

Ana Clara Chede Pereira da Silva

**DESEMPENHO DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO
ALIMENTADO COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM OS
PROBIÓTICOS *Lactobacillus plantarum* E *Bacillus* spp. EM
SISTEMA DE BIOFLOCOS**

Dissertação submetida como requisito final para a
obtenção do grau de Mestre em Aquicultura pela
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Dr. Felipe do Nascimento Vieira
Coorientadora: Dra. Norha Constanza Bolívar Ramírez

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Ana Clara Chede Pereira da
Desempenho do camarão-branco-do-pacífico
alimentado com ração suplementada com os probióticos
Lactobacillus plantarum e Bacillus spp. em sistema
de bioflocos / Ana Clara Chede Pereira da Silva ;
orientador, Felipe do Nascimento Vieira,
coorientadora, Norha Constanza Bolívar Ramirez, 2019.
47 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. bactérias probióticas. 3.
microbiologia. 4. Litopenaeus vannamei. 5. sistema
BFT. I. Vieira, Felipe do Nascimento . II. Ramirez,
Norha Constanza Bolívar . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

Desempenho do camarão-branco-do-pacífico alimentado com ração suplementada com os probióticos *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus spp.* em sistema de bioflocos

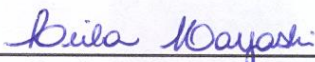
Por

ANA CLARA CHEDE PEREIRA DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

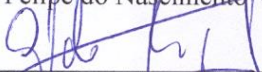


Profa. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

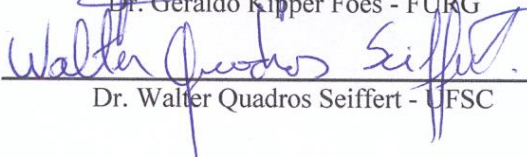
Banca Examinadora:



Dr. Felipe do Nascimento Vieira – *Orientador*



Dr. Geraldo Kipper Foes - FURG



Dr. Walter Quadros Seiffert - UFSC

Este trabalho é dedicado aos meus avôs
queridos Ablair e Pedro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais Jairo e Aline, por sempre batalharem muito pra serem os melhores pra mim, por tanto amor e dedicação e por tornarem tudo sempre possível. As minhas irmãs Carmem e Carol, por serem minhas melhores amigas e dividirem tudo comigo sempre.

Aos meus tios Helen e Wilson e a Nati, por sempre me acolherem com muito amor e carinho e serem tão bons pra mim.

Às minhas avós Jô e June, por serem as melhores do mundo e a toda a família Pereira da Silva, amo vocês muito!

Ao Prof. Felipe, por ser meu exemplo de dedicação, por ter me ajudado tanto e a quem tenho muito orgulho de dizer que é meu orientador.

À minha coorientadora Norha, por tanta ajuda e paciência durante o mestrado e por ter se tornado uma amiga querida.

Aos meus colegas de manejo Fernanda, Vitor e Bruno, por terem perdido tantos feriados de plantão hehe, vocês foram muito importantes pra realização deste trabalho, obrigada por terem sido tão prestativos e terem vestido a camisa comigo.

À Isa, Gabi e Claudinha, por toda a amizade que criamos e fortalecemos, por tantas risadas, tantas aventuras na qualidade de água, tantos conselhos e por terem me ensinado tanto.

Aos colegas do LCM, Pri, Jaque, Esmeralda, Mari, Ângela e tantos outros pelo companheirismo nestes dois anos que passaram.

Ao Davi, Ilson, Diego, Dimas, Déia e Carlos por estarem sempre prontos para ajudar, por toda a ajuda durante meu experimento e todo suporte sempre que precisei, enfim, obrigada a todo o grupo LCM por ser essa família que vai deixar muitas saudades.

Aos meus amigos e parceiros da vida, que tornaram tudo mais leve e divertido, Morgs, Lulu, Karol, Nico, Mateus, Marcela, Mari, Bru, May, Ana Paula, Iza, Gabi, Oli, Laura, Tamara, Rodrigo, Nina e Robi, vocês são demais, obrigada por estarem sempre comigo.

Ao Erick, que me incentivou a fazer esse mestrado, estive do meu lado em todos os momentos, bons e ruins, sempre me colocando pra cima e me ajudando tanto.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os probióticos *L. plantarum* e *Bacillus* spp., de forma conjunta e isolada, na criação de *L. vannamei* em sistema de bioflocos sobre os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e de qualidade de água do sistema. O experimento foi conduzido em doze unidades experimentais de 9.000 litros, contendo água com bioflocos. O experimento foi conduzido com quatro dietas diferentes: ração comercial com probiótico *L. plantarum* (10^7 UFC g^{-1} de *Lactobacillus plantarum*), ração comercial com probiótico *Bacillus* spp. ($3,3 \times 10^7$ UFC kg^{-1} de *Bacillus* spp.), ração comercial com probiótico *L. plantarum* + *Bacillus* spp. (10^7 UFC g^{-1} de *L. plantarum* + $3,3 \times 10^7$ UFC kg^{-1} de *Bacillus* spp.) e ração controle sem probiótico. Nos tratamentos com adição de *Bacillus* spp. na ração também foi adicionado probiótico na água do cultivo. Cada tratamento era composto por três réplicas, com duração de 50 dias de experimento. Biometrias foram realizadas semanalmente e foram feitas análises dos parâmetros de qualidade de água das unidades experimentais, aos 30 e 50 dias de experimento foram amostrados tratos digestivos de 10 camarões de cada tratamento e 10 ml da água do cultivo de cada tanque para a análise da água. Ao final do experimento, foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros zootécnicos, na qualidade de água e nas contagens de *Vibrio* spp. nas unidades experimentais do tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp., onde a sobrevivência e FCA foram significativamente menores e as concentrações de nitrito bem maiores. Com isso conclui-se que o uso combinado de dois diferentes probióticos não alteraram de forma positiva o desempenho dos camarões.

Palavras Chaves: Aquicultura, bactérias probióticas, microbiologia, *Litopenaeus vannamei*, sistema BFT.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the probiotics *L. plantarum* and *Bacillus* spp., in a combined and isolated, in the rearing of *L. vannamei* in a biofloc system on the growth performance, microbiological and water quality parameters of the system. The experiment was conducted in twelve experimental units of 9,000 liters, containing water with biofloc. The experiment was conducted with four different diets: commercial diet with probiotic *L. plantarum* (10^7 CFU g^{-1} of *Lactobacillus plantarum*), commercial diet with probiotic *Bacillus* spp. (3.3×10^7 UFC kg^{-1} of *Bacillus* spp.), Commercial diet with probiotic *L. plantarum* + *Bacillus* spp. (10^7 CFU g^{-1} from *L. plantarum* + 3.3×10^7 UFC kg^{-1} from *Bacillus* spp.) and control feed without probiotic. In the treatments with the addition of *Bacillus* spp. in the feed, probiotic was also added in the culture water. Each treatment consisted of three replicates, with a duration of 50 days of experiment. Weekly, a sample of animals were weighted in all tanks and analysis of the water quality parameters of the experimental units were performed. At 30 and 50 days of the experiment, 10 shrimp from each treatment and 10 ml of the culture water of each tank were sampled for water analysis. At the end of the experiment, statistical differences in growth performance, water quality and *Vibrio* spp. in the experimental treatment units *L. plantarum* + *Bacillus* spp., where survival and FCA were significantly lower and nitrite concentrations were higher. Therefore, it was concluded that the combined use of two different probiotics did not positively alter the performance of shrimp.

Keywords: aquaculture, probiotic bacteria, microbiology, *Litopenaeus vannamei*, BFT system.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água dos tanques de engorda de camarão *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos em diferentes tratamentos. Média \pm desvio padrão..... 29
- Tabela 2. Contagem microbiológica do intestino dos camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com as diferentes dietas após 30 dias de cultivo e 50 dias de cultivo em sistema de bioflocos..... 31
- Tabela 3. Contagem microbiológica da água do cultivo, após 30 e 50 dias de cultivo. 32
- Tabela 4. Índices produtivos do camarão *Litopenaeus vannamei* após 50 dias de cultivo em sistema de bioflocos. 33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
	A carcinicultura	17
	Sistema de bioflocos.....	18
	Probióticos.....	19
1.1	Objetivos	21
	Objetivo Geral.....	21
	Objetivos Específicos	21
1.2	Estrutura do trabalho.....	21
2	ARTIGO CIENTÍFICO	22
2.1	INTRODUÇÃO	24
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.2.1	Material biológico	26
2.2.2	Desenho experimental	26
2.2.3	Delineamento experimental.....	26
2.2.4	Parâmetros de qualidade de água.....	27
2.2.5	Análises microbiológicas.....	27
2.2.6	Índices zootécnicos.....	28
2.2.7	Análises estatísticas	28
2.3	RESULTADOS.....	28
2.3.1	Parâmetros de qualidade de água.....	28
2.3.2	Contagem microbiológica do intestino.....	30
2.3.3	Contagem microbiológica da água do cultivo	31
2.3.4	Parâmetros zootécnicos	32
2.4	DISCUSSÃO	34
2.4.1	Parâmetros de qualidade de água.....	34
2.4.2	Microbiologia intestino	34
2.4.3	Microbiologia da Água.....	35
2.4.4	Parâmetros Zootécnicos.....	36
2.5	CONCLUSÃO	37
2.6	AGRADECIMENTOS.....	37
2.7	REFERÊNCIAS.....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	43

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura

A aquicultura é a atividade agropecuária que mais cresce em termos de resultados produtivos e sua expansão tem acompanhado a intensificação dos cultivos nas últimas décadas (FAO, 2016). O camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é uma das espécies mais cultivadas dadas características como seu rápido crescimento, sua capacidade de adaptação a variações ambientais e produtividade (LOEBMANN et al., 2010). Porém, dados oficiais divulgados em 2017 (PPM/IBGE) apontaram que neste ano, a produção nacional de camarão apresentou uma redução de 21,4% em relação a 2016, produzindo 41 mil toneladas.

Mesmo sendo o camarão marinho um produto de elevado valor nutritivo e econômico, as enfermidades que têm acometido os cultivos são um dos fatores que afetam negativamente as perspectivas futuras desse setor (FAO, 2016). A intensificação dos cultivos em conjunto com práticas de manejo inadequadas resulta na deterioração das condições ambientais do cultivo e tem sido muitas vezes associada à alta incidência de enfermidades (Mohapatra et al. 2013).

Estas doenças são agentes limitantes da produção, e podem ser desencadeados pelo uso de pós-larvas infectadas, eventos climáticos inadequados para a espécie, deficiência nutricional, compostos tóxicos na água, eutrofização e acúmulo de matéria orgânica nos viveiros (KAUTSKY et al., 2000). Altas taxas de mortalidade, baixo crescimento e deformidades são alguns dos problemas enfrentados pelos produtores de camarão e que causam grandes perdas econômicas nos cultivos (MINE & BOOPATHY, 2011). Entre as enfermidades virais, destacam-se o vírus da mancha branca (WSSV), vírus da taura (TSV), vírus da cabeça amarela (YHV), vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e vírus da infecção hipódermal e necrose hematopoiética (IHHNV), são grandes causadores de mortalidades nos cultivos de camarão.

Contudo, perdas substanciais na produção também podem ocorrer devido a bactérias, fungos e parasitas (LIGHTNER, 2005), sendo as bactérias identificadas como uma das principais fontes de perdas de produção na indústria da carcinicultura (LIM et al., 2010). Entre as bactérias que desencadeiam enfermidades, atenção especial tem sido dada a *Vibrio parahaemolyticus*, responsável por significativas perdas na produção de camarões, sendo descrita como o principal agente etiológico causador da necrose aguda do hepatopâncreas (AHP=ND) ou síndrome

da mortalidade precoce (EMS, Early Mortality Syndrome) (Tran et al., 2013).

Como a utilização de antibióticos tem sido uma alternativa cada vez menos recomendável por serem comuns os casos de resistência bacteriana a estas moléculas, aumentou assim a demanda por formas alternativas de controle (ROCHA *et al.*, 2016; STALIN e SRINIVASAN, 2016). Na procura de soluções aos problemas de enfermidades, vem se destacando a utilização de aditivos nas dietas e o uso de sistemas bioseguros.

Sistema de bioflocos

A bioseguridade nos cultivos se tornou a preocupação central dos produtores de camarão, e com isso novas estratégias de produção surgiram. Tecnologias avançadas como o sistema de bioflocos (BFT) têm sido uma forte alternativa para aumentar a produtividade e garantir a bioseguridade dos cultivos. O BFT é um sistema fechado, com pouca ou nenhuma renovação de água, a qual permite uma elevada densidade de estocagem de camarões (Burford et al., 2004).

Para que a renovação de água possa ser reduzida ou cessada totalmente, torna-se fundamental o controle da amônia resultante do catabolismo proteico. Nesses sistemas, o acúmulo de amônia é controlado basicamente por duas rotas: 1) pela manipulação da relação carbono/nitrogênio que torna mais eficiente o processo de retirada do excesso de nitrogênio pelas bactérias heterotróficas (Avinimelech, 1999; McIntosh, 2001); 2) pelas bactérias quimioautotróficas, reponsáveis pela nitrificação no sistema através da oxidação da amônia em nitrito e posteriormente em nitrato. As bactérias heterotróficas utilizam o carbono orgânico disponível como fonte de energia e assimilam nitrogênio para formação de proteínas celulares (RAY & LOTZ, 2014) e as bactérias nitrificantes usam a amônia como fonte de energia (Cohen et al. 2005).

O sistema de produção em bioflocos atua como filtro orgânico que estimula o aparecimento de uma comunidade microbiana capaz de degradar matéria orgânica. Os microrganismos presentes no BFT colonizam os substratos e assimilam os componentes nitrogenados e, assim, formam-se os flocos microbianos. Os flocos são agregados compostos por fitoplâncton, zooplâncton, protozoários, bactérias e detritos (Burford et al., 2004). A comunidade microbiana pode ser administrada de formas diferentes, de modo que um manejo adequado influenciará diretamente a composição e a densidade bacteriana do meio.

Diversas pesquisas visando a otimização do sistema foram e estão sendo desenvolvidas, tais como: densidade de estocagem ideal (Lorenzo et al., 2015), diferentes fontes de fertilização orgânica (Zhao et al., 2016), controle de sólidos (Schweitzer et al., 2013), uso de substratos verticais (Rezende et al., 2018), manejo alimentar (Lara, 2016), entre outros. Contudo, o cultivo em sistema de bioflocos ainda é recente e necessita de adaptações e um maior conhecimento, para prosseguir o desenvolvimento sustentável do sistema.

Visto que este é um sistema de produção que estimula o aparecimento de uma comunidade microbiana, os sistemas de bioflocos se tornam também suscetíveis a surtos de organismos nocivos. As bactérias do gênero *Vibrio* são consideradas patógenos oportunistas ou secundários e estão naturalmente presentes no ambiente de cultivo. Este patógeno é altamente capaz de se aproveitar de alterações no sistema e ocupar nichos ecológicos relacionados ao uso da água como ambiente de cultivo em sistemas de aquicultura (Skjermos & Vadstein, 1999).

Diversas espécies de *Vibrio* já foram reportadas como patogênicas para camarões como *Vibrio damsela* (SONG et al., 1993), *V. harveyi* (PASHARAWIPAS et al., 2005), *V. orientalis* (ABRAHAM, PALANIAPPAN, 2004), *V. alginolyticus* (HSIEH et al., 2008), *V. furnissii* e *V. parahaemolyticus* (SUNG ET AL., 1999). Algumas destas espécies podem afetar o cultivo de camarões em decorrência de condições de estresse (LIU et al., 2009), tais como baixas concentrações de oxigênio e altas densidades de estocagem (Nunes & Martins 2002; Brown et al., 2012) causando mortalidades massivas de camarões produzidos em diversas localidades (Soto-Rodriguez et al., 2012).

Sendo assim, com a finalidade de conciliar a intensificação dos cultivos com a biossegurança e diminuir o uso de antibióticos, têm-se incentivado o desenvolvimento e implantação de novas práticas de produção. Pesquisas sobre o efeito de probióticos em sistemas de cultivo em bioflocos já vem sendo feitas, por exemplo, Krummenauer et al. (2014a) utilizaram em um cultivo infectado com *V. parahaemolyticus*, a inoculação com um probiótico, que suprimiu esse patógeno e melhorou significativamente o crescimento e a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei*.

Probióticos

São muitos os relatos positivos sobre o uso de probióticos para o cultivo de organismos aquáticos. O sucesso no seu uso depende diretamente da espécie de bactéria, a quantidade administrada e a

metodologia utilizada, bem como as condições do hospedeiro e sua microbiota intestinal e das condições da água e tecnologias empregadas no cultivo. (FEČKANINOVÁ et al., 2017).

Existem muitas definições de probióticos. Verschuere 2000 definiu o conceito de probióticos como “micro-organismos vivos que auxiliam beneficemente o hospedeiro pela modificação da comunidade microbiana deste, melhorando a resposta contra patógenos e aprimorando a qualidade do ambiente do hospedeiro.” Muitos autores não concordam com essa definição, por acreditarem que bactérias que atuam na qualidade de água e decompõem a matéria orgânica são biorremediadoras ou de biocontrole.

Por outro lado, Gatesoupe 1999 definiu como probiótico “microrganismo vivo que, ao ser ministrado, coloniza o trato digestório dos animais de cultivo com o objetivo de melhorar a saúde desses animais”. Sendo o trato intestinal a rota de transmissão primária no processo de infecção por patógenos (De Schryver and Vadstein, 2014), as bactérias probióticas podem competir com potenciais patógenos por nutrientes (Gatesoupe, 1999) ou por sítios de adesão no trato intestinal.

Partindo da ideia de que algumas bactérias probióticas atuam na colonização do trato e que outras também podem degradar a matéria orgânica ao mesmo tempo em que ajudam as enzimas digestivas, dois grupos de bactérias têm sido muito usados como probiótico para a aquicultura: as espécies do gênero *Bacillus* e as bactérias ácido lácticas.

Diversas espécies de *Bacillus* isoladas de cultivo de camarão foram capazes de inibir *in vitro* *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, como também tiveram a capacidade de reduzir as populações de *Vibrio* spp. no sistema de cultivo obtendo uma melhor resposta imunológica do camarão (Ferreira et al., 2015). Adicionalmente, alguns autores relatam que *Bacillus* é capaz de melhorar a qualidade da água de cultivo ajudando na degradação da matéria orgânica do sistema (VERSCHUERE et al., 2000).

Este grupo de bactérias possui uma grande vantagem com relação aos outros, que é a facilidade de ser produzida em escala e sua capacidade de esporulação, facilitando assim a inclusão em dietas e produtos comerciais (OCHOA-SOLANO et al., 2006).

Lactobacillus é o gênero de bactérias ácido lácticas mais utilizado atualmente, e a espécie *Lactobacillus plantarum* é um forte exemplo no emprego de bactérias lácticas como probiótico para algumas espécies de organismos aquáticos (Vine et al., 2006), isso se explica por serem de fácil multiplicação, produzirem compostos antimicrobianos (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e ácido láctico) e por estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (Gatesoupe, 2008).

De acordo com Vieira (2010), o uso de dieta suplementada com *L. plantarum* modificou a microbiota bacteriana intestinal de camarões em condições de fazenda comercial, diminuindo a população de *Vibrio* spp. e aumentando a de bactérias ácido lácticas, resultando em maior sobrevivência e eficiência alimentar dos camarões ao final do cultivo. Outros trabalhos também relatam o benefício para *L. vannamei*, do uso destas cepas suplementadas à dieta (Ramírez et al., 2006; Vieira et al., 2008, 2010). Porém, sua maior desvantagem está na ausência de esporos, que dificulta sua inclusão e durabilidade em dietas comerciais.

Na aquicultura, o uso de mais de um probiótico no cultivo não tem sido intensivamente estudado até o momento. Apesar de vários estudos evidenciarem bons resultados no uso dos dois probióticos separados, pouco se sabe da utilização conjunta dos dois grupos.

1.1 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os probióticos *L. plantarum* e *Bacillus* spp., de forma conjunta e isolada, na criação do camarão-branco-do-pacífico em sistema de bioflocos.

Objetivos Específicos

Avaliar o uso dos probióticos *L. plantarum* (suplementado na dieta) e *Bacillus* spp. (adicionado na água e suplementado na dieta) na criação do camarão-branco-do-pacífico em sistema de bioflocos sobre:

- a) Parâmetros zootécnicos (sobrevivência, crescimento, fator de conversão alimentar, produtividade, crescimento semanal);
- b) Microbiota bacteriana do trato digestório dos camarões;
- c) Qualidade da água.

1.2 Estrutura do trabalho

Formatado segundo as normas da revista Boletim do Instituto de Pesca (B1, ISSN 0046-9939).

2 ARTIGO CIENTÍFICO

DESEMPENHO DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO ALIMENTADO COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM OS PROBIÓTICOS *Lactobacillus plantarum* E *Bacillus* spp. EM SISTEMA DE BIOFLOCOS

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os probióticos *L. plantarum* e *Bacillus* spp., de forma conjunta e isolada, na criação de *L. vannamei* em sistema de bioflocos sobre os parâmetros zootécnicos, microbiológicos e de qualidade de água do sistema. O experimento foi conduzido em doze unidades experimentais de 9.000 litros, contendo água com bioflocos. O experimento foi conduzido com quatro dietas diferentes: ração comercial com probiótico *L. plantarum* (10^7 UFC g⁻¹ de *Lactobacillus plantarum*), ração comercial com probiótico *Bacillus* spp. ($3,3 \times 10^7$ UFC kg⁻¹ de *Bacillus* spp.), ração comercial com probiótico *L. plantarum* + *Bacillus* spp. (10^7 UFC g⁻¹ de *L. plantarum* + $3,3 \times 10^7$ UFC kg⁻¹ de *Bacillus* spp.) e ração controle sem probiótico. Nos tratamentos com adição de *Bacillus* spp. na ração também foi adicionado probiótico na água do cultivo. Cada tratamento era composto por três réplicas, com duração de 50 dias de experimento. Biometrias foram realizadas semanalmente e foram feitas análises dos parâmetros de qualidade de água das unidades experimentais, aos 30 e 50 dias de experimento foram amostrados tratos digestivos de 10 camarões de cada tratamento e 10 ml da água do cultivo de cada tanque para a análise da água. Ao final do experimento, foram encontradas diferenças estatísticas nos parâmetros zootécnicos, na qualidade de água e nas contagens de *Vibrio* spp. nas unidades experimentais do tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp., onde a sobrevivência e FCA foram significativamente menores e as concentrações de nitrito bem maiores. Com isso conclui-se que o uso combinado de dois diferentes probióticos não alteraram de forma positiva o desempenho dos camarões.

Palavras Chaves: Aquicultura, bactérias probióticas, microbiologia, *Litopenaeus vannamei*, sistema BFT.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the probiotics *L. plantarum* and *Bacillus* spp., in a combined and isolated, in the rearing of *L. vannamei* in a biofloc system on the growth performance, microbiological and water quality parameters of the system. The experiment was conducted in twelve experimental units of 9,000 liters, containing water with biofloc. The experiment was conducted with four different diets: commercial diet with probiotic *L. plantarum* (10^7 CFU g^{-1} of *Lactobacillus plantarum*), commercial diet with probiotic *Bacillus* spp. (3.3×10^7 UFC kg^{-1} of *Bacillus* spp.), Commercial diet with probiotic *L. plantarum* + *Bacillus* spp. (10^7 CFU g^{-1} from *L. plantarum* + 3.3×10^7 UFC kg^{-1} from *Bacillus* spp.) and control feed without probiotic. In the treatments with the addition of *Bacillus* spp. in the feed, probiotic was also added in the culture water. Each treatment consisted of three replicates, with a duration of 50 days of experiment. Weekly, a sample of animals were weighted in all tanks and analysis of the water quality parameters of the experimental units were performed. At 30 and 50 days of the experiment, 10 shrimp from each treatment and 10 ml of the culture water of each tank were sampled for water analysis. At the end of the experiment, statistical differences in growth performance, water quality and *Vibrio* spp. in the experimental treatment units *L. plantarum* + *Bacillus* spp., where survival and FCA were significantly lower and nitrite concentrations were higher. Therefore, it was concluded that the combined use of two different probiotics did not positively alter the performance of shrimp.

Keywords: aquaculture, probiotic bacteria, microbiology, *Litopenaeus vannamei*, BFT system.

2.1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas e sua alta incidência têm resultado em grandes mortalidades nos cultivos de camarões marinhos. As enfermidades tornaram-se um grande desafio para os produtores e são o principal fator que vem afetando negativamente a produção (FAO, 2016). Da mesma forma o desenvolvimento acelerado e a intensificação dos cultivos associado a más práticas de manejo também tem sido responsável pelo surgimento de enfermidades, que em geral são desencadeadas por compostos tóxicos na água, eutrofização e acúmulo de matéria orgânica (KAUTSKY et al., 2000). Deste modo, é imprescindível a adoção de boas práticas de manejo e alternativas que contribuam para uma maior biossegurança nos cultivos (STENTIFORD, 2012).

Nas últimas décadas, tecnologias avançadas como o sistema de bioflocos têm surgido como alternativa para aumentar a produtividade e garantir a biossegurança dos cultivos. Este sistema de produção atua como filtro orgânico que estimula o aparecimento de uma comunidade microbiana capaz manter a estabilidade dos níveis de nutrientes na água (WASIELESKY et al., 2006). Os microrganismos presentes no bioflocos (BFT) colonizam os substratos e assimilam os componentes nitrogenados e, assim, formam-se os flocos microbianos.

O BFT é um sistema fechado, com pouca ou nenhuma renovação de água, a qual permite uma elevada densidade de estocagem de camarões (Burford et al., 2004). Esse sistema também possibilita maior biossegurança, já que, reduzindo a troca de água, reduz-se também a possibilidade de introdução de doenças no sistema (Wasielesky et al. 2006). Porém, este é um sistema de produção que estimula o aparecimento de uma comunidade microbiana, podendo se tornar também suscetível a surtos de organismos nocivos.

Em muitos casos, as mortalidades causadas por bactérias patogênicas não são atribuídas a patógenos obrigatórios específicos, mas sim à proliferação de bactérias patogênicas oportunistas (Defoirdt, 2016). Dentre as bactérias oportunistas encontradas no sistema de cultivo, destacam-se as bactérias marinhas do genero *Vibrio* (Pasharawipas et al., 2005). A vibriose é uma das doenças bacterianas que causa grandes perdas econômicas nos cultivos de camarões (ADAMS & BOOPATHY, 2013). São encontradas na água e no sedimento, podendo também fazer parte da microbiota intestinal de camarões saudáveis (Dourado, 2009).

Na tentativa de controlar os patógenos responsáveis por enfermidades, como as causadas por *Vibrio*, o uso de antibiótico se tornou excessivo, levando a seleção de microrganismos resistentes. Com isso, a

intervenção microbiana em termos de biorremediação, imunostimulantes e probióticos tem sido muito recomendada (Panigrahi e Azad, 2007).

Neste contexto o uso de bactérias probióticas é reconhecido como uma ferramenta útil no combate a tais doenças (ZHOU & WANG, 2012). Partindo da ideia de que algumas bactérias probióticas atuam na colonização do trato e que outras também podem degradar a matéria orgânica ao mesmo tempo em que ajudam as enzimas digestivas, dois grupos de bactérias têm sido muito usados como probiótico para a aquicultura: as espécies do gênero *Bacillus* e as bactérias ácido lácticas.

As bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas na aquicultura, competem por nutrientes e, portanto, inibem o rápido crescimento de outras bactérias, limitando assim o crescimento de bactérias resistentes, reduzindo ainda mais a transferência de genes resistentes entre bactérias (Hong, Duc & Cutting 2005). Além disso, muitos compostos antibióticos diferentes são naturalmente produzidos por uma variedade de espécies de *Bacillus* (Moriarty, 1998), entre os antibióticos destacam-se a bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (MADIGAN et al., 2004). Sua grande vantagem é que por ser esporulada possui grande facilidade de ser produzida em massa e incorporada em produtos comerciais.

A utilização de bactérias ácido lácticas têm desempenhado um papel importante no controle de enfermidades ocasionadas por patógenos, inibindo-os por meio da produção de compostos antimicrobianos como o ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (VASQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2005) e por estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (GATESOUBE, 2008). Alguns trabalhos já demonstraram a efetividade de bactérias lácticas na inibição de patógenos em camarões (CASTEX et al., 2010; VIEIRA et al., 2013), e, em particular, o uso de *L. plantarum* como promotor de resistência contra vibrioses em camarões marinhos (CHIU et al., 2007; VIEIRA et al., 2010).

São poucas as pesquisas com o uso de mais de um probiótico no cultivo de organismos aquáticos e a junção destes dois grupos de bactérias ainda é pouco estudada. Aly et al., 2008, avaliou o efeito dos dois grupos de bactérias juntas (*B. subtilis* e *L. acidophilus*) quanto a resposta imune de *Oreochromis niloticus*, eficiência inibitória in vitro e desempenho contra infecção por desafio e o grupo que recebeu a mistura de probióticos apresentou maior atividade bactericida que os demais tratamentos, melhorando a imunidade dos peixes, resistência a doenças e desempenho.

Portanto, os objetivos do estudo são avaliar o uso de dieta suplementada com *L. plantarum* e *Bacillus* spp., separadamente e associadas, na engorda de camarões marinhos *L. vannamei* sobre os parâmetros zootécnicos, microbiota bacteriana do trato digestório e na qualidade da água do cultivo dos camarões cultivados em sistema de bioflocos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi executado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.2.1 Material biológico

Foram utilizados camarões *Litopenaeus vannamei* (linhagem HB16 da Empresa Aquatec Ltda., localizada no Rio Grande do Norte, Brasil), cultivado em sistema de bioflocos. O peso médio dos camarões no início do experimento foi de $2,00 \pm 0,02$ g.

2.2.2 Desenho experimental

Os camarões foram distribuídos em 12 tanques circulares de fibra de vidro, com volume de água de 9.000 litros, providos de aeração e aquecedores acoplados com termostatos. No dia do povoamento, as unidades experimentais foram inoculadas com 30% de água com biofloco maduro, proveniente do laboratório, a uma salinidade média de $33,0 \text{ g L}^{-1}$. As unidades experimentais povoadas com 2700 camarões juvenis (densidade de 300 camarões m^3), que foram estocados aleatoriamente nos tanques. As unidades foram divididas em quatro tratamentos em triplicata, em um delineamento totalmente ao acaso.

2.2.3 Delineamento experimental

O experimento foi realizado com quatro dietas diferentes: ração comercial com probiótico *L. plantarum* (10^7 UFC g^{-1} de *Lactobacillus plantarum*), ração comercial com probiótico *Bacillus* spp. ($3,3 \times 10^7$ UFC kg^{-1} de *Bacillus* spp.), ração comercial com probiótico *L. plantarum* + *Bacillus* spp. (10^7 UFC g^{-1} de *Lactobacillus plantarum* + $3,3 \times 10^7$ UFC kg^{-1} de *Bacillus* spp.) e ração controle sem probiótico. Nos tratamentos

com adição de *Bacillus* spp. na ração também foi adicionado probiótico na água do cultivo.

A administração do probiótico nos tratamentos com probiótico na água foi feita semanalmente, onde foi adicionado 0,5 g m⁻³ de probiótico composto por cepas liofilizadas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*.

Os camarões foram alimentados com ração com 35% de proteína bruta (Guabi Potimar 35 EXT) e fornecida de acordo com a tabela de Van Wick e Scarpa (1999), quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00 h). A quantidade de ração foi calculada de acordo com a biometria realizada semanalmente.

O experimento teve duração de 50 dias, de 04 de abril a 24 de maio.

2.2.4 Parâmetros de qualidade de água

Durante o período experimental foram verificados a temperatura da água, o oxigênio dissolvido de cada tanque, uma vez ao dia (16:00 h), com a utilização de multiparâmetro YSI 556 MPS. Semanalmente foram coletadas amostras de água de cada tanque para determinação dos níveis de nitrogênio da amônia total (NAT), nitrito-N (NO₂-N), nitrato-N (NO₃-N), alcalinidade total, análise de sólidos suspensos totais, pH e salinidade.

Quando os níveis de alcalinidade total ficaram abaixo de 150mg CaCO₃ L⁻¹ foi adicionado bicarbonato de sódio a fim de evitar que essa variável ficasse abaixo de 100mg CaCO₃ L⁻¹ e também com o objetivo de favorecer o processo de nitrificação.

Para manter a concentração adequada de sólidos suspensos na água do cultivo, foram utilizados sedimentadores de formato cilindro-cônico. O sedimentador fica acoplado em paralelo ao tanque de cultivo, para retirada dos sólidos sedimentáveis da água, por meio da decantação (Schweitzer et al., 2013).

2.2.5 Análises microbiológicas

Foram amostrados tratos digestivos de 10 camarões de cada tratamento e 10 ml da água do cultivo de cada tanque para a análise da água. A coleta foi feita aos 30 dias de experimento e no dia em que o experimento foi finalizado.

Os tratos intestinais foram homogeneizados e diluídos serialmente (1/10), em solução salina estéril a 3% (SSE), e semeados nos meios de cultura ágar marinho, ágar TCBS (tiosulfato, citrato, bile e sacarose) e

ágar MRS, para a contagem de bactérias heterotróficas viáveis, vibriónicas e bactérias ácido-lácticas respectivamente.

Os intestinos e a água semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa com temperatura a 30°C. Para as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC), os resultados foram verificados após 24 horas de incubação nos meios de cultura ágar marinho e ágar TCBS. No meio ágar MRS, as contagens foram feitas após 48 horas de incubação.

2.2.6 Índices zootécnicos

Ao final do experimento foram medidas as variáveis de desempenho dos camarões: peso final, biomassa final, produtividade, sobrevivência, taxa de crescimento semanal e fator de conversão alimentar.

2.2.7 Análises estatísticas

As variáveis foram avaliadas através da ANOVA unifatorial. O teste de Tukey foi aplicado para separação das médias quando houve diferenças significativas. Homocedasticidade e normalidade foram testadas através dos testes Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Todos os testes estatísticos foram avaliados com nível de significância $P < 0,05$ através do software STATISTICA versão 8.0.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Parâmetros de qualidade de água

Os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos de qualidade da água neste trabalho se mantiveram relativamente estáveis ao longo do experimento (Tabela 1). Os valores de salinidade ($33,56 \pm 0,17$ g L⁻¹), pH ($7,47 \pm 0,04$), alcalinidade ($172 \pm 2,94$ mg CaCO₃ L⁻¹), amônia ($3,82 \pm 0,24$ mg L⁻¹) e sólidos suspensos totais ($670 \pm 112,09$ mg L⁻¹) não apresentaram diferenças significativas,

O único parâmetro que apresentou diferenças significativas entre os tratamentos foram os valores de nitrito (N-NO₂), sendo o tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. superior aos demais.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água dos tanques de engorda de camarão *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos em diferentes tratamentos. Média \pm desvio padrão.

Tratamento	pH	Salinidade (g.L ⁻¹)	Alcalinidade (mg.CacO ₃ .L ⁻¹)	Amônia N-H ₃ (mg.L ⁻¹)	Nitrato N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	SST (mg.L ⁻¹)
Controle	7,47 \pm 0,04	33,62 \pm 0,43	169 \pm 0,32	3,63 \pm 0,09	1,76 \pm 0,45a	762 \pm 236,70
Prob. <i>L. platarum</i>	7,48 \pm 0,07	33,78 \pm 0,05	172 \pm 1,05	4,17 \pm 0,49	1,75 \pm 0,48a	574 \pm 4,45
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	7,51 \pm 0,07	33,41 \pm 0,04	176 \pm 1,13	3,71 \pm 0,48	1,44 \pm 1,58a	573 \pm 104,47
<i>L. platarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	7,42 \pm 0,05	33,43 \pm 0,01	171 \pm 1,45	3,77 \pm 0,17	10,7 \pm 1,23b	773 \pm 27,93

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.2 Contagem microbiológica do intestino

Após 30 dias as contagens de *Vibrio* sp. no tratamento com o probiótico *L. plantarum* foram significativamente menores referente ao controle. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o grupo sem aditivos (Tabela 2). Adicionalmente, o uso de *L. plantarum* isolado após 30 dias obteve menores contagens de vibrios que seu uso em conjunto com *Bacillus* spp. No entanto, após 50 dias, tanto o tratamento *L. plantarum* como seu uso em conjunto com o *Bacillus* spp diminuíram as contagens de *Vibrio* spp. no intestino dos camarões quando comparado com o grupo controle. A concentração de bactérias ácido lácticas após 30 dias foi significativamente maior nos tratamentos que continham *L. plantarum*, contudo após 50 dias as concentrações de bactérias ácido lácticas diminuíram significativamente em todos os tratamentos quando comparados com o tratamento que recebeu o isolado. As contagens de BHT só apresentaram diferenças entre os tratamentos *Bacillus* spp. e *L. plantarum* + *Bacillus* spp., e no final do cultivo não houve diferenças entre os tratamentos.

Tabela 2. Contagem microbiológica do intestino dos camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com as diferentes dietas após 30 dias de cultivo e 50 dias de cultivo em sistema de bioflocos.

30 dias			
Tratamento	Bactérias Heterotróficas (log)	<i>Vibrio</i> spp. (log)	Bactérias Ácido Lácticas (log)
Controle	8,39±0,20ab	8,04±0,02a	3,15±0,14a
Prob. <i>L. plantarum</i>	7,58±0,32ab	6,18±0,27b	5,03±0,67b
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	7,49±0,52 ^a	7,08±0,69ab	0,00±0,00c
<i>L. plantarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	8,49±0,30b	7,78±0,17a	5,52±0,31b
50 dias			
Tratamento	Bactérias Heterotróficas (log)	<i>Vibrio</i> spp. (log)	Bactérias Ácido Lácticas (log)
Controle	8,24±0,65	7,75±0,56a	0,90±1,56a
Prob. <i>L. plantarum</i>	8,12±0,06	5,37±0,49c	6,24±0,47b
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	8,07±0,12	6,88±0,69ab	0,00±0,00a
<i>L. plantarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	8,41±0,23	6,10±0,02bc	2,97±1,37a

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.3 Contagem microbiológica da água do cultivo

Após 30 dias de cultivo, não foram encontradas diferenças significativas nas contagens de bactérias heterotróficas totais (Tabela 3). Já em relação a contagem de bactérias ácido lácticas, os valores encontrados nos tratamentos controle e *Bacillus* spp. foram significativamente menores ($p>0,05$) do que nos tratamentos *L. plantarum* e *L. plantarum* + *Bacillus* spp., respectivamente (Tabela 3). Com relação a contagem de *Vibrio* spp. nenhum tratamento apresentou diferenças significativas comparado ao grupo controle. Foram observadas diferenças unicamente entre o tratamento *L. plantarum* e o *L. plantarum* + *Bacillus* spp. onde o uso de *L. plantarum* isolado teve menores contagens de *Vibrio* spp. Contudo, após 50 dias todos os tratamentos apresentaram valores similares nas contagens microbiológicas analisadas.

Tabela 3. Contagem microbiológica da água do cultivo, após 30 e 50 dias de cultivo.

30 dias			
Tratamento	Bactérias Heterotróficas (log)	<i>Vibrio</i> spp. (log)	Bactérias Ácido Láticas (log)
Controle	5,29±0,71	4,19±0,62ab	0,00±0,00a
Prob. <i>L. plantarum</i>	4,94±0,47	4,09±0,56a	4,11±0,69b
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	6,13±0,87	5,00±0,30ab	0,00±0,00a
<i>L. plantarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	6,12±0,88	5,31±0,21b	2,54±0,40c
50 dias			
Tratamento	Bactérias Heterotróficas (log)	<i>Vibrio</i> spp. (log)	Bactérias Ácido Láticas (log)
Controle	5,88±0,76	3,70±0,70	1,01±1,00
Prob. <i>L. plantarum</i>	6,76±0,20	4,27±1,04	2,90±0,17
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	6,38±1,42	4,86±0,75	0,76±1,32
<i>L. plantarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	7,15±0,21	4,50±0,70	1,50±2,12

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.4 Parâmetros zootécnicos

Ao final dos 50 dias de cultivo, o grupo controle e o tratamento só com *L. plantarum* tiveram um maior peso final, ganho de peso, e produtividade final quando comparados com os tratamentos *Bacillus* spp. e *L. Plantarum* + *Bacillus* spp. (Tabela 4). A conversão alimentar (FCA) e sobrevivência foram significativamente menores no tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. comparado aos demais. Durante o experimento, aos 37 dias, um dos tanques do tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. foi perdido.

Tabela 4. Índices produtivos do camarão *Litopenaeus vannamei* após 50 dias de cultivo em sistema de bioflocos.

Tratamento	Peso Final (g)	Ganho em peso (g)	Sobrevivência (%)
Controle	10,14±0,71a	8,16±0,71a	86,96±4,63a
Prob. <i>L. platarum</i>	9,78±0,48a	7,80±0,48a	84,45±6,49a
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	7,56±0,68b	5,55±0,68b	93,69±4,65a
<i>L. platarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	6,06±0,81b	4,04±0,81b	57,64±5,77b
Tratamento	Produtividade final (kg.m³)	FCA	
Controle	2,97±0,04a	1,86±0,03a	
Prob. <i>L. platarum</i>	2,78±0,11a	1,96±0,15a	
Prob. <i>Bacillus</i> spp.	2,39±0,10b	2,26±0,16a	
<i>L. platarum</i> + <i>Bacillus</i> spp.	1,19±0,27c	8,49±4,61b	

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expresso em média ± desvio padrão.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Parâmetros de qualidade de água

Os resultados encontrados para parâmetros físico-químicos de qualidade de água deste trabalho não apresentaram diferença significativa para os parâmetros pH, salinidade e alcalinidade que mantiveram-se nos níveis adequados para o cultivo de camarões marinhos (Diaz & Rosemberg, 1995; Van Wyk & Scarpa, 1999).

Muitos trabalhos em que foi empregado o sistema de bioflocos afirmam que a qualidade de água pode ser mantida em boas condições (Burford et al., 2004, Ebeling et al., 2006). Porém, mesmo sem apresentar diferenças significativas os níveis de amônia ultrapassaram o limite ideal para o cultivo, provavelmente em função do alto teor proteico utilizado na alimentação dos camarões e os altos fatores de conversão que demonstram sobre e/ou baixa digestibilidade da ração, resultando em maior aporte de nitrogênio e sua acumulação no sistema. Essa sobre de ração justifica também os valores acima do recomendado de sólidos suspensos totais (Ray et al., 2010) apresentados no experimento que pode ser explicado pelo acúmulo de matéria orgânica no sistema.

Mesmo a amônia e os sólidos suspensos totais apresentando concentrações acima da faixa aceitável para o cultivo de camarões marinhos, acredita-se que isso não foi um problema pois a sobrevivência foi alta (acima de 80%) em praticamente todos os tanques. Exceto para os tanques do tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. que apresentaram diferenças significativas nas concentrações de nitrito (N-NO₂) que foram superiores aos outros tratamentos. Esta alta concentração de nitrito apresentada nos tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. pode ter ocasionado a mortalidade nesse tratamento conjunto.

2.4.2 Microbiologia intestino

As menores contagens de *Vibrio* spp. obtidas ao longo do cultivo no tratamento utilizando só *L. plantarum*, pode ser explicado pela ação inibitória das bactérias ácido lácticas. Este grupo de bactéria é capaz de produzir compostos antimicrobianos como o ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (VASQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2005). De modo semelhante, as bactérias lácticas, *Bacillus*

spp. também possuem atividade antimicrobiana ao produzirem bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (MADIGAN et al., 2004). Contudo, o uso apenas de *Bacillus* spp. não conseguiu diminuir as contagens de *Vibrio* spp. no intestino quando comparado com o grupo controle, unicamente quando usado em conjunto com *L. plantarum* após 50 dias, sugerindo um efeito sinérgico entre as duas bactérias.

Aos 30 dias de experimento, as maiores contagens de bactérias ácido lácticas nos tratamentos que receberam *L. plantarum* confirmam a viabilidade da bactéria até chegar ao intestino. Contudo, após 50 dias, foi observada a presença de bactérias ácido lácticas em baixas concentrações nos tratamentos que não receberam *L. plantarum* sem diferir significativamente dos demais tratamentos. A presença de este tipo de bactérias, pode estar relacionada à presença de bactérias ácido lácticas já estabelecida como microbiota endógena do trato digestivo. Estas bactérias, apesar de não serem predominantes no trato digestivo de camarões, já foram isoladas como parte da microflora intestinal natural em diferentes trabalhos (Kongnum et al. 2012; Vieira et al. 2013; Maeda et al. 2014.).

Adicionalmente, foi possível observar uma diminuição nas contagens de bactérias ácido lácticas no tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. comparada com a primeira coleta. Isso pode ser explicado por um possível efeito antagônico ao longo do tempo diminuindo assim sua concentração. As bactérias ácido lácticas são conhecidas como produtoras de compostos antimicrobianos como as bacteriocinas, e tem ação principalmente contra bactérias gram positivas (Gillor et al., 2008) as bactérias do gênero *Bacillus* são bactérias gram positivas, e também são capazes de secretar diversas substâncias, tais como: toxinas, enzimas bacteriolíticas, substâncias antibióticas e também as bacteriocinas que possuem esse efeito bactericida (SCHULZ, BONELLI & BATISTA, 2005) justificando esse antagonismo entre elas.

2.4.3 Microbiologia da Água

As contagens de bactérias heterotróficas totais não apresentaram diferença entre os tratamentos e o grupo controle em nenhuma das coletas, sugerindo que a concentração bacteriana heterotrófica já estabelecida no sistema não foi alterada pela adição de bactérias probióticas.

Quando comparados ao grupo Controle, nenhum tratamento diminuiu a concentração de *Vibrio* spp., contudo o tratamento *L.*

plantarum apresentou menores contagens que o tratamento usando os dois probióticos em conjunto (*L. plantarum* + *Bacillus* spp) indicando um possível efeito antagonístico entre as duas bactérias. O antagonismo é um mecanismo muito forte de atuação dos probióticos (exclusão competitiva), e as bactérias probióticas podem competir por nutrientes (Gatesoupe, 1999), por sítios de adesão no trato intestinal (Mohapatra et al., 2013) e por produção de diferentes toxinas (Gatesoupe, 1999; Gillor et al., 2008) piorando assim o desempenho das duas bactérias contra a concentração de *Vibrio* spp. Esta ação antagonística pode explicar também, uma menor concentração de bactérias ácido lácticas obtida após 30 dias quando *L. plantarum* foi usado em conjunto com *Bacillus* spp.

Neste estudo não verificamos diferenças significativas na contagem de *Vibrio* spp. na água do cultivo nos tratamentos em que foi adicionado probiótico na água, porém muitos autores relataram os efeitos positivos de biorremediação da bactéria probiótica *Bacillus* spp. no cultivo de *L. vannamei*. Nimrat et al. (2012) e observaram que o uso de *Bacillus* como potencial probiótico aumentou o número de bactérias benéficas na água e Kumar et al. (2016) reforçando a ideia de que os probióticos adicionados na água de cultivo são capazes de superar organismos patogênicos presentes no meio ambiente

2.4.4 Parâmetros Zootécnicos

O baixo desempenho no tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. pode ser resultado da baixa sobrevivência obtida e as concentrações de nitrito estarem acima do recomendado. Cabe ressaltar que o consumo de ração era verificada por meio de bandejas e não foram observadas sobras de alimento significativas durante o manejo diário. Por tanto, os pellets foram talvez dispersados fora da bandeja pelo próprio animal interferindo na observação. Com isso o aporte de ração continuou o mesmo para uma quantidade bem menor de camarões e assim consequentemente a produtividade final foi menor.

Um dos benefícios do uso de bactérias probióticas é sua capacidade de imunostimulação, tanto os *Bacillus* (TSENG et al., 2009), quanto as bactérias lácticas podem produzir ainda substâncias imunostimulantes (Ringo & Gatesoupe, 1998; Marteau et al., 2002; Gill, 2003). O mal desempenho dos camarões no tratamento *L. plantarum* + *Bacillus* spp. pode ser explicado também pela presença de mais de uma bactéria que possui atividade imunostimulante. Essa atividade imunostimulante desempenha o papel de molécula de alarme, ativando assim o sistema

imunológico dos camarões (López et al, 2003), tornando o sistema imunológico comprometido e fazendo com que os camarões gastassem mais energia se recuperando do que se desenvolvendo. A qualidade e efetividade destes imunostimulantes para induzir uma resposta imune não depende somente da concentração dessas bactérias (ENGSTADE et al., 2004).

Existem hoje muitos produtos comerciais sendo vendidos com essa finalidade de melhorar o desempenho dos camarões e torná-los mais resistentes à enfermidades, estes produtos são conhecidos como blends. Porém, muitos desse blends de probiótico não foram avaliados e são vendidos por muitas marcas. Antes do uso de qualquer produto, sua eficácia deve ser efetivamente testada.

2.5 CONCLUSÃO

No presente estudo o uso combinado de dois diferentes probióticos não alteraram de forma positiva o desempenho dos camarões. Comprovando assim que antes do uso de qualquer substância profilática deve ser efetivamente testado antes.

2.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte bolsa de mestrado concedida a Ana Clara Chede Pereira da Silva. Os agradecimentos estendem-se ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade de pesquisa de Felipe Vieira (protocolo nº PQ 305357/2017-4).

2.7 REFERÊNCIAS

ADAMS, D.; BOOPATHY R. 2013 Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia*, 68: 1017–1021.

ALY S.M.; ABDEL-GALIL A. Y.; ABDEL-AZIZ G. 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 and Shellfish Immunology*, 25: 128–136.

BURFORD, M.A.; et al. 2004 The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zeroexchange system. *Aquaculture*, 232: 525–537.

BURFORD, M.A.; et al. 2004 The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232: 525–537.

DEFOIRD, T. 2016 Implications of Ecological Niche Differentiation in Marine Bacteria for Microbial Management in Aquaculture to Prevent Bacterial Disease. *PLOS Pathogens*, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005843>.

DIAZ, R.J.; ROSENBERG, R. 1995 Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 33: 245-303.

DOURADO, J. 2009. Vibriose em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) cultivados no litoral de Pernambuco, Brasil. Recife (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco).

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

ENGSTADE, R., RODRIGUEZ, J., ECHEVERRIA, F. Evaluación de productos com Betaglucono a través de um Estúdio in vitro y prueba de

- Desaffioncon WSSV. Biotec Phamacon ASA, Noruega, CENAIM, Ecuador, 2004.
- FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). 2016 *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome. 204p.
- GATESOUBE, F.J. 1999 The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- GATESOUBE, F.J. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 14: 107-114.
- GILL, H.S. 2003 Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroentero*, 17: 755-73.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. 2008 The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81 (4): 591-606.
- HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. 2005 The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 813-835.
- KAUTSKY, N.; et al. 2000 Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191: 145–161.
- KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. 2012 Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 170-177.
- KUMAR, V.; ROY, S.; MEENA, D.K.; SARKAR, U. K. 2016 Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Sciences and Aquaculture* 24(4): 342-368.
- LÓPEZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ROSAS, C. 2003 Physiological, nutritional, and immunological role of dietary [beta] 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 224: 223-243.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2004 Evolução e sistemática microbianas. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. (Ed.). *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall. p. 302-330.

MAEDA, M.; SHIBATA, A.; BISWAS, G.; KORENAGA, H.; KONO, T.; ITAMI, T.; SAKAI, M. 2014 Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Marine biotechnology*, 16 (2): 181-192.

MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; JIAN, R. 2002 Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective, *Br. J. Nutr.*, 88: S51-S57.

MORIARTY, D. 1998 Control of luminous *Vibrio* species in penaeid Aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.

NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V. 2012 Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159: 443-450.

PANIGRAHI, A.; AZAD, I. S. 2007 Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology Biochemistry* 33(4): 429-440.

PASHARAWIPAS, T.; THAIKUA, S.; SRIURAIRATANA, S.; RUANGPAN, L.; DIREKBUSARAKUM, S.; MANOPVISETCHAREAN, J.; FLEGEL, T.W. 2005 Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand. *Virus Research*, 114: 63-69.

RAY, A.J.; LEWIS, B.L.; BROWDY, C.L.; LEFFER, J.W. 2010 Suspended solid removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, 299: 89-98.

RINGØ, E.; GATESOUBE, F.J. 1998 Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.

SCHULZ, D., BONELLI, R.R., BATISTA, C.R.V. 2005 Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição*. 4: 403-411.

SCHVEITZER, R., ARANTES, R., COSTÓDIO, P.F.S., SANTO, C.M.E., VINATEA, L.A., SEIFFERT, W.Q.S., ANDREATTA, E.R. 2013 Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacultural Engineering*. 56: 59-70.

STENTIFORD, G.D. 2012 Diseases in aquatic crustaceans: problems and solutions for global food security. *J. Invertebr. Pathol.* 110: 139-276.

TSENG, D. Y., HO, P. L., HUANG, S. Y., CHENG, S. C., SHIU, Y. L., LIU, C. H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology*. 26: 339-344.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. 1999 Water quality requirements and management. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M., LARAMORE, R., MAIN, K.L., SCARPA, J. (Eds.). *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, Florida. p. 128-138.

VAN-WYK, P. 1999 Nutrition and Feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. In: (Ed.). *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida: Florida Department of Agriculture and Consumer Services. 220 p.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. 2005 Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149-161.

VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA E. A.; SOARES, M.; SILVA, B. C.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M.L.; VINATEA, L.A. 2013 In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48: 998-1004.

WASIELESKY, W.; et al. 2006 Effect of natural production in brown water super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396-403.

ZHOU, X., WANG, Y. 2012 Probiotics in Aquaculture – Benefits to the Health, Technological Applications and Safety. *Health and Environment in Aquaculture*. 215-226.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ABRAHAM, T.J.; PALANIAPPAN, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture**, v.232, p.81-90, 2004.

AVINIMELECH Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227-235, 1999.

BROWN S.P.; CORNFORTH D.M.; MIDEO N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 336-342, 2012.

BURFORD, M.A.; et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zeroexchange system. **Aquaculture** v. 232, p. 525–537, 2004.

CASTEX, M.; et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilacticion* antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 622-631, 2010.

CHIU, C. H.; et al. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 364-377, 2007.

COHEN, J. M. et al. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. **Aquacultural Engineering**, v. 32, p. 425–442, 2005.

DE SCHRYVER P.; VADSTEIN, O. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. **The ISME Journal**, p. 1-9, 2014.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome. 204p., 2016.

FEČKANINOVÁ, A. et al. The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. **Aquaculture**, v. 469, p. 1-8, 2017.

FERREIRA, G.S. et al. Microbial biofloc as a source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaus vannamei*. **Aquaculture**, v. 448, p. 273-279, 2015.

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

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 14, p. 107-114, 2008.

HSIEH, T. et al. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 5, p. 581-588, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2016 **Produção da pecuária municipal**. Brasil, v.44.

KAUTSKY, N.; et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145–161, 2000.

KRUMMENAUER, D. et al. The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc Culture System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of applied Aquaculture** v. 26, p. 370-379, 2014.

LARA, G. **Manejo alimentar de Litopenaeus vannamei cultivado em sistema de bioflocos: efeitos da restrição alimentar e diferentes taxas de arraçamento sobre os parâmetros zootécnicos**. PhD thesis, Postgraduate Program in Aquaculture, Federal University of Rio Grande - FURG, RS, Brazil, 2016.

LIGHTNER, D. V. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 229-248, 2005.

LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESIUS, P.H. Review: Use of Organic Acids, Salts in Fish Diets. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5, p. 45–46, 2010.

LIU, C. H. et al. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 1031-1041, 2009.

LOEBMANN, D.; MAI, A.; LEE, J.T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 58, n.3, p. 909–923, 2010.

LORENZO, M. A. et al. Intensive hatchery performance of the pacific white shrimp in biofloc system, **Aquacultural Engineering**, v. 67, p. 53-58, 2015.

MCINTOSH, D. et al. Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 31%) on water and sediment quality, and on the production of *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 69-82, 2001.

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

MOHAPATRA, S. et al. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, p. 405-430, 2013.

NUNES, A. J. P.; MARTINS P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 72, p. 23-33, 2002.

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

PASHARAWIPAS, T. et al. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand, **Virus Research**, v. 114, p.63-69, 2005.

RAMÍREZ, C. et al. Microorganismos lácticos com características probióticas para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 264, p. 70-78, 2006.

RAY, A.J.; LOTZ, J.M. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. **Aquacultural Engineering**, v. 63, p. 54-61, 2014.

REZENDE, P.C. et al. Prenursery of the pacific white shrimp in a biofloc system using different artificial substrates **Aquacultural Engineering**, V. 82, Pages 25-30, 2018.

ROCHA, R.S.; DE SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 105, p. 337-340, 2016.

SCHVEITZER, R. et al. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. **Aquacultural Engineering** v. 56, p. 59–70, 2013.

SKJERMO, J., VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**, v. 177, p. 333–343, 1999.

SONG, Y.L.; CHENG, W.; WANG, C.H. Isolation and Characterization of *Vibrio-Damsela* Infectious for Cultured Shrimp in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, n. 1, p. 24-31, 1993.

SOTO-RODRIGUEZ, S. et al. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Brightred” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 307-317, 2012.

STALIN, N.; SRINIVASAN, P. Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 110-118, 2016.

SUNG, H. H. et al. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 236, n. 2, p. 261-271, Apr 1999.

TRAN, L.; et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, p. 45-55, 2013.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 64, p. 655–671, 2000.

VIEIRA, F.N. et al. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 631-63, 2010.

VIEIRA, F. N. et al. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 998-1004, 2013.

VIEIRA, F.N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 763-769, 2008.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review**, v. 30, p. 404–427, 2006.

ZHAO, D. et al. Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, p. 566–576, 2016.