos y fisiológicos Del gen *nolT* de la región específica
 619 de cultivar, *nolxwbtuv*, de La bacteria de amplio rango de nodulación hh103 y SUS
 620 implicaciones em El sistema de secreción de tipo III (TTSS). 2001. Tese de Doutorado,
 621 Universidad de Sevilla, Sevilla.
- 622 Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M., Gómez-Gil, B., Valle, F.A., Córdova, A.I.C.,
 623 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus*
 624 *vannamei*. Aquaculture. 321, 136-144.
- 625 Mac Faddin, J.F., 1976. Biochemical tests for identification of medical bacteria. The Williams
 626 & Wilkins Company. 154.
- 627 Mbai, F.N., Magiri, E.N., Matiru, V.N., Ng'anga, A.J., Nyambati, V.C.S., 2013. Isolation and
 628 characterisation of bacterial root endophytes with potencial to enhance plant growth from
 629 Kenyan Basmati Rice. American International Journal of Contemporary Research. 3 (4),
 630 25-40.
- 631 Mendes, E.S., Lira, S., Góes, M.N.B., Dourado, J., Mendes, P.P., Bezerra, C.A., 2009. *Vibrio*
 632 spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. Ciência
 633 Animal Brasileira. 10 (4), 1191-1199.

- 634 Møller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskov, M., 1998.
635 *In situ* gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions
636 between community members. *Appl Environ Microbiol.*, 64, 721–732.
- 637 Momoyama, K., 2004. Mortalities of farm-raised Kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by
638 high pH ambient water due to blooms of a blue-green alga, *Chroococcus turgidus*. *Fish*
639 *Pathology*. 39, 129-135.
- 640 Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Silva, B.C., Vieira, F.N., 2010. Utilização de probióticos na
641 aquicultura. *Panorama da Aquicultura*. 20, 52-59.
- 642 Mukherjee, D., Coon, B.G., Edwards, D.F., Hanna, C.B., Longhi, S.A., Mccaffery, J.M.,
643 Wendland, B., Retegui, L.A., Bi, E., Aguilar, R.C., 2009. The yeast endocytic protein
644 Epsin 2 functions in a cell-division signaling pathway. *Journal Cell Science*. 122, 2453-
645 2463.
- 646 Ochoa-Solano, J., Olmos-Soto, J., 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds.
647 *Food Microbiology*. 23, 519-525.
- 648 Oliveira, S.S., Wasielesky, W., Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., 2006. Caracterização da
649 assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization"
650 (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*.
651 *Atlântica*. 28 (1), 33-45.
- 652 Price, M.F., Wilkinson, I.D., Gentry, L.O., 1982. Plate methods for detection of
653 phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 20, 7-14.
- 654 Priest, F.G., 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. IN: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A.,
655 Losick, R. (ED) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. Washington, D.C.:
656 ASM Press. 3-16.

- 657 Rao, M.B., Tanksale, A.M, Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and
658 Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 62 (3),
659 596-635.
- 660 Reis, V.M., Pitard, R.M., Dourado, F.S., Camacho, N.N., Videira, S.S., Camargo, A.B., Sorte,
661 P.F.B., Vidal, M.S., Schwab, S., Baldani, J.I., 2011. Caracterização morfo-fisiológica e
662 molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar. Seropédica:
663 Embrapa Agrobiologia.
- 664 Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., Handley, P.S., 2003. Bacterial
665 coaggregation: an integral process in the development of multispecies biofilms. Trends
666 Microbiol., 11, 94–100.
- 667 Roberge, M.R., Knowles, R., 1966. Ureolysis, immobilization and nitrification in black
668 spruce (*Picea mariana* Mill.)-humus, Soil science society of America Proceeding. 30,
669 201-204.
- 670 Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A.,
671 Moradian, F.A., 2005. Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from
672 the *Bacillus* sp. KR-8104. Enzyme and Microbial Technology. 36 (5-6), 666-671.
- 673 Seki, T., Oshima, Y., 1989. Taxonomic position of *B. subtilis*. IN: Maruo, B., Yoshikawa, M.
674 *Bacillus subtilis*: molecular biology and industrial applications. Amsterdam: Elsevier. 7-
675 25.
- 676 Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and
677 determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160, 47-56.
- 678 Simões, L.C., Simões, M., Vieira, M.J., 2008. Intergeneric coaggregation among drinking
679 water bacteria: evidence of a role for *Acinetobacter calcoaceticus* as a bridging
680 bacterium. Appl Environ Microbiol., 74, 1259–1263.

- Skillman, L.C., Sutherland, I.W., Jones, M.V., Goulsbra, A., 1998. Green fluorescent protein as a novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms. *Microbiology*, 144, 2095–2101.
- Stamford, T.L.M., Araújo, J.M., Stamford, N.P., 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ci. Tecnol. Aliment.* 18 (4), 382-385.
- Toro, C.R., 2005. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Florianópolis. 173p.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 655–671.
- Vieira, F.N., Buglione, C.C., Mouriño, J.P.L., Jatobá, A., Martins, M.L., Schleder, D.D., Andreatta, E.R., Barraco, M.A., Vinatea, L.A., 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harvey*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 (3), 631-638.
- Vinatea, L., Galvez, A.O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Shuler, A., Leffler, J.W., 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*. 42, 17-24.

- 703 Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid
 704 Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied*
 705 *Environmental Microbiology*. 7 (16), 5261-5267.
- 706 Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lupski, J.R., 1991. 16S ribosomal DNA
 707 amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173, 697-703.
- 708 Welker, N.E., Campbell, L.L., 1967. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and
 709 *Bacillus subtilis*. *Journal Bacteriology*. 94, 1124-1130.
- 710 Yano, D.M.Y., Atilli, D.S., Gatti, M.S.V., Eguchi, S.Y., Oliveira, U.M., 1991. Técnicas de
 711 microbiologia de controle de qualidade. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e
 712 Tecnologia “André Tosello”.
- 713 Zhang, Q., Ma, H., Mai, K., Zhang, W., Liufu, Z., Xu, W., 2010. Interaction of dietary
 714 *Bacillus subtilis* and fructo oligosaccharide on the growth performance, non-specific
 715 immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol*. 29, 204–
 716 211.
- 717 Zheng, C. N., Wang, W., 2016. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance,
 718 digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone,
 719 1931). *Aquaculture Research* 1-11.
- 720 Zhou, X.X., Wang, Y.B., LI, W.F., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaues*
 721 *vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities.
 722 *Aquaculture*. 287, 349-353.
- 723 Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M.,
 724 2006. The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity,
 725 survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*.
 726 252, 516-524.

727 Tabela 1. Valores das médias ($\pm$ erro padrão) para atividades semiquantitativas de protease e amilase de cepas bacterianas isoladas do
 728 hepatopâncreas e estômago de *L. vannamei* de acordo com Diâmetro da Colônia (DC), Diâmetro do Halo de Degradação (DHD) e Índice
 729 Enzimático (IE).¹

Cepa	Protease			Amilase		
	DC (mm)	DHD (mm)	IE	DC (mm)	DHD (mm)	IE
IPA13	28,00 $\pm$ 0,00	41,33 $\pm$ 1,33	1,48 $\pm$ 0,05 ^{de}	16,00 $\pm$ 3,06	32,67 $\pm$ 3,33	2,18 $\pm$ 0,37 ^b
IPA14	26,00 $\pm$ 1,15	41,33 $\pm$ 0,67	1,59 $\pm$ 0,05 ^{cde}	8,33 $\pm$ 1,76	25,67 $\pm$ 1,33	3,49 $\pm$ 0,99 ^b
IPA17	1,33 $\pm$ 0,17	3,10 $\pm$ 0,23	2,32 $\pm$ 0,01 ^a	-	-	-
IPA24	27,33 $\pm$ 1,33	39,33 $\pm$ 1,33	1,44 $\pm$ 0,02 ^{de}	5,67 $\pm$ 0,33	19,67 $\pm$ 0,33	3,49 $\pm$ 0,16 ^b
IPA34	4,33 $\pm$ 0,33	7,00 $\pm$ 0,33	1,63 $\pm$ 0,12 ^{cde}	-	-	-
IPAS.51	18,67 $\pm$ 0,67	32,00 $\pm$ 1,15	1,72 $\pm$ 0,03 ^{cd}	4,44 $\pm$ 0,13	12,96 $\pm$ 1,22	2,91 $\pm$ 0,21 ^b
IPA54	17,33 $\pm$ 0,67	30,00 $\pm$ 0,67	1,73 $\pm$ 0,03 ^{cd}	-	-	-
IPA55	-	-	-	2,67 $\pm$ 0,33	8,00 $\pm$ 0,67	3,00 $\pm$ 0,00 ^b
IPA56	26,67 $\pm$ 0,67	42,67 $\pm$ 1,76	1,60 $\pm$ 0,09 ^{cde}	5,67 $\pm$ 1,67	20,33 $\pm$ 0,33	4,11 $\pm$ 0,89 ^b
IPA58	18,67 $\pm$ 1,76	34,00 $\pm$ 2,31	1,83 $\pm$ 0,05 ^{bc}	4,67 $\pm$ 0,33	22,67 $\pm$ 1,45	4,87 $\pm$ 0,13 ^b

IPA122	6,49 ± 0,46	15,79 ± 1,12	2,43 ± 0,06 ^a	-	-	-
IPA239	21,09 ± 0,68	30,56 ± 0,34	1,45 ± 0,03 ^{de}	7,17 ± 0,44	23,17 ± 0,93	3,26 ± 0,26 ^b
IPA240	18,04 ± 1,06	28,41 ± 0,49	1,58 ± 0,07 ^{cde}	5,83 ± 0,44	22,50 ± 0,29	3,91 ± 0,35 ^b
IPAS.252	5,33 ± 0,33	11,66 ± 0,33	2,20 ± 0,12 ^{ab}	-	-	-
IPA264	5,33 ± 0,67	10,00 ± 0,67	1,89 ± 0,11 ^{bc}	-	-	-
IPA272	-	-	-	1,50 ± 0,29	11,50 ± 1,15	7,67 ± 1,35 ^a
IPA273	2,67 ± 0,33	4,47 ± 0,20	1,68 ± 0,01 ^{cde}	-	-	-
IPA275	3,33 ± 0,33	8,46 ± 0,47	2,54 ± 0,22 ^a	-	-	-
IPA276	4,00 ± 1,15	7,67 ± 2,19	1,78 ± 0,28 ^{cd}	-	-	-
IPA277	4,67 ± 0,17	10,54 ± 0,13	2,26 ± 0,04 ^{ab}	-	-	-

730 ¹Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as cepas bacterianas isoladas (P <0,05); “-”

731 indica ausência de formação de halo.

732

733

734

735

736 Tabela 2. Identidade da microbiota isolada de hepatopâncreas e estômago de *L. vannamei* com base na identidade da sequência parcial do gene
737 16S rRNA realizada pelo programa BLAST no *GenBank*.

Cepas	Tamanho (pb)	Max score ¹	Query cover ²	Identidade ³	E-value ⁴	Acesso ⁵	NCBI/GenBank
IPA14	1142	1969	99%	98%	0.0	KJ906613	<i>Bacillus sp.</i>
IPA24	1135	1929	98%	98%	0.0	MF581452	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
IPAS.51	1442	1434	98%	99%	0.0	JX660686	<i>Bacillus sp.</i>
IPA56	1479	1400	99%	99%	0.0	AY905693	<i>Bacillus subtilis</i>
IPA58	1477	1377	99%	99%	0.0	HM021765	<i>Bacillus sp.</i>
IPA122	1506	1480	97%	99%	0.0	DQ837545	<i>Bacillus pumilus</i>
IPA239	1475	1445	99%	99%	0.0	HQ844500	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
IPA240	1154	1914	97%	97%	0.0	MF581452	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

738 ¹Nota atribuída pelo algoritmo e baseado no número de pareamento perfeitos (*match*) e imperfeitos (*mismatch*) entre a sequência de entrada e
739 alguma sequência do banco de dados. O seu valor alto dá uma indicação da qualidade do alinhamento; ²Porcentagem da sequência de entrada que
740 alinhou com as sequências do banco de dados; ³Número de pares de bases porcentagem de identidade entre a sequência do isolado de camarão e
741 o organismo relacionado; ⁴Probabilidade do alinhamento ser real ou obtido meramente ao acaso entre as sequências de entradas e a do banco de

742 dados. Quanto mais próximo de zero, mais significativo é o alinhamento; ⁵Número de acesso mais bem pontuado da sequência do organismo
743 relacionado.

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758 Tabela 3. Caracterizações morfológica e fisiológica de cepas bacterianas: forma, borda, superfície, transparência, cor, elevação, Gram, tamanho,
759 tempo de crescimento, formação de muco e alteração no meio.

Cepa	Caracterizações morfológicas								Cepa	Caracterizações fisiológicas		
	FOR	BOR	SUP	TRP	COR	ELE	GRA	TAM		TCR	FMC	ALM
IPA14	CI	ON	RU	OP	BR	UO	GP	>1mm	IPA14	<24h	AU	AC
IPA24	CI	IN	RU	OP	BR	LE	GP	>1mm	IPA24	<24h	AU	AC
IPAS.51	CI	IN	RU	OP	BR	UO	GN	>1mm	IPAS.51	<24h	PR	NE
IPA56	CI	IN	LI	OP	BR	LE	GP	>1mm	IPA56	<24h	PR	NE
IPA58	CI	ON	RU	OP	BR	UO	GN	>1mm	IPA58	<24h	PR	NE
IPA122	CI	IN	LI	OP	BR	UI	GP	>1mm	IPA122	<24h	AU	AC
IPA239	CI	ON	RU	OP	BR	UO	GP	>1mm	IPA239	<24h	AU	AC
IPA240	CI	ON	RU	OP	BR	UO	GP	>1mm	IPA240	<24h	AU	NE

760 Legenda: FOR: forma da colônia (CI – circular); BOR: borda da colônia (IN – inteira, ON – ondulada, FI – filamentosa); SUP: superfície (LI –
761 lisa, RU – rugosa); TRP: transparência (OP – opaco); COR: cor da colônia (BR – branca); ELE: elevação (PL – plana, LE – lente, UO –
762 umbonada, UI – umbilicada); GRA: Gram (GP – Gram positiva, GN – Gram negativa); TAM: tamanho da colônia; TCR: tempo de crescimento;

763 FMC: formação de muco (PR – presente, AU – ausente); ALM: alteração no meio (AC – ácido, NE – neutro, ALC – alcalino). IPA 14 (*Bacillus*
764 sp.); IPA 24 (*B. amyloliquefaciens*); IPA S.51 (*Bacillus* sp.), IPA 56 (*B. subtilis*); IPA 58(*Bacillus* sp.); IPA 122 (*B. pumilus*); IPA 239 (*B.*
765 *amyloliquefaciens*); IPA 240 (*B. amyloliquefaciens*).

766 Tabela 4. Determinações fisiológicas e/ou bioquímicas de cepas de *Bacillus* isoladas de
 767 hepatopâncreas e estômago de *L. vannamei*.

Característica	Cepas							
	IPA14	IPA24	IPAS.51	IPA56	IPA58	IPA122	IPA239	IPA240
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise de lipídio	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	-	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	+	+	+	-	+	+	+
Sideróforos	-	+	+	+	+	+	+	-
Formação de esporos	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento:								
pH 6	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 8	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 0%	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 35%	+	+	+	+	+	+	+	+
5°C	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+

50°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação de								
açúcares:								
glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-	-	-	-

Os campos com sinal (+) indicam reação positiva e os campos com sinal (-) indicam reação negativa. Legenda: IPA 14 (*Bacillus* sp.); IPA 24 (*B. amyloliquefaciens*); IPA S.51 (*Bacillus* sp.), IPA 56 (*B. subtilis*); IPA 58 (*Bacillus* sp.); IPA 122 (*B. pumilus*); IPA 239 (*B. amyloliquefaciens*); IPA 240 (*B. amyloliquefaciens*).

Legenda da figura

Figura 1. Formação de biofilme de cinco cepas selecionadas em monocultura e cocultura. Biofilme formado pelos isolados IPA 24 (*Bacillus amyloliquefaciens*), IPA 56 (*Bacillus subtilis*), IPA 58 (*Bacillus sp.*), IPA 122 (*Bacillus pumilus*) e IPA 239 (*Bacillus amyloliquefaciens subs. amyloliquefaciens*) quando alíquotas iguais das culturas diluídas foram incubadas em coculturas de dois, três, quatro e cinco isolados. Ensaios para detecção de efeito sinérgico foram realizados com seis réplicas. Barras representam as médias ($\pm$ erro padrão) de seis réplicas.

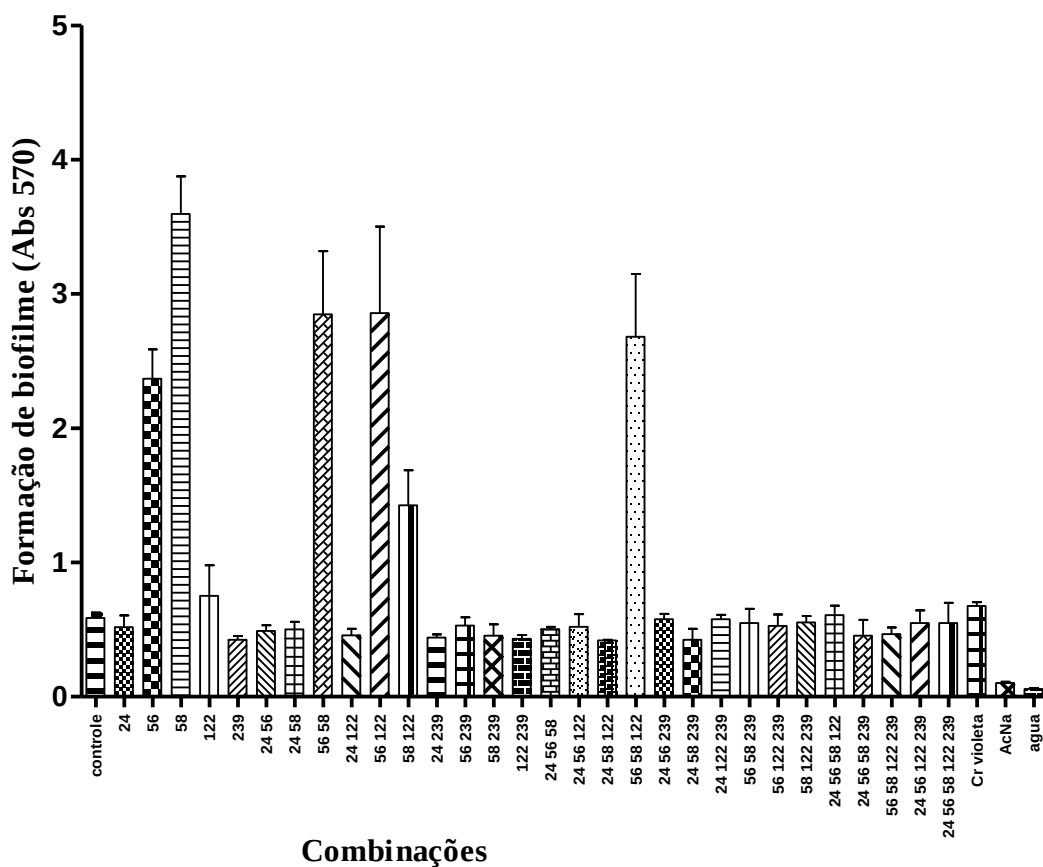


Figura 1

5 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *Bacillus* NO CULTIVO DE PÓS-LARVAS DE *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879)

Carolina Kropniczki Gouveia, Elizabeth Pereira dos Santos, Janilson Felix da Silva, Yago Victor Taurino Vilarim, José de Paula Oliveira, Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, Ranilson de Souza Bezerra

Avaliação da utilização de dieta suplementada com *Bacillus* no cultivo de pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879)

Carolina Kropniczki Gouveia^a, Elizabeth Pereira dos Santos^b, Janilson Felix da Silva^a, Yago Victor Taurino Vilarim^b, José de Paula Oliveira^c, Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva^b, Ranilson de Souza Bezerra^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil, carolkrop@yahoo.com.br, janilson.felix@gmail.com

^bDepartamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil, santos.e.p@outlook.com, yagovilarim@gmail.com, suziannymaria@gmail.com

^cInstituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50761-000, Brazil, jose.paula@ipa.br

*Corresponding author: tel: +55 (81) 2126-8540, ransoube@uol.com.br (R.S. Bezerra)

21 **Resumo**

22 A carcinicultura é uma atividade que pode provocar graves impactos ao meio ambiente.
23 Tendo em vista que o controle de microrganismos patogênicos é fundamental para o sucesso
24 da produção, a adição de probióticos auxilia na qualidade do cultivo. Adicionalmente, esta
25 prática almeja o incremento na produtividade e desempenho do animal. Duas cepas de
26 bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de *Litopenaeus vannamei* foram suplementadas em
27 dietas experimentais em concentrações de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL para avaliar a capacidade de
28 colonização e modificação da microbiota de hepatopâncreas e intestino de PL de
29 *Macrobrachium rosenbergii*. Os camarões foram alimentados por um período de 30 dias e
30 foram determinados parâmetros qualidade da água e desempenho zootécnico de *M.*
31 *rosenbergii*. A cepa IPA 58 (*Bacillus* sp.) e a IPA 239 (*Bacillus amyloliquefaciens*) foram
32 adicionadas na ração separadamente e em cocultura (IPA 58+239). Um probiótico comercial
33 (PROB) foi utilizado como controle positivo no cultivo experimental. Hepatopâncreas e
34 intestino dos animais foram coletados a cada 15 dias, para quantificação de bactérias totais,
35 *Bacillus* spp. e *Vibrio* spp. A análise de variância (ANOVA) revelou que as cepas probióticas
36 selecionadas, em monocultura e em cocultura, influenciaram na diminuição efetiva da
37 microbiota de *Vibrio* nos órgãos avaliados durante o tempo de cultivo, quando em
38 comparação com o experimento com PROB. Nos experimentos, IPA 58 manteve-se presente
39 em maior concentração UFC/mL tanto no hepatopâncreas quanto no intestino, concluindo ser
40 mais eficiente na aderência do trato. Resultados indicam que a suplementação na dieta de
41 *Bacillus* pode manipular a microbiota intestinal e do hepatopâncreas. O efeito de *B.*
42 *amyloliquefaciens* IPA 239 foi observado no biocontrole de *Vibrio*, tanto da água quanto dos
43 órgãos avaliados, e a dieta tratada com esta bactéria parece melhorar a sobrevivência, o
44 crescimento e a produtividade de PL de *M. rosenbergii*. Portanto, concluiu-se que a cepa

testada pode ser um probiótico promissor para *M. rosenbergii* incorporado à ração comercial de camarão.

Palavras-chave: *Bacillus* sp.; *Bacillus amyloliquefaciens*; probiótico; crescimento; *Macrobrachium rosenbergii*.

1. Introdução

A aquicultura evoluiu como um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo, sendo grande parte da produção aquícola global atribuída ao cultivo de crustáceos (FAO, 2016). A carcinicultura é uma das mais destacadas atividades dentro da aquicultura devido ao grande potencial econômico (Marques e Moraes-Valenti, 2012). Os dados mais recentes da *Food and Agriculture Organization* indicaram produção mundial de mais de 4 milhões de toneladas de camarões produzidos em cativeiro no ano de 2013, sendo 571.152 toneladas de camarões de água doce, o que movimentou cerca de US\$ 3 bilhões no mercado (FAO, 2016).

Apesar da sua grande importância, a carcinicultura é uma atividade que pode provocar graves impactos ao meio ambiente pela liberação de efluentes ricos em nitrogênio e fósforo aos corpos de água naturais (David et al., 2015). *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) é uma espécie de camarão conhecida como Gigante da Malásia e é originária do Sul e Sudeste da Ásia e parte da Oceania e é uma espécie de camarão economicamente importante e cultivada. Apresenta desenvolvimento favorável em regiões tropicais e subtropicais devido às suas características de rusticidade e adaptação aos sistemas de produção em cativeiro, pelo rápido crescimento, pela alta demanda do mercado e por ser citado com resistência à maioria das doenças virais responsáveis por grandes devastações de cultivos de camarões marinhos (Kumar et al., 2013).

O grande problema enfrentado pela indústria da aquicultura é relacionado às doenças causadas tanto por fatores bióticos quanto abióticos (Bondad-Reantaso et al., 2005). Em condições de cultivo, os microrganismos apresentam importante papel, particularmente, com respeito à produtividade, ciclagem de nutrientes, nutrição dos animais, qualidade da água, controle das enfermidades e impacto ambiental dos efluentes. Tendo em vista que o controle de microrganismos é fundamental para o sucesso da produção, a adição de probióticos, que são definidos como microrganismos benéficos que podem atuar como biocontroladores, biorremediadores ou trazendo diretamente contribuições nutricionais e para a saúde do hospedeiro, pode auxiliar na qualidade do cultivo (Xue et al., 2016; Kumar et al., 2013).

As bactérias probióticas do gênero *Bacillus* são encontradas naturalmente no ambiente terrestre e aquícola e têm sido empregadas na formulação de misturas probióticas por não serem consideradas patógenas humanas e se destacam pela elevada produção de enzimas e de poder inibitório a outros microrganismos, pela capacidade de competição por nutrientes e área de adesão, pela participação nos estímulos imunes e pelo aumento do balanço microbiano intestinal através da permanência nessa região (Xue et al., 2016).

Estudos comprovaram efeitos benéficos de probióticos em pós-larvas de *M. rosenbergii* (Keysami et al., 2007; Rinisha et al., 2010; Seenivasan et al., 2011; Seenivasan et al., 2012b,d; Abdel-Hakim et al., 2013; Gupta e Dhawan, 2013; Seenivasan et al., 2015). Portanto, o presente trabalho objetivou a avaliação do efeito de duas cepas selecionadas (*Bacillus* sp. IPA 58 e *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 239) no crescimento e na microbiota de hepatopâncreas e intestino de PL de *M. rosenbergii*.

2. Material e Métodos

O cultivo experimental com os probióticos isolados e selecionados foi realizado no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) do Departamento de Pesca e

Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As análises microbiológicas foram realizadas nos Laboratórios de Biologia do Solo do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) e, as análises de enzimas, foram realizadas no Laboratório de Enzimologia (LABENZ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.1. Cepas bacterianas candidatas

Foram utilizadas as cepas isoladas de hepatopâncreas e estômago de camarões adultos saudáveis (peso médio de $11,2 \pm 1,4$ g) de *Litopenaeus vannamei* submetidos a cultivos experimentais heterotróficos. O conteúdo dos órgãos foi retirado em condições estéreis. As amostras foram homogeneizadas e submetidas às diluições sucessivas em meio Agar Marinho (AM, Himedia[®]) e Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia[®]), de onde foram isoladas as colônias bacterianas diferentes. A seleção das bactérias candidatas se baseou primariamente pela capacidade de excreção das enzimas extracelulares protease e amilase. Paralelamente foram caracterizadas utilizando o gene 16s rRNA e as sequências foram comparadas com o banco de dados GenBank através do programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As cepas bacterianas IPA 58 (*Bacillus sp.*) e IPA 239 (*Bacillus amyloliquefaciens*) selecionadas de acordo com as atividades enzimáticas e com resultados de detecção de formação de biofilme foram crescidas em Caldo Soja Trypticaseína (TSB, Acumedia[®]) em agitador a 30°C por 24 horas e em seguida foram preservadas a -80°C em TSB com 25% (volume/volume) de glicerol a 60% e mantidas no Laboratório de Biologia do Solo do IPA. A escolha das cepas foi de acordo com a melhor e a pior formação de biofilme (IPA 58 e IPA 239, respectivamente).

2.2. Condições experimentais do cultivo

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado utilizando cinco tratamentos com quatro repetições cada. Pós-larvas de *M. rosenbergii* ($0,10 \text{ g} \pm 0,05$) foram aleatoriamente estocados a 1 pl.L^{-1} em 10L em tanques cilíndricos plásticos contendo água

clara a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os tanques foram supridos por um sistema de aeração contínuo e houve renovação diária de 50% da água. Os tratamentos diferiram quanto à utilização do probiótico candidato IPA 58 (*Bacillus sp.*), do IPA 239 (*Bacillus amyloliquefaciens*), do IPA 58+239 e do probiótico comercial (PROB). A água utilizada no experimento foi previamente clorada (30ppm de cloro ativo) e, vinte e quatro horas antes de sua utilização no sistema, foi realizada a remoção do cloro através do uso de aeração constante. Ao fim desse processo, a água foi submetida a teste colorimétrico para detecção de resíduos de cloro e, quando necessário, foi realizado o ajuste da alcalinidade e dureza através da utilização de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e calcário dolomítico ($\text{CaCO}_3\text{-MgCO}_3$).

2.2.1. Preparo e suplementação do probiótico na dieta

As cepas candidatas de *Bacillus* foram crescidas em TSB a 30°C por 24h sob agitação contínua (200 rpm) na concentração de 10^9 UFC/mL para suplementação na ração comercial (In Vivo[®], 40% proteína bruta) ofertada três vezes ao dia (às 10, 13 e 16 horas) em uma quantidade correspondente a 16% da biomassa total por dia, sendo realizado o ajuste da ração com base na verificação do consumo. O probiótico comercial foi adicionado à ração na proporção indicada pelo fabricante, 2g do produto por kg de ração, e em sua composição em níveis de garantia por kg do produto, constam: *Bacillus toyoi* $4,0 \times 10^{11}$ UFC/kg, *Bacillus subtilis* $4,0 \times 10^{11}$ UFC/kg, *Bifidobacterium bifidum* $3,5 \times 10^{11}$ UFC/kg, *Enterococcus faecium* $3,5 \times 10^{11}$ UFC/kg, *Lactobacillus acidophilus* $3,5 \times 10^{11}$ UFC/kg, mananoligossacarídeo 10,0 g, lisina 5.000 mg, metionina 2.500 mg, colina 2.000 mg, vitamina C 10 g, vitamina E 2.500 UI e dextrose 50 g.

A viabilidade e estabilidade das duas cepas candidatas IPA 58 e IPA 239 e do probiótico comercial testado, seguiu leitura de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) após diluições sucessivas (1:10) em oito vezes (10^{-8}) por até 96 horas em estufa a 37°C , após incorporação na ração na proporção 1:1 (peso/volume), sendo realizadas leituras a cada 24

horas de 0,5 g de ração suplementada com cada tipo de probiótico em placas contendo os meios Agar Marinho (AM, Himedia[®]) e Agar Gema de Ovo Polimixina Manitol (MYP Agar Base, Himedia[®]). Como controle inicial e, durante todo o tempo do cultivo, foi realizada uma leitura da densidade óptica (DO_{660nm}) das cepas bacterianas e do probiótico comercial para padronização da concentração bacteriana ($1,0 \times 10^9$ UFC/mL) suplementada na ração.

A contagem inicial na biomassa após 24h de cultivo em meio TSB (tempo 0h) e ao final de 96h após inoculação das culturas IPA 58 e IPA 239 e do probiótico comercial (PROB) na ração se mostraram estáveis. Apesar de ocorrerem pequenas variações, durante o tempo de avaliação da viabilidade da bactéria na ração, comprovou-se que foi possível ofertar a ração inoculada numa concentração de 10^9 UFC/mL por até quatro dias. O inóculo do probiótico comercial (g do produto/kg ração) após 24h de crescimento em TSB estava em uma concentração abaixo (10^6 UFC/mL) da descrita no rótulo; na segunda leitura, atingiu a concentração de 10^8 UFC/mL, e de 10^9 UFC/mL ao final das 96h, mas não chegou à de 10^{11} UFC/mL como descrita pelo fabricante.

2.3. Análise da qualidade da água

Diariamente, pela manhã e à tarde, foram mensurados o pH e a temperatura através da utilização de um multiparâmetro (Akso - combo 5). O oxigênio foi mensurado duas vezes na semana com o auxílio de um oxímetro (Alfakit - AT170). As determinações de amônia, nitrito e dureza foram realizadas semanalmente, enquanto que, a alcalinidade, foi determinada por kits colorimétricos (Labcon), diariamente.

2.4. Contagem de bactérias totais, *Bacillus* sp. e *Vibrio* spp. nos juvenis e na água

Uma amostragem inicial de camarões juvenis (n=8) foi retirada do tanque matriz antes de serem transferidos para as 16 unidades experimentais separadas. Amostras aleatórias de camarões de cada tanque (n=4 por tratamento) foram tomadas em dois tempos, após 15 e 30 dias do início do povoamento. Os animais foram inicialmente desinfestados com imersão em

álcool 70% por 15 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) com 0,1% de tween-80 por 15 minutos e enxague por três vezes em água destilada esterilizada. O conteúdo interno do hepatopâncreas e do intestino de cada exemplar foram semeados separadamente em placas contendo os meios Agar Marinho (AM, Himedia[®]), Agar Gema de Ovo Polimixina Manitol (MYP Agar Base, Himedia[®]) e Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Himedia[®]) para contagem de bactérias totais, de bactérias do gênero *Bacillus* sp e de vibriónáceas, respectivamente. Após homogeneização das amostras em água peptonada alcalina (APA pH 8,6), foram realizadas diluições sucessivas (1:10) em cinco vezes (10^{-5}) e foram inoculados 30 µL de cada amostra diluída. Amostras de água foram tomadas por tubos falcon de 50 mL no início do experimento (tanque matriz) e em quatro tempos, obedecendo ao cronograma de 7, 15, 22 e 30 dias após o povoamento das unidades experimentais, e foram realizadas diluições sucessivas (1:10) em cinco vezes (10^{-5}) em água peptonada alcalina (APA pH 8,6) e placas contendo os meios AM e TCBS foram inoculados com 30 µL de cada amostra diluída. As placas foram incubadas a 30°C por 24h e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

2.5. Desempenho zootécnico

Parâmetros de crescimento foram realizados ao final de 30 dias de cultivo experimental incluindo sobrevivência (n° final de camarões / n° inicial de camarões) x 100), peso médio final (biomassa final / n° de indivíduos ao final do cultivo), ganho de biomassa (biomassa final - biomassa inicial), taxa de crescimento específico [TCE %/dia = $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{tempo de cultivo} \times 100$], taxa de crescimento semanal (ganho de biomassa / semanas de cultivo), fator de conversão alimentar (FCA = quantidade de ração ofertada / ganho de biomassa) e produtividade (biomassa final / volume da unidade experimental) com todas as pós-larvas remanescentes.

2.6. Análises estatísticas

Para análise dos dados de qualidade de água e desempenho zootécnico foram verificadas a normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Krolmogorov-smirnov e Cochran, respectivamente, sendo utilizado o transformador $\log(x+1)$ para o fator de conversão alimentar (FCA). Para a análise estatística utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) foi aplicado para os dados não normais, referentes às concentrações de amônia e nitrito. Todos os dados foram analisados através do software ASSISTAT versão 7.6.

Os dados de quantificação bacteriana foram previamente transformados em $\log(x+1)$. Análise de variância com parcelas subdivididas no tempo foi utilizada para avaliação microbiológica dos órgãos dos camarões durante experimento e os dados foram submetidos à análise de variância, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SASM-Agri 8.1.

3. Resultados

3.1. Fatores de qualidade da água

Os valores das variáveis físico-químicas estão apresentados na Tabela 1. A temperatura se manteve a 28°C, o pH em 8,1, o oxigênio dissolvido entre 6,40 e 6,60 mg.L⁻¹, a alcalinidade entre 68,02 e 76,97 mg CaCO₃.L⁻¹, a dureza (mg Ca e Mg.L⁻¹) em níveis de 50 a 100, a amônia total entre 0,063 e 0,113 mg. L⁻¹ e o nitrito entre 0,013 e 0,050 mg. L⁻¹. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais.

3.2. Contagem de bactérias totais e *Vibrio* spp. na água

As médias de valores de contagem de bactérias totais utilizando o meio AM não diferiram quanto ao tratamento e nem quanto ao tempo (dias) de cultivo do *M. rosenbergii* (Tabela 2). Em todos os momentos mostrou uma população de 10⁴ UFC/mL, independente do

emprego de cada tipo bacteriano, mantendo a concentração aproximada à da coleta inicial do tanque matriz que foi de $3,33 \times 10^4$ UFC/mL.

Houve diferenças significativas na contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Vibrio* spp. na água de cultivo durante o tempo e entre os tratamentos (Tabela 2). De acordo com a média de todos os tempos de coleta, o tratamento com a cepa probiótica IPA 239 obteve menor concentração de bactérias vibrionáceas ($1,52 \times 10^2$ UFC/mL); em contrapartida, maior média pôde ser observada no tratamento que utilizou o probiótico comercial testado que manteve uma população equiparada à leitura inicial da água de $1,17 \times 10^3$ UFC/mL. A maior média foi encontrada também no grupo PROB aos 22 dias de cultivo com $5,96 \times 10^3$ UFC/mL.

3.3. Contagem de bactérias totais, *Bacillus* sp. e *Vibrio* spp. nas pós-larvas

3.3.1. Hepatopâncreas

Nas amostras iniciais (amostras de camarões do tanque matriz) de hepatopâncreas dos camarões recolhidos para análise das contagens de bactérias totais, de *Bacillus* spp. e de *Vibrios* spp. foram encontrados valores médios representados por $6,65 \times 10^1$ UFC/mL, $4,29 \times 10^1$ UFC/mL e $4,76 \times 10^1$ UFC/mL, respectivamente.

A contagem de bactérias totais (BT) no hepatopâncreas dos crustáceos aos 15 e 30 dias nos tratamentos com uso de probióticos foi, em geral, menor do que a população presente na água (10^4 UFC/mL), sendo detectado nos grupos PROB aos 15 dias ($1,24 \times 10^4$ UFC/mL) e, IPA 58 aos 30 dias ($4,75 \times 10^3$ UFC/mL), as maiores médias de unidades formadoras de colônias no órgão isolado. Menor média foi encontrada no tratamento IPA 58+239 ($2,50 \times 10^1$ UFC/mL) também aos 30 dias. No mesmo tempo, as populações dos grupos PROB e IPA 239 foram de 10^2 UFC/mL. Adicionalmente, a concentração de bactérias totais não variou significativamente com o tempo de cultivo, porém foi possível observar um decréscimo populacional com o tratamento que utilizou o probiótico comercial (Tabela 3).

O comportamento da quantificação no hepatopâncreas das bactérias crescidas no meio MYP referentes às do gênero *Bacillus* foi semelhante ao das que cresceram no meio AM. Igualmente, não houve diferença significativa ($p>0,05$) do crescimento do número de bactérias em relação ao tempo de cultivo do animal para todos os tratamentos. O tratamento com a cepa isolada IPA 58 aumentou a sua população aos 30 dias do início do experimento ($6,68 \times 10^3$ UFC/mL) e, o grupo do probiótico comercial, comportou-se de forma antagonista em relação ao tempo, diminuindo a população aos 30 dias. A menor média de contagem no MYP também foi vista no grupo que utilizou a combinação IPA 58+239 ($2,50 \times 10^1$ UFC/mL) aos 30 dias (Tabela 3).

A média de colônias de víbrios no hepatopâncreas de amostras de camarões tomadas do tanque matriz foi menor que a encontrada na água. Em relação ao uso do probiótico comercial (PROB), as concentrações populacionais de *Vibrio* no hepatopâncreas e na água foram equiparadas, e foram significativamente maiores que os grupos que utilizaram as cepas IPA 58, IPA 239 e IPA 58+239 (Tabela 3). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na contagem em relação ao tempo de cultivo em cada tratamento avaliado (Tabela 3). Os grupos com as cepas IPA 58, IPA 239 e IPA 58+239 apresentaram as menores contagens desde a primeira coleta, com contagem menor que a inicial supracitada, diferentemente do tratamento com o probiótico comercial ($2,01 \times 10^3$ UFC/mL).

3.3.2. Intestino

Na avaliação de intestinos de camarões no tempo inicial (amostra composta do tanque matriz) foi encontrada uma microbiota de $6,57 \times 10^2$ UFC/mL, $1,74 \times 10^2$ UFC/mL e $1,48 \times 10^2$ UFC/mL referentes às contagens de bactérias totais, de *Bacillus* spp. e de *Vibrio* spp., respectivamente. Estas populações foram mais elevadas quando em comparação às encontradas no hepatopâncreas no tempo inicial e foram menores que as encontradas na água.

Todas as médias de BT dos tratamentos distintos foram menores aos 15 dias após início do experimento às encontradas no hepatopâncreas. Ao final de 30 dias, todas as médias de todos os grupos foram maiores em relação às médias aos 15 dias de cultivo; porém, não foi significativo em relação ao tempo (Tabela 4); o tratamento que utilizou a cepa IPA 58 incorporou uma microbiota de $1,06 \times 10^3$ UFC/mL na última contagem do intestino. Nos tratamentos IPA 58 e IPA 58+239, as contagens de BT no intestino foram aproximadas às encontradas no hepatopâncreas; já nos grupos PROB e IPA 239, foram maiores (Tabela 4).

Toda avaliação das bactérias crescidas no meio AM supracitada foi observada no meio MYP: não houve variação significativa com o tempo ($p>0,05$), porém em geral as contagens no tempo de 30 dias foram maiores, excetuando o grupo IPA 58+239 que manteve uma população aproximada de 10^1 UFC/mL. O tratamento IPA 58 aumentou de $2,5 \times 10^1$ UFC/mL para $1,28 \times 10^3$ UFC/mL aos 30 dias.

A carga na amostra composta inicial de *Vibrio* encontrada no intestino foi maior (10^2) que a do hepatopâncreas (10^1), mas menor que a da água (10^3). Houve diferenças significativas na contagem ($p<0,05$) no tempo (dias) para o tratamento PROB, apresentando um acréscimo da população chegando à contagem de $7,76 \times 10^3$ UFC/mL. Os tratamentos IPA 58, IPA 239 e IPA 58+239 mantiveram e/ou apresentaram médias iguais a zero, dados que corroboram com a característica de biocontrole contra patógenos e de extrema importância para a aquicultura.

3.4. Desempenho zootécnico

Não houve diferença significativa entre o uso dos probióticos selecionados (IPA 58, IPA 239 e IPA 58+239) e em comparação ao grupo PROB sobre a sobrevivência, peso final, ganho de biomassa, taxa de crescimento específico, taxa de crescimento semanal, fator de conversão alimentar e produtividade até o final do período de cultivo (Tabela 5). O grupo IPA 239 apresentou maior sobrevivência ($90 \pm 7\%$), maior ganho de biomassa ($8,74 \pm 1,96$ g),

melhor índice de fator de conversão alimentar ($1,69 \pm 0,41$) e maior produtividade ($0,97 \pm 0,19 \text{ kg.m}^{-3}$). Menor taxa de crescimento específico (TCE) foi encontrada no IPA 58+239 ($5,90 \pm 0,69\%$ ao dia). Nos grupos IPA 58, IPA 239 e PROB, as médias de peso final (aumentado em 10x em 30 dias de cultivo) e taxa de crescimento semanal foram iguais ($1,07 \text{ g}$ e $0,18 \text{ g.sem}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 5).

4. Discussão

Valores das variáveis físico-químicas da água monitoradas durante o experimento foram estáveis e dentro da faixa recomendada para o cultivo de *M. rosenbergii* (New et al., 2010). O uso de probióticos na carcinicultura pode proporcionar uma melhoria nos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade da água através do equilíbrio das principais variáveis físicas e químicas (Souza et al., 2012). Temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, alcalinidade e dureza permaneceram dentro dos níveis seguros de criação de *M. rosenbergii*, sendo temperatura entre $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$, pH entre $7,0\text{-}8,0$, de $6\text{-}8 \text{ mg/L}$ para o oxigênio dissolvido e alcalinidade e dureza entre 20 e 100 mg/L (Kumaresan et al., 2016; Ribeiro e Logato, 2016). As variáveis de amônia e nitrito permaneceram dentro da faixa indicada (Arana, 2010) e, não diferenciaram significativamente, entre os tratamentos com uso de probiótico.

Em relação à carga total bacteriana (BT) na água de cultivo, não foi possível detectar diferença significativa na quantificação de unidades formadoras de colônias entre os tratamentos. Adicionalmente, em todos os grupos experimentais, a contagem se manteve constante durante todo o tempo de cultivo devido, talvez, à troca diária de metade da água dos tanques circulares, não permitindo uma progressão. De acordo com avaliação morfológica prévia, foi possível constatar a prevalência na água dos tipos bacterianos selecionados (IPA 58 e IPA 239) e inoculados através de suplementação na ração em cada tratamento; este fato

pode ser atribuído à capacidade de competição por nutrientes destas bactérias (Zokaeifar et al., 2013).

Ao comparar os tratamentos IPA 58 e IPA 239 ao grupo tratado com o probiótico comercial até o final dos 30 dias de cultivo foi possível observar uma concentração menor de *Vibrio* spp.; porém quando em combinação (IPA 58+239), a população UFC/mL se eleva durante o tempo tornando menos efetivo como biocontrolador. Tal fato pode ser explicado pela competição pelo espaço entre si das duas cepas de *Bacillus* atuando de forma antagônica, já que ambas foram positivas para o teste de sideróforos. A bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (IPA 239) foi mais eficiente como biocontroladora, diminuindo significativamente a média de *Vibrio* spp. na água.

Amostras de hepatopâncreas de *M. rosenbergii* dos tratamentos com *Bacillus* sp (IPA 58) e *Bacillus amyloliquefaciens* (IPA 239) e quando estavam combinadas (IPA 58+239) apresentaram menores valores médios de população de víbrios, o que significa dizer que as cepas de *Bacillus* competem pelo espaço e atuam como biocontrole. Adicionalmente, foram mais eficientes na diminuição da carga vibrionácea que o grupo que utilizou o probiótico comercial (PROB). Na avaliação de bactérias totais e de bactérias do gênero *Bacillus* no hepatopâncreas após 30 dias de cultivo, a cepa IPA 58 mostrou-se eficaz na aderência ao órgão em estudo quando em comparação aos outros grupos experimentais. A IPA 239 colonizou melhor o hepatopâncreas que quando em combinação com a IPA 58 (IPA 58+239). Tais resultados estão de acordo com a capacidade de formação de biofilme que mostraram que não se comportam de forma sinérgica, e sim de forma competitiva quando em cocultura.

A população inicial de bactérias no intestino foi maior que a encontrada no hepatopâncreas. Em todos os tratamentos houve um incremento da concentração bacteriana total (BT) e de *Bacillus* sp. ao final do experimento, implicando em uma melhoria na colonização do trato intestinal. Em relação à IPA 58 e, assim como no hepatopâncreas,

mostrou que a eficiência na colonização do trato, implicando em maior aderência e permanência no órgão. Concomitantemente, a IPA 239 foi melhor na colonização isoladamente que quando em cocultura (IPA 58+239) e se aderiu mais ao intestino do que ao hepatopâncreas. Vale ressaltar o caráter de biocontrole das cepas IPA 58 e IPA 239 da flora intestinal; em contrapartida, o grupo do probiótico comercial foi ineficaz contra *Vibrio* spp. no intestino. O gênero *Bacillus* spp. é conhecido pelo sucesso de aderência na mucosa intestinal de organismos aquáticos e consequente produção de substâncias antibióticas (polimixina, bacitracina e gramicidina) que têm atividade contra um amplo espectro de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (Keysami et al. 2012). Autores defendem que a contínua adição e a dosagem adequada (dose-efeito) de probióticos na água de criação favorecem o sucesso da colonização pelos microrganismos e otimiza a formação da comunidade microbiana que necessita de tempo para estabelecer-se (Xue et al., 2016). Quando probióticos são administrados em doses efetivas, se estabelecem e colonizam o trato digestivo e aumentam a microflora natural e a resistência do hospedeiro à doenças (Gullian e Rodriguez, 2002). O aumento do efeito promotor de incremento da concentração de microflora benéfica no trato digestivo também está condicionado à concentração de bactérias probióticas na ração, sendo importante a estabilidade de células viáveis (UFC) pelo tempo de administração do probiótico na alimentação (Keysami et al., 2012).

As bactérias presentes em ambientes aquáticos influenciam a composição da microbiota intestinal e vice-versa (Seenivasan et al., 2015). Neste ambiente, a microbiota bacteriana intestinal do animal é dominada principalmente por bactérias gram-negativas pertencentes aos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas* (Vine et al., 2006), e vários estudos demonstraram que essa microbiota pode ser modificada pela suplementação de bactérias gram-positivas (Ziaei-Nejad et al., 2006; Vieira et al., 2008; Vieira et al., 2010). No presente estudo, os resultados corroboram com a capacidade de exclusão competitiva da microflora

microbiana gram-negativa por bactérias do gênero *Bacillus* sp. Outros pesquisadores observaram um incremento na concentração do probiótico testado no trato digestivo e no hepatopâncreas de *M. rosenbergii* (Kumar et al., 2013; Zhang et al., 2011; Zokaeifar et al., 2013). Foi relatado por Keysami e Mohammadpour (2012) colônias de *Bacillus* estabelecidas em intestino de PL de *M. rosenbergii* alimentado com dieta suplementada com *Bacillus subtilis*. Da mesma forma, Seenivasan et al. (2012d) observaram que as colônias bacterianas probióticas se estabeleceram no intestino de PL de *M. rosenbergii* na concentração de 332×10^4 células (UFC) quando alimentado com *Bacillus subtilis* incorporada à dieta em 10^7 . Adicionalmente, Seenivasan et al. (2015) fizeram outro cultivo com BS (*Bacillus subtilis*) e SC (*Saccharomyces cerevisiae*), ambas incorporadas à ração (40% de proteína) na concentração de 10×10^7 UFC/mL, e obtiveram uma leitura de UFC/mL do intestino após 90 dias de cultivo de PL30 de *M. rosenbergii* em água clara de 120×10^4 UFC de células viáveis de BS.

Em alguns trabalhos que envolvem testes com probióticos contendo o gênero *Bacillus* sp. foram avaliados experimentalmente espécies de camarões marinhos, como *Litopenaeus vannamei* (Ferreira et al., 2015), *Farfantepenaeus brasiliensis* (Souza et al., 2012), *F. duorarum* (Emerenciano et al., 2013), ou foram adicionados diferentes probióticos na fase de larvicultura de *M. rosenbergii* em água salobra (Kennedy et al., 2006; Keysami et al., 2007). De acordo com Decamp et al. (2008), nestas pesquisas as contagens mais altas de bactérias desse gênero foram obtidas pois corroboram com a teoria de afinidade de *Bacillus* sp. com o meio salino, como forma de exclusão de outros microrganismos que não se adaptam em ambientes com salinidade.

Em termos de desempenho zootécnico, o tratamento IPA 239 apresentou uma promissora produtividade em kg/m^3 , sendo interessante reproduzir experimento com esta bactéria probiótica em cultivos em escala comercial. Na maioria dos tratamentos

experimentais, exceto no tratamento IPA 58+239, o uso de bactérias selecionadas em monocultura e do probiótico comercial resultou em animais que tiveram um incremento de 10 vezes o seu peso inicial em 30 dias, atingindo média de $1,07 \pm 0,16$ g. Em comparação, o melhor e o pior desempenho no ganho de peso de PL de *M. rosenbergii* alimentado com ração suplementada com *B. subtilis* (10^7) por 90 dias foi de $1,10 \pm 0,07$ g e $0,79 \pm 0,06$ g (Seenivasan et al., 2012d). Probióticos podem melhorar a atividade digestiva pela síntese de vitaminas e cofatores, bem como a atividade enzimática (Wang, 2007). *Bacillus* sp. produz uma variedade de proteases e outras enzimas que permitem degradar uma variedade de substâncias naturais e contribuir para a ciclagem de nutrientes (Gullian et al. 2004). Essas propriedades podem ser a causa do aumento de peso, melhorando a digestão ou a absorção de nutrientes.

Adicionalmente, os parâmetros de crescimento de PL de *M. rosenbergii*, como sobrevivência, ganho de biomassa, fator de conversão alimentar e produtividade, foram maiores nos tanques com IPA 239 incorporada à dieta quando em comparação aos outros grupos experimentais. Nos grupos IPA 239 e IPA 58+239, foram observados ótimos índices de sobrevivência (90% e 85%, respectivamente). Estudo utilizando *B. subtilis* (BS) suplementada em 10^7 à dieta de PL de *M. rosenbergii* em água clara resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) da sobrevivência entre os tratamentos, onde a maior taxa foi de $90 \pm 2,50$ % no tratamento utilizando 3% de BS na ração com 40% de proteína (Seenivasan et al., 2012d). Rahiman et al. (2010) sugeriram que o uso de bactérias probióticas isoladas dos próprios camarões podem permitir resultados mais promissores quanto aos parâmetros zootécnicos do que o uso de outros probióticos. De acordo com os últimos autores, ao utilizar dieta suplementada com *Bacillus* NL110, houve aumento significativo no ganho de peso e na TCE em *M. rosenbergii* sem qualquer aumento significativo na sobrevivência. Concomitantemente, Kumar et al (2013) descreveram aumento significativo

dos parâmetros de crescimento (ganho de peso e TCE) e não constataram diferenças significativas na sobrevivência. Keysami e Mohammadpour (2012) notaram que probióticos incorporados à dieta melhorou o desempenho na sobrevivência e no crescimento de PL de *M. rosenbergii*.

Uma possível explicação para o aumento do desempenho como resultado da adição de probiótico é a melhoria na digestibilidade, o que pode, por sua vez, explicar o melhor fator de conversão alimentar e o aumento da taxa de crescimento específico (Seenivasan et al., 2015). Seenivasan et al. (2012d) reportaram que *B. subtilis* suplementada ($1,0 \times 10^7$ UFC/mL) em ração peletizada ofertada por 90 dias à PL30 de *M. rosenbergii* resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) da TCE e do FCA em relação à um controle sem probiótico. No estudo destes autores, o menor índice de FCA foi de $2,47 \pm 0,21$ g no tratamento com 3% de BS incorporado à ração. Neste presente trabalho, FCA chegou a 2,65:1 (IPA 58+239), dados satisfatórios e compatíveis com a literatura, visto que o sistema foi conduzido em água clara com renovação diária e foi somente alimentado com ração suplementada com as bactérias probióticas. O melhor e promissor índice de FCA foi encontrado no tratamento com *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 239 em monocultura ($1,69 \pm 0,41$ g). De acordo com Moraes-Riudades e Valenti (2004), o fator de conversão alimentar (FCA) pode variar de 2,5:1 a 1,8:1 ao cultivar o *M. rosenbergii* utilizando sistema de cultivo tradicional de água clara e com renovação, e com utilização de outras técnicas como bandejas. Keysami et al (2012) apontaram diferenças significativas em cultivo em sistema convencional utilizando *Bacillus subtilis* como probiótico quando em comparação ao controle, porém, a melhor taxa de crescimento (TCE) foi de 2,10 %/dia, contra 6,39 %/dia encontrado com a utilização da cepa IPA 239 e do probiótico comercial (PROB), e 6,38 %/dia com a IPA 58. Ou seja, os camarões cultivados nas condições deste trabalho, e com as bactérias isoladas e selecionadas do trato digestivo de *L. vannamei*, em especial a IPA 239, estavam crescendo de forma satisfatória e

potencializada, além da taxa de crescimento estar equivalente à uma mistura de bactérias probióticas em maior potência (10^{11}), juntamente com outros ingredientes, do probiótico comercial.

A qualidade e eficácia do probiótico é influenciada pela composição não-bacteriológica da mistura probiótica, pelas espécies de microrganismos que o compõe, assim como a concentração da UFC/g, uma vez que, a elevada concentração de UFC/g é mais efetiva que adição em quantidades elevadas de probiótico (Xue et al., 2016). Luis-Villaseñor et al. (2011) constataram que probióticos compostos por duas ou mais estirpes de *Bacillus* podem provocar diferenças significativas no desenvolvimento de camarões em relação à um controle sem probiótico, mas não apresentam variação significativa quando comparados a probióticos compostos por apenas uma espécie de *Bacillus*. Neste trabalho ocorreu de forma semelhante, pois não houve diferenças significativas entre todos os grupos estudados utilizando uma cepa ou cepas combinadas. Probióticos com multiespécies são mais eficazes e consistentes que os homólogos com apenas uma espécie de bactéria uma vez que culturas mistas podem apresentar propriedades sinérgicas (Nayak, 2010). Contudo, as cepas de *Bacillus* sp. e *Bacillus amyloliquefaciens* como espécies em monocultura representaram performance e controle da microbiota de *Vibrio* melhor que o probiótico comercial que contém multiespécies de bactérias e outros nutrientes.

5. Conclusão

Nas condições de cultivo, resultados das análises microbiológicas mostraram que a cepa *Bacillus* sp. IPA 58 quando suplementada na dieta colonizou, aderiu à mucosa, com sucesso o hepatopâncreas e intestino e/ou estimulou o crescimento da microbiota, corroborando com a potencial formação de biofilme. Foi eficaz, na concentração adotada de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL, no controle da microbiota de *Vibrio* spp. dos órgãos avaliados. A

competição com bactérias do gênero *Vibrio* foi vista, também, com a utilização da cepa *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 239 quando suplementada na ração, responsável pela eliminação de bactérias patogênicas tanto na água quanto nos órgãos avaliados. *Bacillus amyloliquefaciens* colonizou o trato digestivo e promoveu o crescimento de PL de *M. rosenbergii*. As cepas isoladas e selecionadas colonizaram melhor ou igual ao probiótico comercial e foram mais competitivas. Por fim, *Bacillus* sp. IPA 58 e *Bacillus amyloliquefaciens* IPA 239 podem ser utilizadas como probiótico em cultivo de PL de *M. rosenbergii*.

Conflitos de interesse: não

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) – Brasil. Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Saúde de Animais Aquáticos (LASAq) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pelo fornecimento de equipamentos e por possibilitar o experimento.

Referências

- Abdel-Hakim, N.F., Al-Azab, A.A., Allam, H.Y., Gewida, A.G.A., 2013. Effect of stocking density and probiotic dietary supplementation on growth performance, feed conversion and survival of postlarvae of the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries. 17, 81-90.
- Arana, L.V., 2010. Qualidade da água em aquicultura princípios e práticas. 238p

- 493 Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R.,
 494 Tan, Z., Shariff, M., 2005. Disease and health management in asian aquaculture. Vet
 495 Parasitol. 132:249, 272.
- 496 David, F.S., Cohen, F.P.A., Valenti, W. C., 2015. Intensification of the Giant river prawn
 497 *Macrobrachium rosenbergii* hatchery production. Aquacult. Res. 1-6.
- 498 Decamp, O., Moriarty, D.J.W., Lavens, P., 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of
 499 field data from Asia and Latin America. Aquaculture Research. 39 (4), 334-338.
- 500 Emerenciano, M., Cuzon, G., Paredes, A., Gaxiola, G., 2013. Evaluation of biofloc
 501 technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance,
 502 water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. Aquaculture
 503 International. 21, 1381– 1394.
- 504 FAO., 2016. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Aquaculture big
 505 numbers. Rome, 62p.
- 506 Ferreira, G.S., Bolívar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., Vieira. F.N., Mouriño, J.L.P.,
 507 Seiffert, W.Q., 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of
 508 *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 448, 273–279.
- 509 Gullian, M., Rodriguez, J., 2002. Selection of probiotic bacteria and study of their
 510 immunostimulatory qualities of probiotic bacteria. Global Aquaculture Advocate. 5, 52–
 511 54.
- 512 Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of
 513 their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 233, 1–14.
- 514 Gupta, A., Dhawan, A., 2013. Probiotic based diets for freshwater prawn *Macrobrachium*
 515 *rosenbergii* (de Man). Indian Journal of Fisheries. 60, 03-109.

- 516 Kennedy, B., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2006. Bacterial flora
517 associated with the giant freshwater *Macrobrachium rosenbergii* in hatchery system.
518 Aquacult. 261, 1156-1167.
- 519 Keysami, M.A., Saad C.R., Sijam, K., Daud, H.M., Alimon, A. R., 2007. Effect of *Bacillus*
520 *subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de
521 Man). Aquacult. Nutrit. 13, 131-136.
- 522 Keysami, M.A., Mohammadpour, M., 2012. Response of juvenile freshwater prawn
523 *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) to different levels of *Bacillus subtilis* isolated from
524 chicken intestine as probiotics. Journal of Agricultural Science and Technology. 2, 988-
525 999.
- 526 Keysami, M.A., Mohammadpour, M., Saad, C.R., 2012. Probiotic activity of *Bacillus subtilis*
527 in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods
528 of administration to the feed. Aquaculture International. 20(3), 499-511.
- 529 Kumar, N.R., Raman, R.P., Jadhao, S.B., Brahmchari, R.K., Kumar, K., Dash, G., 2013.
530 Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and
531 immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man,
532 1879). Aquaculture Internacional. 21, 387-403.
- 533 Kumaresan, V., Palanisamy, R., Pasupuleti, M., Arockiaraj, J., 2016. Impacts of
534 environmental and biological stressors on immune system of *Macrobrachium*
535 *rosenbergii*. Rev. Aquac.
- 536 Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M., Gómez-Gil, B., Valle, F.A., Córdova, A.I.C.,
537 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus*
538 *vannamei*. Aquaculture. 321, 136-144.
- 539 Marques, H.L.A., Moraes-Valenti, P.M.C., 2012. Review Article: Current status and
540 prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879)

- 541 and the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) in Brazil.
 542 Aquacult. Res. 43, 984-992.
- 543 Moraes-Riodades, P.C., Valenti, W.C., 2004. Morphotypes in male Amazon river prawns,
 544 *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture*. 236, 297-307.
- 545 Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunology*.
 546 29(1), 2-14.
- 547 New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H.D, Abramo, L.R., Kutty, M.N., 2010. Freshwater
 548 prawns biology and farming. Blackwell Science, Oxford, p 550.
- 549 Rahiman, K.M.M., Jesmi, Y., Thomas, A.P., Mohamed Hatha, A., 2010. Probiotic effect of
 550 *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune
 551 response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*. 41, 120-134.
- 552 Ribeiro, P.A.P., Logato, P.V.R., 2016. Criação de camarões de água doce (*Macrobrachium*
 553 *rosenbergii*). Departamento de Zootecnia da UFLA.
- 554 Rinisha, K., Mujeeb Rahiman, K.M., Razia Beevi, M., Thomas, A.P., Mohamed Hatha, A.A.,
 555 2010. Probiotic effects of *Bacillus* spp. on the growth and survival of postlarvae of
 556 *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Technologies*. 47, 173-178.
- 557 Seenivasan, C., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., 2011. Effect of probiotic (Binifit TM) on
 558 survival, growth, biochemical constituents and energy budget of the freshwater prawn
 559 *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Elixir Aquaculture*. 41, 5919-5927.
- 560 Seenivasan, C., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., Muralisankar, T., 2012b. Effects of
 561 probiotics on survival, growth and biochemical characteristics of freshwater prawn
 562 *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic*
 563 *Sciences*. 12, 331-338.
- 564 Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Muralisankar, T., Bhavan, P. S., 2012d. *Bacillus subtilis*
 565 on survival, growth biochemical constituents and energy utilization of the freshwater

- 566 prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. Journal of Aquatic Research. 38, 195-
567 203.
- 568 Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Shanthi, R., Muralisankar, T., Bhavan, P.S., 2015.
569 Influence of probiotics on survival, growth, biochemical changes and energy utilization
570 performance of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. Proceedings of the Zoological
571 Society. 68, 74-83.
- 572 Souza, D.M., Suita, S.M., Leite, F.P.L., Romano, L.A., Wasielesky, W., Ballester, E.L.C.,
573 2012. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp
574 *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. Aquacult. Res.
575 43, 1828–1837.
- 576 Vieira, F.N., Neto, C.C.B., Mourino, J.L.P., Jatoba, A., Ramirez, C., Martins, M.L., Barracco
577 Margherita, A.A.M., Vinatea-Luis, A., 2008. Time-related action of *Lactobacillus*
578 *plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as
579 immunostimulant. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 43(6), 763–769.
- 580 Vieira, F.N., Buglione, C.C., Mourino, J.P.L., Jatoba, A., Martins, M.L., Schleder, D.D.,
581 Andreatta, E.R., Barraco, M.A., Vinatea, L.A., 2010. Effect of probiotic supplemented
582 diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. Arquivo Brasileiro de
583 Medicina Veterinária e Zootecnia. 62(3), 631–638.
- 584 Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS
585 Microbiology Reviews. 30, 404–427.
- 586 Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity
587 of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 269, 259–264.
- 588 Xue, M., Wen, C., Liang, H., Ding, M., Wu, Y., Li, X., 2016. *In vivo* evaluation of the effects
589 of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei*
590 larvae during the early hatchery period. Aquaculture Research. 47, 1661-1669.

- Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X., Liufu, Z., 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquaculture Research*. 42, 943–952.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the India white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. 252, 516–524.
- Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Balcazar, J.L., 2013. 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 Immunol*. 36, 68-74.

616 Tabela 1. Valores das médias ($\pm$ desvio padrão) das variáveis de qualidade de água,
 617 temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), alcalinidade ($\text{mg de CaCO}_3.\text{L}^{-1}$), dureza
 618 ($\text{mg de Ca e Mg.L}^{-1}$), amônia total ($\text{NH}_3 \text{ mg. L}^{-1}$) e nitrito ($\text{NO}_2 \text{ mg. L}^{-1}$).

Variáveis	Tratamentos			
	PROB	IPA58	IPA239	IPA58+239
Temperatura	$28,0 \pm 0,4$	$28,10 \pm 0,5$	$28,1 \pm 0,5$	$28,0 \pm 0,5$
pH	$8,11 \pm 0,17$	$8,12 \pm 0,18$	$8,11 \pm 0,18$	$8,11 \pm 0,17$
Oxigênio dissolvido	$6,40 \pm 0,60$	$6,45 \pm 0,68$	$6,60 \pm 0,46$	$6,45 \pm 0,43$
Alcalinidade	$71,75 \pm 12,77$	$76,97 \pm 12,47$	$71,60 \pm 10,20$	$68,02 \pm 8,68$
Dureza	50 - 100	50 - 100	50 - 100	50 - 100
Amônia total	$0,08 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,10$	$0,15 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,08$
Nitrito	$0,02 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,04$

619

620 Tabela 2. Valores das médias ($\pm$ erro padrão) e média de todos os tempos (dias) de contagem em meio TCBS de amostras de água durante o
 621 cultivo de *M. rosenbergii*, durante 7, 15, 22 e 30 dias nos diferentes tratamentos: PROB, IPA 58 (*Bacillus* sp.), IPA 239 (*Bacillus*
 622 *amyloliquefaciens*) e IPA 58+239.¹

Contagem TCBS (UFC.mL ⁻¹)					
Tratamentos	Dias de cultivo				Média
	07	15	22	30	
PROB	$1,59 \pm 1,10 \times 10^2$ ^{abc}	$1,92 \pm 1,59 \times 10^2$ ^{abc}	$5,96 \pm 4,12 \times 10^3$ ^a	$3,36 \pm 2,30 \times 10^3$ ^{ab}	$2,42 \times 10^3$ ^A
IPA58	$5,82 \pm 3,43 \times 10^1$ ^{abc}	$8,30 \pm 8,30$ ^{bc}	$8,42 \pm 4,26 \times 10^2$ ^{ab}	$6,68 \pm 6,68 \times 10^1$ ^{abc}	$2,44 \times 10^2$ ^{AB}
IPA239	$0,0 \pm 0,0$ ^c	$8,30 \pm 8,30$ ^{bc}	$2,58 \pm 1,30 \times 10^2$ ^{abc}	$3,42 \pm 2,36 \times 10^2$ ^{abc}	$1,52 \times 10^2$ ^B
IPA58+239	$1,67 \pm 0,96 \times 10^1$ ^{abc}	$8,30 \pm 8,30$ ^{bc}	$1,13 \pm 0,71 \times 10^3$ ^{ab}	$1,02 \pm 0,77 \times 10^3$ ^{ab}	$5,44 \times 10^2$ ^{AB}

623 ¹Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Diferentes letras
 624 maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

625

626

627

628

629 Tabela 3. Valores das médias ($\pm$ erro padrão) de contagem nos meios AM, MYP e TCBS de amostras de hepatopâncreas de *M. rosenbergii*
 630 durante 15 e 30 dias de cultivo nos diferentes tratamentos: PROB, IPA 58 (*Bacillus* sp.), IPA 239 (*Bacillus amyloliquefaciens*) e IPA 58+239.¹

	Contagem BT (UFC.mL ⁻¹)		Contagem <i>Bacillus</i> (UFC.mL ⁻¹)		Contagem TCBS (UFC.mL ⁻¹)	
	Dias de cultivo		Dias de cultivo		Dias de cultivo	
Tratamentos	15	30	15	30	15	30
PROB	1,24 $\pm$ 1,24x10 ⁴ ^a	8,55 $\pm$ 7,14x10 ² ^b	1,67 $\pm$ 1,67x10 ⁴ ^a	2,17 $\pm$ 1,57x10 ³ ^{ab}	2,01 $\pm$ 1,99x10 ³ ^a	7,34 $\pm$ 6,48x10 ² ^{ab}
IPA58	5,14 $\pm$ 2,75x10 ² ^b	4,75 $\pm$ 4,39x10 ³ ^{ab}	6,14 $\pm$ 3,05x10 ² ^{ab}	6,68 $\pm$ 6,21x10 ³ ^{ab}	8,3 $\pm$ 8,3 ^{bc}	8,3 $\pm$ 8,3 ^{bc}
IPA239	1,83 $\pm$ 1,02x10 ² ^b	1,99 $\pm$ 1,67x10 ² ^b	2,08 $\pm$ 0,95x10 ² ^{ab}	3,14 $\pm$ 2,59x10 ² ^{ab}	0,0 $\pm$ 0,0 ^c	0,0 $\pm$ 0,0 ^c
IPA58+239	2,08 $\pm$ 2,08x10 ² ^b	2,50 $\pm$ 1,60x10 ¹ ^b	2,66 $\pm$ 2,54x10 ² ^{ab}	2,50 $\pm$ 1,60x10 ¹ ^b	1,67 $\pm$ 1,67 ^{bc}	0,0 $\pm$ 0,0 ^c

631 ¹Diferentes letras minúsculas do sobrescrito na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p <0,05).

632

633

634

635 Tabela 4. Valores das médias ($\pm$ erro padrão) de contagem nos meios AM, MYP e TCBS de amostras de intestino de *M. rosenbergii* durante 15 e
 636 30 dias de cultivo nos diferentes tratamentos: PROB, IPA 58 (*Bacillus* sp.), IPA 239 (*Bacillus amyloliquefaciens*) e IPA 58+239.¹

Tratamentos	Contagem BT (UFC.mL ⁻¹)		Contagem <i>Bacillus</i> (UFC.mL ⁻¹)		Contagem TCBS (UFC.mL ⁻¹)	
	Dias de cultivo		Dias de cultivo		Dias de cultivo	
	15	30	15	30	15	30
PROB	1,18 $\pm$ 1,16x10 ³ ^{ab}	2,00 $\pm$ 0,99x10 ⁴ ^a	1,75 $\pm$ 1,64x10 ² ^{ab}	3,34 $\pm$ 1,75x10 ⁴ ^a	0,0 $\pm$ 0,0 ^{bB}	7,76 $\pm$ 5,74x10 ³ ^{aA}
IPA58	8,30 $\pm$ 8,30 ^b	1,06 $\pm$ 0,28x10 ³ ^{ab}	2,50 $\pm$ 0,83x10 ¹ ^b	1,28 $\pm$ 0,29x10 ³ ^{ab}	0,0 $\pm$ 0,0 ^b	0,0 $\pm$ 0,0 ^b
IPA239	1,42 $\pm$ 1,31x10 ² ^{ab}	1,03 $\pm$ 0,99x10 ³ ^{ab}	1,75 $\pm$ 1,53x10 ² ^{ab}	1,64 $\pm$ 1,56x10 ³ ^{ab}	8,30 $\pm$ 8,30 ^{ab}	0,0 $\pm$ 0,0 ^b
IPA58+239	8,30 $\pm$ 8,30 ^b	4,16 $\pm$ 2,10x10 ¹ ^{ab}	8,30 $\pm$ 8,30x10 ¹ ^{ab}	5,80 $\pm$ 2,50x10 ¹ ^b	0,0 $\pm$ 0,0 ^b	0,0 $\pm$ 0,0 ^b

637 ¹Diferentes letras minúsculas do sobrescrito na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p <0,05). Diferentes letras
 638 maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os dias de cultivo (p <0,05).

639

640 Tabela 5. Valores das médias ($\pm$ desvio padrão) para os parâmetros de cultivo: sobrevivência,
 641 peso médio final, ganho de biomassa, taxa de crescimento específico (TCE), taxa de
 642 crescimento semanal (TCS), fator de conversão alimentar (FCA) e produtividade.

Variáveis	Tratamentos			
	PROB	IPA58	IPA239	IPA58+239
Sobrevivência (%)	82,5 $\pm$ 4	75 $\pm$ 5	90 $\pm$ 7	85 $\pm$ 17
Peso final (g)	1,07 $\pm$ 0,13	1,07 $\pm$ 0,16	1,07 $\pm$ 0,16	0,92 $\pm$ 0,21
Ganho biomassa (g)	7,89 $\pm$ 1,55	7,06 $\pm$ 1,50	8,74 $\pm$ 1,96	7,07 $\pm$ 2,96
TCE (%.dia ⁻¹)	6,39 $\pm$ 0,32	6,38 $\pm$ 0,39	6,39 $\pm$ 0,39	5,90 $\pm$ 0,69
TCS (g.sem ⁻¹)	0,18 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,04
FCA (g)	1,84 $\pm$ 0,32	2,07 $\pm$ 0,43	1,69 $\pm$ 0,41	2,65 $\pm$ 1,69
Produtividade (kg.m ⁻³)	0,89 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,19	0,81 $\pm$ 0,29

643

6 CONCLUSÕES

As menores relações C:N foram suficientes para o incremento de uma biota heterotrófica no sistema de bioflocos, não existindo influência das diferentes relações sobre os níveis ideais dos parâmetros físico-químicos da água e de desempenho de *L. vannamei*.

Cepas de *Bacillus* isoladas são capazes de produzir enzimas para a indústria de alimentação de animais aquáticos, e inclusive podem ser também empregadas em outras aplicações industriais. A inoculação de bactérias probióticas na ração deve ser estimulada junto aos produtores, com a finalidade do probiótico atingir a cadeia produtiva como um todo.

Através de resultados da técnica de detecção de formação de biofilme e de sinergismo entre as cepas foi possível sugerir que a técnica pode avaliar previamente a capacidade de adesão destas aos órgãos dos animais cultivados, podendo ser adotada como um pré-teste antes do ensaio com cultivo piloto utilizando um probiótico selecionado. Pesquisas voltadas para compreensão dessas interações sociais e forças seletivas que geram biofilme de comunidades bacterianas no ambiente aquático de criação de camarão se mostram necessárias.

As cepas *Bacillus* sp. IPA 58 e *Bacillus amyloliquefaciens* IPA239 demonstraram caráter de biorremediação e/ou biocontrole. Sendo assim, a utilização de produtos probióticos utilizando cepas selecionadas pode auxiliar o problema da presença das enfermidades na carcinicultura brasileira e para a melhoria no rendimento nutricional e no incremento dietário. Portanto, o resultado deste estudo recomenda a inclusão de *B. amyloliquefaciens* na formulação de rações para o desenvolvimento sustentável do cultivo de camarão de água doce, além de estudos para uma concentração mais eficaz para cultivo em escala comercial e de cooperação interespecífica com outras espécies de bactérias. Outro ponto importante a ser abordado é a substituição e/ou minimização do uso de bactérias exóticas de produtos probióticos comerciais que são em sua maioria importados, e cuja eficácia nas condições de cultivo nacional pode ser comprometida.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAKIM, N. F.; AL-AZAB, A. A.; ALLAM, H. Y.; GEWIDA, A. G. A. Effect of stocking density and probiotic dietary supplementation on growth performance, feed conversion and survival of postlarvae of the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 17, p. 81-90, 2013.
- ABRAHAM, T. J. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. **WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3-4, p. 28-31, 2004.
- ABRUNHOSA, F. **Curso técnico em pesca e aquicultura – Carcinocultura**. Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Pará/Brasil. p.82, 2011.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁSQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO, F. Differences in the Susceptibility of American White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* Species. **Journal invertebrate Pathology**, v. 78, p. 215-219, Apr 2001.
- AHMED, S.T.; ISLAM, M.; MUN, H.S.; SIM, H.J.; KIM, Y.J.; YANG, C.J. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p.1963–1971, 2014.
- ANDERSON, I. G.; SHAMSUDIN, M. N.; NASH, G. A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. **Aquaculture**, v. 81, p. 213–223, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. ABCC. **Carcinocultura Marinha: Realidade Mundial, desafios e oportunidades para o Brasil**. Palestra apresentada na Câmara Setorial da Carcinocultura. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. ABCC. **Boletim Internacional: Notícias da produção, do mercado mundial e da tendências de demanda e preços do camarão cultivado**. Ano IV, n. 1, Janeiro/2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. ABCC. Ano XIX, n. 1, junho de 2017. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2017/06/REVISTA-ABCC-EDICAO-JUNHO-2017.pdf>. Acesso em 27/08/2017.
- AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology: A Practical Guide book**. 2. Ed. Louisiana, United States: The World Aquaculture Society, 2012. 283p.
- AVNIMELECH, Y. Carbon:nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227-235, 1999.
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, Y.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚRQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173-186, 2006.

BAIRAGI, A.; GHOSH, K.S.; SEN, S.K.; RAY, A.K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v.10, n.2, p. 109-121, 2002.

BARBIERI, E.; DE MEDEIROS, A.M.Z.; HENRIQUES, M.B. Oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile pink shrimp in culture: temperature effects. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 49, p.19-25, 2016.

BRITO, R.; ROSAS, C.; CHIMAL, M. E.; GAXIOLA, G. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 257-266, 2001.

BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J.; MCLINTOSH, R. P.; BAUMAN, R. H.; PEARSON, D. C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**, v. 219, p. 393-411, 2003.

CAIPANG, C.M.A; KULKARNI, A.; KIRON, V. Physiological responses of a cold-water shrimp, *Pandalus borealis* to bacterial lipopolysaccharide and synthetic double-stranded RNA, poly I: C. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 409, p. 180-185, 2011.

CAO, H.; HE, S.; WEI, R.; DIONG, M.; LU, L. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: a potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-7, 2011.

CARVALHO, J. M.M.; PAULA NETO, F.L.; NASCIMENTO, F.O.T.; FEITOSA, R.A. **Perspectiva para o desenvolvimento da carcinocultura no Nordeste Brasileiro**. Série Doc. Do ETENE, n. 2, Fortaleza: BNB. 131p. 2005.

COLORNI, A. A study on the bacterial flora of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia* salina nauplii. **Aquaculture**, v. 49, p. 1–10, 1985.

CRAB, R.; LAMBERT, A.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1643-1649, 2010.

DALL, W.; MORIARTY, D.J.W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Bliss, D. E. The Biology of Crustacea, Internal Anatomy and Physiological Regulation. **Academic Press**, v. 5, p. 215-261, 1992.

DALMIN, G.; KATHIRESAN, K.; PURUSHOTHAMAN, A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 939-942, 2001.

DAS, A.; NAKHRO, K.; CHOWDHURY, S.; KAMILYA, D. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 35, p. 1547–1553, 2013.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W.; LAVENS, P. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, n.4, p. 334-338, 2008.

DEESEENTHUM, S.; LEELAVATCHARAMS, V.; BROOK, D. J. Effects of feeding *Bacillus* spp. as probiotic bacteria on growth of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De man). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 1481–1485, 2007.

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

DOUGLAS, S. E.; MANDLA, S.; GALLANT, J. W. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture** [S.I.], v. 190, n. 3-4, p. 247-260, 2000.

EBELING, J.M.; TIMMONS, M.B.; BISOGNI, J.J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p.346-358, 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. Roma, 243p. 2014.

FERNÁNDEZ-GIMENEZ, A. V.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE DEL TORO, M. A.; FENUCCI, J. L. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, *Penaeidae*) and relationship with molting. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** [S.I.], v. 132, n. 3, p. 593-598, 2002.

FERREIRA, A.H.C.; ARARIPE, M.N.B.A.; MONTEIRO, C.A.B.; LOPES, J.B.; ARARIPE, H.G.A. Uso de probióticos na aquicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 5, p. 1965-1980, 2012.

FERREIRA, G.S.; BOLÍVAR, N.C.; PEREIRA, S.A.; GUERTLER, C.; VIEIRA, F.N.; MOURIÑO, J.L.P.; SEIFFERT, W.Q. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 448, p. 273–279, 2015.

FRANCO, I.; BAGALDO, A.R.; GIL, L.; OLIVEIRA, E.A.G.; ALBINATI, R.C.B.; COSTA, M.M. Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos de camarões. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n. 2, p. 527-536, 2010.

FUJII, A.; COOK, E.S. Probiotics: antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega-guanidine acids and omega-guanidinoacyl-L-histidines. **Journal of Medicinal Chemistry**, 16, 1409–1411. 1973.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: Fuller, R. Ed. **Probiotics: the Scientific Basis**, Chapman & Hall, New York, p. 1-8, 1992.

FULLER, R. Probiotics in man and animals, a review. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

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

GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SUKUMARAN, R.; PANDEY, A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4597-4602, 2008.

GEERAERTS, S.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F.; IMMERSEEL, F.V. *Bacillus amyloliquefaciens* as prophylactic treatment for *Clostridium difficile*-associated disease in a mouse model. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 30, p. 1275–1280, 2015.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GOARANT, C.; ANSQUER, D.; HERLIN, J.; DOMALAIN, D.; IMBERT, F.; DE DECKER, S. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 105-113, 2006.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, p. 259–270, 2000.

GÓMEZ, R. G. D.; BALCÁZAR, J. L.; SHEN, M. A. Probiotics as control agents in aquaculture. **Journal of Ocean University of China**, v.6, n.1, p.76-79, 2007.

GONZALEZ, R.; GOMEZ, M.; CARRILLO, O. Variaciones cronobiológicas de la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 16, n. 1-3, p. 177-183, 1995.

GUIMARÃES, R. L. **Patógenos das famílias Vibrionaceae, Aeromonadaceae e Enterobacteriaceae isolados de camarão (*Penaeus* spp.) de vida livre no Rio de Janeiro e de criatórios (*Litopenaeus vannamei*) oriundos do Rio Grande do Norte**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 1-14, 2004.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, A.; DHAWAN, A. Probiotic based diets for freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Indian Journal of Fisheries**, v. 60, p. 03–109, 2013.

GUZMAN, C.; GAXIOLA, G.; ROSA, C.; TORRE-BLANCO, A. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 7, p. 113 -122, 2001.

HAGIHARA, H.; IGARASHI, K.; HAYASHI, Y.; ENDO, K.; IKAWA-KITAYAMA, K.; OZAKA, K.; KAWAI, S.; ITO, S. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1744-1750, 2001.

HERNANDEZ, J.Z.; NUNES, A.J.P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. **Revista da ABCC**, Recife, v. 3, n. 2, p. 55-59, 2001.

IGARASHI, K.; HATADA, Y.; HAGIHARA, H.; SAEKI, K.; TAKAIMA, M.; UERMURA, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3280-3282, 1998.

IRIANTO, A; AUSTIN, B. Probiotics in Aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 633–642, 2002.

KAEWKLOM, S.; LUMLERT, S.; KRAIKUL, W.; AUNPAD, R. Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi). **Food Control**, v. 32, p.552–557, 2013.

KEYSAMI, M. A.; SAAD, C. R.; DAUD, H. M.; SIJAM, K.; ALIMON, A. R. **A Preliminary study to isolation and identification of the aerobic putative bacterial flora in juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)**. Kustem 4th annual seminar held at Primula Beach Resort, Kuala Terengganu, Malaysia during May 2–3, 2005. Abstract book, 78p, 2005.

KEYSAMI, M. A.; SAAD, C. R.; SIJAM, K.; DAUD, H. M.; ALIMON, A. R. Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of postlarvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 131–136, 2007.

KEYSAMI, M.A.; MOHAMMADPOUR, M.; SAAD, C.R. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods of administration to the feed. **Aquaculture International**, v.20, n. 3, p. 499-511, 2012.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n.1, p. 1-14, 2008.

- KOLB, H. Die Behandlung acuter Infekte unter dem Gesichtswinkel der Prophylaxe chronischer Leiden. Über die Behandlung mit physiologischen bakterien. **Microecology and Therapy**, v.1, p. 15–19, 1955.
- KOLLATH, W. Ernährung und zahnsystem (Nutrition and the tooth system). **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 8, p. 7–16, 1953.
- KUBITZA, F. Produção aquícola no Brasil: principais espécies e polos de produção. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 150, p.1-12, 2015.
- KUMAR, N. R.; RAMAN, R. P.; JADHAO, S. B.; BRAHMCHARI, R. K.; KUMAR, K.; DASH, G. Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). **Aquaculture Internacional**, v. 21, p. 387-403, 2013.
- LAVORANTE, B. R. B. O.; SANTOS, P.N.; MENDES, P.T.S.; MENDES, E.S. Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.44, n.7, p.738-745, 2009.
- LAZADO, C. C.; CAIPANG, C.M.A. Atlantic cod in the dynamics probiotics research in aquaculture. **Aquaculture**, v. 424-425, p. 53-62, 2014.
- LE CHEVALIER, P.; VAN WORMHOUDT, A. Alpha glucosidase from the hepatopâncreas of the shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea - Decapoda). **Journal of Experimental Zoology [S.I.]**, v. 280, p. 384-394, 1998.
- LE MOULLAC, G.; KLEIN, B.; SELLOS, D.; VAN WORMHOUDT, A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 208, p. 107-125, 1996.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131. 2000.
- LEE, P. G.; LAWRENCE, A. L. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). **Journal of the World Mariculture Society**, v. 16, p. 257-287, 1985.
- LEE, Y. J.; KIM, B.K.; LEE, B.H.; JO, K.I.; LEE, K.; CHUNG, C.H.; LEE, Y.C.; LEE, J.W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 378–386. 2008.
- LEMOES, D.; RODRIGUEZ, A. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. **Aquaculture**, v. 160, p. 103-116, 1998.
- LI, J. Q.; TAN, B.P.; MAI, K.S. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbiol. Populations, immune responses and resistance to White spot

syndrome vírus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 291, n. 1-2, p. 35-40, 2009.

LI, J.; XU, Y.; JIN, L.; LI, X. Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). **Aquaculture Research**, v. 46, p.3008–3019. 2015.

LIGHTNER, D. V. et al. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. **Global Aquaculture Advocate**, v. 15, p.40-43, 2012.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science (New York, N.Y.)**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIU, C. H.; CHIU, C. S; HO, P. L.; WANG, S. W. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal Applied Microbiology**, v.107, p. 1031-1041, 2009.

LOMERÍ-ORTEGA, C. O.; MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture**, v. 434, p. 208-211, 2014.

LOVETT, D. L.; FELDER, D. L. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) **Biology Bulletin**, v. 178, p. 144-159, 1990.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 11. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2004.1036p.

MAGNOTTI, C. C. F. **Cultivo heterotrófico do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* avaliando duas metodologias de remoção de sólidos**. Florianópolis, UFSC, 2011. 37p.

MARTINS, A. K. S.; MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F. O gênero *Bacillus* e sua utilização probiótica. **Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada**, v. 1, n. 1, p. 15-23, 2013.

MENDES, E. S.; LIRA, S. F.; GÓES, L. M. N. B.; DOURADO, J.; MENDES, P. P.; ALVES, C. A. B. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água doce de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1191-1199, 2009.

MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current Microbiology**, v. 63, p. 1-7, 2011.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. MPA. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil. 2013.

MOLINA C.; CADENA, E.; ORELLANA, F. **Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda**. In: V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (ed. by L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-

Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa & R. Civera-Cerecedo). Mérida, Yucatán, México, p. 358-380, 2000.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S. Enfermedades bacterianas. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Patología e inmunología de camarones penaeidos**. Programa cyted área de agroalimentación RED II-D: Red Vannamei. Panamá, 2008, p. 116-133.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S.; LOZANO-OLVERA, R.; HERNÁNDEZ-SILVA, A. J. Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. **Tilapia & Camarones**, n. 5., p. 33-39, 2010.

MOSS, S. M.; DIVAKARAN, S.; KIM, B. G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 125-131, 2001.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; VIEIRA, F. N. Utilização de probióticos na aqüicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 20, p. 52-59, 2010.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 281-288, 2009.

NAVINCHANDRAN, M.; LYAPPARAJ, P.; MOOVENDHAN, S.; RAMASUBBURAYAN, R.; PRAKASH, S.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p.38-45, 2014.

NEWAJ-FYZULA, A.; AL-HARBI, A.H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v.431, p. 1-11, 2013.

NIMRAT, S.; TANUTPONGPALIN, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. **Aquaculture International**, v.21, p.655-666, 2013.

OCHOA-SOLANO, J. L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiology**, v. 23, n.6, p. 519-525, 2006.

OUDJERIOUT, N.; MOREAU, Y.; SANTIMONE, M.; SVENSSON, B.; MARCHIS-MOUREN, G.; DESSEAUX, V. On the mechanism of α -amylase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 3871-3879, 2003.

PANIGRAHIA, A.; KIRONA, V.; PUANGKAEWA, J.; KOBAYASHIB, T.; SATOHA, S.; SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 243, p. 241-254, 2005.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v.29, p.4-8, 1974.

PERAZZOLO, L. M.; BARRACCO, M. A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, n.5, p. 385-395, 1997.

PRASAD, L.; NAYAK, B. B.; SRIVASTAVA, P. P.; REDDY, A. K.; KOHLI, M. P. S. Use of Brewer's Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoter in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) post larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 13, p. 447-452, 2013.

PURI, S.; BEG, Q. K.; GUPTA, R. Optimisation of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, v. 44, p. 286-290, 2002.

PURIVIROJKUL, W. Application of Probiotic Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria in Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* culture. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.13, p. 187-196. 2013.

QIAO, G.; XU, D.; WANG, Z.; JANG, I.; QI, Z.; ZHANG, M.; KIM, S. Comparison of immune response of Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.44, n. 1, p. 257-264, 2015.

RAHIMAN, K. M. M.; JESMI, Y.; THOMAS, A. P.; HATHA, A. A. M. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v. 41, n.9, p. 120-134, 2010.

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

RAVI, A. V.; MUSTHAFA, K. S.; JEGATHAMMBAL, G.; KATHIRESAN, K.; PANDIAN, S. K. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 219-223, 2007.

RAY, A. J.; SEABORN, G.; LEFFLER, J. W.; WILDE, S. B.; LAWSON, A.; BROWDY, C. L. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. **Aquaculture**, v. 310, p. 130-138, 2010.

REDA, R. M.; SELIM, K. M. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, **Aquaculture International**, v. 23, p. 203-217, 2014.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v. 191, n.4, p. 271-288, 2000.

RINGO, E.; GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, p. 177–203, 1998.

RINISHA, K.; MUJEEB RAHIMAN, K. M.; RAZIA BEEVI, M.; THOMAS, A. P.; MOHAMED HATHA, A. A. Probiotic effects of *Bacillus* spp. on the growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Technologies**, v. 47, p. 173-178, 2010.

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Socioeconômicos, sustentabilidade ambiental, entraves e oportunidades. **Revista da ABCC**, v. 8, n. 1, Natal, p. 26-34, 2011.

ROSAS, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; ARENA, L.; LEMAIRE, P.; SOYEZ, C.; VAN WORMHOUDT, A. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** [S.I.], v. 249, n. 2, p. 181-198, 2000.

RUSCH, V. Probiotics and definitions: a short overview. **In: Probiotics: Bacteria and Bacterial fragments as Immunomodulatory agentes** (eds P.J. Heidt, T. Midtvedt, V. Rusch and Van der Waaij), Old Herborn University Seminar , n. 15, p. 1-4, 2002.

SAAD, S. A.; HABASHY, M. M.; SHARSHAR, M. K. Growth response of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to diets having different levels of Biogen®. **Journal of World Applied Science**, v. 6, p. 550–556, 2009.

SÁNCHEZ-PAZ, A.; GARCÍA-CARREÑO, F.; MUHLIA-ALMAZÁN, A.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation condition. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 292, p. 1–17, 2003.

SANTOS, C. H. A.; Lourenço, J. A.; BPTISTA, R. B.; IGARASHI, M. A. Crescimento e sobrevivência do camarão-branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em diferentes salinidades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 783-789, 2009.

SEENIVASAN, C.; BHAVAN, P. S.; RADHAKRISHNAN, S. Effect of probiotics (Binifit™) on survival, growth, biochemical constituents and energy budget of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. **Elixir Aquaculture**, v. 41, p. 5919–5927, 2011.

SEENIVASAN, C.; BHAVAN, P. S.; RADHAKRISHNAN, S.; SHANTHI, R. Enrichment of *Artemia nauplii* with *Lactobacillus sporogenes* for enhancing the survival, growth and levels of biochemical constituents in the post-larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 12, p. 23–31, 2012a.

- SEENIVASAN, C.; BHAVAN, P. S.; RADHAKRISHNAN, S.; MURALISANKAR, T. Effects of probiotics on survival, growth and biochemical characteristics of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* Post Larvae. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 12, p. 331–338, 2012b.
- SEENIVASAN, C., RADHAKRISHNAN, S.; MURALISANKAR, T., BHAVAN, P. S. Influence of combined probiotics *Lactobacillus sporogenes* and *Bacillus subtilis* on survival, growth, biochemical changes and energy utilization performance of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) post larvae. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 4, p. 29–34, 2012c.
- SEENIVASAN, C., RADHAKRISHNAN, S.; MURALISANKAR, T., BHAVAN, P. S. *Bacillus subtilis* on survival, growth, biochemical constituents and energy utilization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 38, p. 195–203, 2012d.
- SEENIVASAN, C., RADHAKRISHNAN, S.; MURALISANKAR, T., BHAVAN, P. S. Efficacy of probiotics on survival, growth, biochemical changes and energy utilization performance of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) post-larvae. **Journal of Scientific Research**, v. 4(3), p. 729–740, 2012e.
- SEENIVASAN, C.; RADHAKRISHNAN, S.; SHANTHI, R.; MURALISANKAR, T.; BHAVAN, P. S. Influence of probiotics on survival, growth, biochemical changes and energy utilization performance of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 68, p. 74-83, 2015.
- SHAILENDER, M. K. P. Effect of probiotics on growth and survival of post larvae of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **International Journal of Bioassays**, v. 1, n.12, p. 184, 2012.
- SHARMILA, R.; ABRAHAM, T. J.; SUNDARARAJ, V. Bacterial flora of semi-intensive pond-reared *Penaeus indicus* (H.Milne Edwards) and the environment. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.11, p.193-203, 1996.
- SHINDE, A. N.; MULYE, V. B.; CHOGALE, N. D.; BHATKAR, V. R.; BONDRE, R. D.; MOHITE, A. S. Effect of different probiotics *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) post larvae. **Aquaculture**, v. 9, p. 7-12, 2008.
- SOTO-RODRIGUEZ, S. A.; GOMEZ-GIL, B.; LOZANO-OLVERA, R.; BETANCOURT-LOZANO, M.; MORALES-COVARRUBIAS, M. S. 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 Environmental Microbiology**, v. 81, p. 1689-1699, 2015.
- STEPHENSON, K.; HARWOOD, C. R. Influence of a cell-wall-associated protease on production of α -amylase by *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2875-2881, 1998.

THY, H. T. T.; TRI, N. N.; QUY, O. M.; FOTEDAR, R.; KANNIKA, K., UNAJAK, S.; AREECHON, N. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 60, p.391–399, 2017.

TRAN, L.; NUNAN, J.; REDMAN, R. M.; MOHNEY, L. L.; PANTOJA, C. R.; FITZSIMMONS, K.; LIGHTNER, D. V. Determination of the infectious nature of the agente of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, p. 45-55, 2013.

TSENG, D.; HO, P.; HUANG, S.; CHENG, S.; SHIU, Y.; CHIU, C.; LIU, C. Enhancement of immunity and disease resistance in the White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n.2, p. 339-344, 2009.

VALENTI, W.C. **Criação de camarões de água doce**. Em: Congresso de Zootecnia, 12º Vila Real, Portugal, 2002, Vila Real: Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos. Anais p 229-237, 2002.

VAN WORMHOUDT, A.; FAVREL, P. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda) amylase system: study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** [S.I.], v. 89, p. 201-207, 1998.

VANDENBERGHE, J.; THOMPSON, F. L.; GOMEZ-GIL, B; SWINGS, J. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**, n. 219, p. 9–20, 2003.

VARGAS-ALBORES, F.; JIMÉNEZ-VEJA, G.; SÖDERHÄLL, K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus carliforniensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 20, p. 299-306. 1996.

VENKAT, H. K.; NAROTTAM, P. S.; KAMAL, K. J. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 501–507, 2004.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELVOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agentes in aquaculture. **Microbiology molecular biology reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

VERGIN, F. Anti- und Probiotika (Anti- and probiotics). **Hippokrates**, v. 25, p.116–119, 1954.

VENKAT, H. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K. Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v. 35, n.5, p. 501-507, 2004.

VIDAL, M. F.; XIMENES, L. J. F. Carcinicultura no Nordeste: velhos desafios para geração de emprego e de renda sustentáveis, até quando? **Caderno setorial ETENE**, ano 1, n.1, setembro, 2016.

VIEIRA, R. H. S. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C.; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M.; CARVALHO, R. L. *Vibrio spp.* e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arq. de Ciências do Mar**, v. 33, p. 107-112, 2000.

VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; MOURINO, J. P. L.; JATOBÁ, A.; MARTINS, L. L.; SCHLDER, D. D.; ANDREATTA, E. R.; BARRACO, M. A.; VINATEA, L. A. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.3, p. 631-638, 2010.

VIEIRA, F. N. **Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha**. 2010.133p. Tese (Doutorado em Aquicultura)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 404-427, 2006.

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

WANG, Y.; FUL, L.; LIN, J. Probiotic (*Bacillus coagulans*) cell in the diet benefit the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Shellfish Research**, v.31, n.3, p. 855-860, 2012.

XU, W.; PAN, L. Enhancement of immune response and antioxidante status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating hight C/N ratio of feed input. **Aquaculture**, v. 412,n. 413, p. 117-124, 2013.

XUE, M.; WEN, C.; LIANG, H.; DING, M.; WU, Y.; LI, X. In vivo evaluation of the effects of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period. **Aquaculture Research**, 47, 1661-1669. 2016.

ZHANG, Q., TAN, B., MAI, K., ZHANG, W., MA, H., AI, Q., WANG, X., LIUFU, Z. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda:Penaeidae). **Aquaculture Research**, v. 42, p. 943-952, 2011.

ZHANG, Q.;HUANG, J.; LI, F.; LIU, S.; LIU, Q.; WEI, J.; LIANG, G.; XIANG, J. Molecular characterization, immune response against white spot syndrome vírus infection of peroxiredoxin 4 in *Fenneropenaeus chinensis* and its antioxidante activity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 37, p.38-45, 2014.

ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M. H.; TAKAMI, G. .; LOVETT, D. L.; MIRVAGHEFI, A.; SHAKOURI, M. The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotcs on digestive enzyme

activity, survival and growth in the Indian White shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516-524, 2006.

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

ZOKAEIFAR, H.; BALCAZAR, J. L.; SAAD, C.R.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K.; ARSHAD, A.; NEJAT, N. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 683–689, 2012.

ZOKAEIFAR, H.; BABAEI, N.; SAAD, C. R.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K.; BALCAZAR, J. L. 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 and Shellfish Immunology**, v.36, p. 68-74, 2014.

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

a) Meio líquido de tripticaseína de soja (tryptic soy) diluído 10 vezes (1/10 TSL): diluir 3 a 4 g do meio, dependendo do fabricante, em 1L de água destilada (H_2O_d);

b) Solução indicadora de cromo azurol S (CAS): Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 6 mL da solução de HDTMA 10 mM e um pouco de H_2O_d . Adicionar, lentamente e sob agitação, 1,5 mL da solução férrica Fe^{3+} ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 mM e HCl 0,01M) e 7,5 mL de uma solução aquosa de cromo azurol S 2 mM (12,2mg em 10mL de H_2O_d). Dissolver, separadamente, 4,307g de piperazina anidra em 20 mL de H_2O_d adicionando 6,25mL de $HCl_{concentrado}$ (36,5% a 38%) com cuidado. Essa solução tampão (pH = 5,6) é, então, transferida para o balão volumétrico e o volume é completado para 100 mL com H_2O_d ;

b.1) Solução de brometo de hexadeciltrimilamônio (HDTMA 10 mM): em um balão volumétrico de 1L, dissolver 3,645 g de HDTMA em um pouco de H_2O_d , agitar e completar o volume;

b.2) Solução de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 mM: em um balão volumétrico de 1L, dissolver 0,270 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ em um pouco de H_2O_d , agitar e completar o volume;

b.3) Solução de HCl 0,01M: em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar um pouco de H_2O_d , em seguida, adicionar 0,82 mL de $HCl_{concentrado}$ (36,5% a 38%), agitar e completar o volume com H_2O_d ;

b.4) juntar os tópicos b.2 e b.3 para fazer a solução férrica Fe^{3+} .

Após cultivo das bactérias em frascos erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de 1/10 TSL, centrifugar a suspensão de células a 12.000 g por 10 min, transferir 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio, adicionar 1 mL da solução de CAS e visualizar a mudança na coloração.

ANEXO A - MATERIAL ADICIONAL/DADOS COMPLEMENTARES

Figura adicional 1

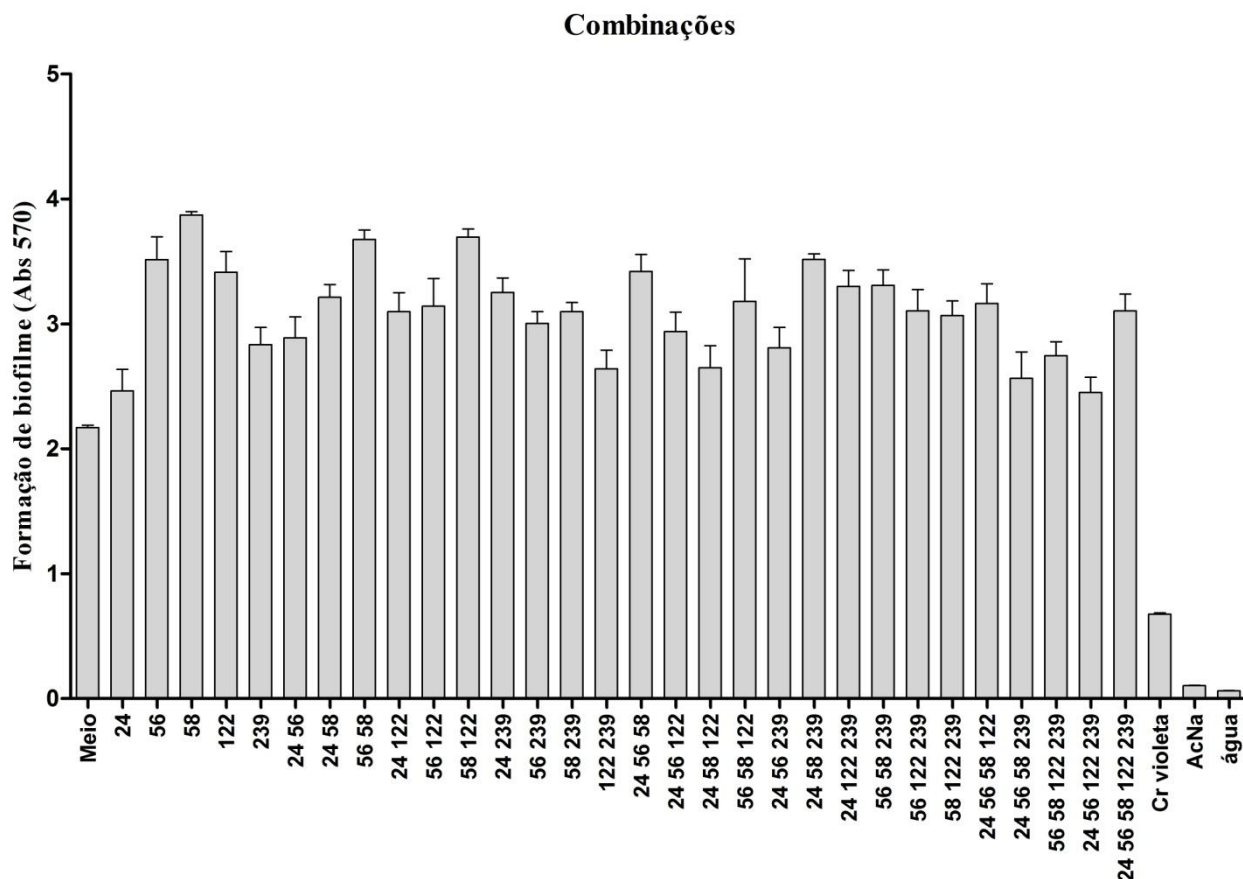


Figura: Formação de biofilme de cinco cepas selecionadas em monocultura e cocultura. Biofilme formado pelo isolado IPA24 (*Bacillus amyloliquefaciens*), IPA56 (*Bacillus subtilis*), IPA58 (*Bacillus sp.*), IPA122 (*Bacillus pumilus*) e IPA239 (*Bacillus amyloliquefaciens subs. amyloliquefaciens*) quando alíquotas de 40 μ L das culturas diluídas foram incubadas em coculturas de dois, três, quatro e cinco isolados e completadas com meio TSB estéril em volume final de 200 μ L. Ensaios para detecção de efeito sinérgico foram realizados com seis réplicas. Barras representam as médias ($\pm$ erro padrão médio) de seis réplicas.

ANEXO B - GUIA PARA AUTORES PARA SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS AO PERIÓDICO INTERNACIONAL “AQUACULTURE”



AQUACULTURE

An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0044-8486

DESCRIPTION

The aim of the Journal is to publish and make available the highest quality international scientific contributions to aquaculture. The Journal publishes disciplinary, interdisciplinary and transdisciplinary aquaculture research. The scope of Aquaculture includes the traditional priorities of its sections, but also includes papers from non-traditional scientific areas such as sustainability science, social-ecological systems, ornamental, conservation and restoration related to aquaculture.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Aquaculturists, Fisheries Scientists, Marine Biologists.

IMPACT FACTOR

2016: 2.570 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
EMBIology
BIOSIS
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Freshwater and Aquaculture Contents Tables
Marine Science Contents Tables
Engineering Village - GEOBASE
Scopus
Elsevier BIOBASE

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

B.A. Costa-Pierce, Marine Science Education and Research Center, University of New England, 11 Hills Beach Road, Biddeford, Maine, 04005, USA
(Production Sciences)

Section Editors:

J. A. H. Benzie, University College Cork, Cork, Ireland
(Genetics)

P. Bossier, Ghent University, Gent, Belgium
(Diseases)

D.M. Gatlin, Texas A&M University, College Station, Texas, USA
(Vertebrate Nutrition)

G. Iwama, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada
(Vertebrate Physiology)

D.C. Little, University of Stirling, Stirling, UK
(Social Aspects of Aquaculture)

W.A. O'Connor, NSW Fisheries, Taylors Beach, New South Wales, Australia
(Invertebrate Physiology)

M.T. Viana, Universidad Autonoma de Baja California, Ensenada, Mexico
(Invertebrate Nutrition)

Editorial Advisory Board:

Q. Ai, Qingdao, China

B. Argue

R. Ballestrazzi, Pagnacco (UD), Italy

B. Belton, East Lansing, Michigan, USA

T.J. Benfey, Saint John, New Brunswick, Canada

A. Bonaldo, Bologna, Italy

P. Boudry, Plouzane, France

E.G. Boulding, Guelph, Ontario, Canada

A.H. Buschmann, Puerto Montt, Provincia Llanquihue, Chile

S. Bush, Wageningen, Netherlands

A. Canario, Faro, Portugal

G. Claireaux, Plouzane, France

C. Crawford, Taroona, Tasmania, Australia

K. Dabrowski, Columbus, Ohio, USA

W.S. Davidson, Burnaby, British Columbia, Canada

E.M. Donaldson, West Vancouver, British Columbia, Canada

J. Duston, Truro, Nova Scotia, Canada

S.-J. Fu, Chongqing City, China

J. Galindo-Villegas, Murcia, Spain

A. García-Ortega, Hilo, Hawaii, USA

F.J. Gatesoupe, Plouzane, France

B. Gjerde, Ås, Norway

E.M. Hallerman, Blacksburg, Virginia, USA

R.W. Hardy, Hagerman, Idaho, USA

D. Hedgcock, Los Angeles, California, USA

W.K. Hershberger

M. Jobling, Tromsø, Norway

A. Kause, Jokioinen, Finland

S.J. Kaushik, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

F. Kruijssen, Amsterdam, Netherlands

F. Lahnsteiner, Salzburg, Austria

P. Li, Hong Kong, Hong Kong

I. Lupatsch, Swansea, UK

R. Mann, Gloucester Point, Virginia, USA

C.C. Mylonas, Iraklion, Crete, Greece

A. Newaj-Fyzul, Chaguanas, Trinidad and Tobago

G. Paladini, Stirling, UK

D.J. Penman, Stirling, UK

T.G. Pottinger, Ambleside, UK

J.G. Qin, Adelaide, South Australia, Australia

S.-S. Sheen, Keelung, Taiwan, ROC

B.C. Small, Carbondale, Illinois, USA

D. Teichert-Coddington, Boligee, Alabama, USA
H. Thorarensen, Sauðárkrókur, Iceland
A.A. van Dam, Delft, Netherlands
J. Vielma, Jyväskylä, Finland
K.T. Wada, Yokohama-Shi, Japan
T. Yamamoto, Tamaki, Japan
G.-H. Yue, Singapore, Singapore
X.-H. Zhang, Qingdao, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere. Articles are expected to contribute new information (e.g. novel methods of analysis with added new insights and impacts) to the knowledge base in the field, not just to confirm previously published work.

Review Articles can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Contact details for submission

Papers for consideration should be submitted via the electronic submission system mentioned below to the appropriate Section Editor:

Nutrition:

D.M. Gatlin

The Nutrition Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews on various aspects of aquatic animal nutrition relevant to aquaculture. Manuscripts addressing the following areas of investigation are encouraged:

- 1) determination of dietary and metabolic requirements for various nutrients by representative aquatic species. Studies may include environmental/stress effects on animal's physiological responses and requirements at different developmental stages;
- 2) evaluation of novel or established feedstuffs as well as feed processing and manufacturing procedures with digestibility and growth trials. Such studies should provide comprehensive specifications of the process or evaluated ingredients including nutrients, potential anti-nutrients, and contaminants;
- 3) comparison of nutrient bioavailability from various ingredients or product forms as well as metabolic kinetics of nutrients, food borne anti-nutrients or toxins;
- 4) identification of key components in natural diets that influence attractability, palatability, metabolism, growth reproduction and/or immunity of cultured organisms;
- 5) optimization of diet formulations and feeding practices;
- 6) characterization of the actions of hormones, cytokines and/or components in intracellular signaling pathway(s) that influence nutrient and/or energy utilization.
- 7) evaluation of diet supplementation strategies to influence animal performance, metabolism, health and/or flesh quality.

Manuscripts concerning other areas of nutrition using novel or advanced methods are also welcome. Please note that in regard to various diet additives such as probiotics, prebiotics, herbal extracts, etc., a very large number of papers have already been published. Therefore, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present initial and preliminary investigations of such additives. Manuscripts addressing these and other feed additives will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved in their metabolism. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

Aquaculture Production Science:

B.Costa-Pierce

AQUACULTURE PRODUCTION SCIENCE (PS) is one of 5 sections of the international journal AQUACULTURE dedicated to research on improvements and innovations in aquatic food production.

This section supports worldwide dissemination of the results of innovative, globally important, scientific research on production methods for aquatic foods from fish, crustaceans, mollusks, amphibians, and all types of aquatic plants. Contributions are encouraged in the following areas: 1) Improvement of production systems that results in greater efficiencies of resource usage and sustainability of aquaculture; 2) Effective applications of technologies and methods of aquaculture production for improved stocking regimes; 3) The use of new species and species assemblages; and, 4) Investigations to minimize aquaculture wastes and improve water quality, including technologies for nutrient recycling in aquaculture ecosystems, and potential synergy of aquaculture and other food production systems using methods such as polyculture and integrated aquaculture. Aspects of seafood processing and technology will not be considered in this section although aquaculture techniques that may influence the nutritional value of aquatic food products may be considered in the Nutrition Section.

Physiology:

Fish: A. P. (Tony) Farrell

Invertebrates: J. Benzie

The Physiology Section welcomes high quality papers that present either novel research data or original reviews. The content must be relevant to solving aquaculture problems on all aspects of the physiology of cultured aquatic animals and plants.

Submitted manuscripts must have a valid hypothesis or objective, clearly state the relevance to aquaculture, have proper experimental design with appropriate controls and utilize appropriate statistical analysis. Mention of trade names is limited to the main text.

Relevant physiological topics include, but are not limited to: Reproductive and endocrine physiology, including control of development and sex differentiation, induced ovulation and spermiation, gamete quality, storage and cryopreservation, physiology of gynogenetic, and triploid and transgenic organisms Cardiorespiratory, muscle and exercise physiology Osmoregulatory physiology Digestive physiology, including endocrine and environmental regulation of growth Larval physiology and ontogeny, including metamorphosis, smolting and molting Performance under variable culture conditions, including temperature, water quality, rearing density, and stress and disease physiology Physiology of harvest and handling techniques

Genetics:

G. Hulata

The Genetics Section welcomes high-quality research papers presenting novel data, as well as critical reviews, on various aspects of selective breeding, genetics and genomics. Submitted manuscripts must have a valid hypothesis or objective, clearly state the relevance to aquaculture, have proper experimental design with appropriate sample size and controls and utilize appropriate statistical analysis.

Relevant genetics topics include, but are not limited to: Breeding programs using classic selection procedures, markers or combining marker assisted selection with classic selection Applications of crossbreeding and interspecific hybridization Evaluation of commercially important phenotypes among cultured strains, populations or stocks Applications of biotechnology and genetic manipulation methods Development of linkage maps, identification of QTL or association of commercially important traits with specific gene(s). Where appropriate, linkage maps should include co-dominant markers, such as microsatellite DNA and SNP markers, to enable application to other populations and facilitate comparative mapping. Aquaculture will NOT accept manuscripts dealing with the application of well-described techniques to yet another species, unless the application solves a specific biological problem important to aquaculture production; or manuscripts dealing with gene cloning, characterizing of microsatellites, species identification using molecular markers, EST papers with small collections, or mapping papers with a small number of markers, unless the papers also deal with solving a biological problem that is relevant to aquaculture production.

Aquaculture will not accept manuscripts focusing mainly on population genetics studies that are based on RAPD and AFLP markers, since the dominance and multilocus nature of the fingerprints are not suitable for making inferences about population genetic diversity and structure.

Sustainability and Society:

D.C. Little

The Sustainability and Society section of the journal Aquaculture invites articles at the interface of natural and social sciences that address the broader roles of aquaculture in global food security and trade.

Aims and scope of the Sustainability and Society section are the: global dissemination of interdisciplinary knowledge regarding the management of aquatic resources and resulting impacts on people. Interconnections with other sectors of food production; resource management and implications for societal impact. Going beyond a narrow techno-centric focus, towards more holistic analyses of aquaculture within well-defined contexts. Enquiry based on understanding trajectories of change amid the global challenges of climate change and food security. Mixed methods and approaches that incorporate and integrate both social and natural sciences. Relevance for the diverse range of policy makers, practitioners and other stakeholders involved. Articles that take a value chain approach, rather than being wholly production orientated, are encouraged.

Disease

B. Austin

The Disease sections welcomes critical reviews and high quality articles containing novel data on all aspects concerning diseases of farmed aquatic species. The aims of the section are: description of new and emerging diseases including characterization of the causal agent(s), development in the understanding of fish pathogens for example including new methods of growth where this has been a problem for fastidious organisms, pathogenicity and epizootiology, developments in the diagnosis of disease going beyond the use of standard well used methods, and methods of disease control, notably new developments in vaccines, immunostimulants, dietary supplements, medicinal plant products, probiotics and prebiotics and genetically-disease resistant stock. Relevance to aquaculture must be demonstrated. Articles, which adapt well known methods without further refinement of those methods, are unlikely to be accepted.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made

- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

In order to facilitate the review process, please make sure your submission is prepared with:

- Double line spacing
- Continuously numbered lines throughout the manuscript
- Numbered pages

BEFORE YOU BEGIN

Author of papers to *Aquaculture* are requested to verify their experimental design. Results should always include biological replicates. These could be obtained by performing an experiment multiple times within the same time window (demonstrating repeatability) or by performing an experiment multiple times in different time windows (demonstrating reproducibility). In a typical experiment, a biological replicate in aquaculture is a tank. Individuals that were kept during the experiment in one single tank are not independent from each other and can hence not be considered as a biological replicate. Authors are also requested to consult *Aquaculture* Volume 437, 1 Pages 344-350 for further support on statistical processing of data.

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

If the manuscript to be submitted was previously rejected by *Aquaculture* or another journal, it is necessary to specify what substantive new work and/or revisions have been included to elevate the manuscripts quality for consideration by *Aquaculture*.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding

Please submit your article via <https://www.elsevier.com/profile/api/navigate/AQUA>

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Numbering.** Manuscripts that are sequentially numbered (e.g., I, II, etc.) are no longer accepted.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be not longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Highlights of the manuscript

As part of the submission process, authors are required to provide 3 or 4 highlights, each one sentence long. Beyond stating key discoveries, these highlights must explicitly establish why the work is novel and why it has an application to aquaculture. It is not sufficient to state that the species is one that is farmed.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and not Ca^{++} . Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ^{18}O . The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/aquaculture>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal Abbreviations Source

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

ANEXO C - PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO INTERNACIONAL

JULIANA A. INTERAMINENSE, JOANA L. VOGLEY, **CAROLINA K. GOUVEIA**, ROGÉRIO W. S. PORTELA, JOSÉ P. OLIVEIRA, HUMBER A. ANDRADE, SÍLVIO M. PEIXOTO, ROBERTA B. SOARES, DIEGO S. BUARQUE, RANILSON DE SOUZA BEZERRA. *In vitro* and *in vivo* potencial activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing". Aquaculture. 2018.

Accepted Manuscript

In vitro and in vivo potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing

Juliana A. Interaminense, Joana L. Vogeley, Carolina K. Gouveia, Rogério W.S. Portela, José P. Oliveira, Humber A. Andrade, Sílvio M. Peixoto, Roberta B. Soares, Diego S. Buarque, Ranilson de Souza Bezerra



PII: S0044-8486(17)31213-9
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.027>
 Reference: AQUA 633029
 To appear in: *aquaculture*
 Received date: 14 June 2017
 Revised date: 13 January 2018
 Accepted date: 17 January 2018

Please cite this article as: Juliana A. Interaminense, Joana L. Vogeley, Carolina K. Gouveia, Rogério W.S. Portela, José P. Oliveira, Humber A. Andrade, Sílvio M. Peixoto, Roberta B. Soares, Diego S. Buarque, Ranilson de Souza Bezerra, In vitro and in vivo potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. The address for the corresponding author was captured as affiliation for all authors. Please check if appropriate. Aqua(2017), <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.027>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.