

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

AMÁBILE FROZZA

**Probiótico na criação de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium
rosenbergii* (de Man, 1879) em sistema BFT**

PALOTINA
2016

AMÁBILE FROZZA

Probiótico na criação de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) em sistema BFT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Área de concentração: Produção de organismos aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Cristina Gruska Vendruscolo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F942 Frozza, Amábile
Probiótico na criação de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) em sistema BFT / Amábile Frozza. – Palotina, 2016.
41f.

Orientador: Eduardo Luis Cupertino Ballester
Coorientadora: Eliane Cristina Gruska Vendruscolo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

1. *Bacillus spp.* 2. Bioflocos. 3. Carcinicultura .
I. Ballester, Eduardo Luis Cupertino. II. Vendruscolo, Eliane Cristina Gruska. III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 598.371

Ficha catalográfica elaborada por Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653




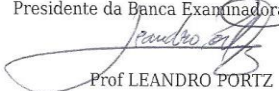
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL
Código CAPES: 40001016078P2

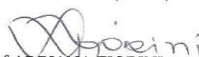
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **AMABILE FROZZA**, intitulada: **"PROBIÓTICO NA CRIAÇÃO DE JUVENIS DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium rosenbergii* EM SISTEMA BFT"**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Palotina, 29 de Julho de 2016.


Prof EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof LEANDRO PORTZ
Avaliador Interno (UFPR)


Prof ADRIANA FIORINI
Avaliador Externo (UEM)

Aprovada em: 29/07/16 às 9h

Local de defesa: Sala 2, Bloco Didático Lacoma, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me abençoado com saúde e persistência durante a construção de meu aprendizado.

Aos meus pais Agenor Frozza e Antonia de Lima pela motivação, assim como às minhas irmãs Josiane, Andressa e Vanessa.

Ao meu namorado Antonio A. Angheben pela paciência e ajuda.

Ao Felipe F. Ritter, pelos momentos de alegria e brincadeiras, os quais me fizeram sentir melhor.

Aos meus amigos e colegas, que me ajudaram tanto nas tarefas de laboratório quanto fora do ambiente acadêmico.

Ao meu orientador Eduardo L. C. Ballester pela confiança, incentivo e credibilidade em meu potencial no percurso da graduação ao mestrado.

A professora Eliane C. G. Vendruscolo pelo apoio e auxílio.

Aos professores Adriana Fiorini e Fábio Rosado, pela ajuda e amizade.

A equipe do laboratório de Bioquímica e Genética e do laboratório de Qualidade de Água, pelo importante auxílio com as análises.

A banca examinadora deste trabalho por aceitarem prontamente o convite para a avaliação e pelas valiosas sugestões.

Probiótico na criação de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) em sistema BFT

Resumo

A carcinicultura é uma atividade reconhecida pela geração de impactos ambientais, seja pelos efluentes contendo nitrogênio e fósforo lançados sem tratamento no ambiente, ou pela utilização e possível escape de espécies exóticas. Nesse sentido, foram criadas formas de mitigar tais efeitos negativos, como o sistema fechado de criação que previne escapes de organismos e estimula a ciclagem dos nutrientes na água, e através da adição de microrganismos probióticos, que estimulam a saúde dos organismos criados. Este trabalho avaliou o uso de probiótico contendo as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na criação de juvenis do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* em sistema de bioflocos, durante 40 dias. Os juvenis ($0,12 \text{ g} \pm 0,32$) foram colocados em 16 unidades experimentais com área de $0,20 \text{ m}^2$, volume útil de 50L, e densidade equivalente de 150 m^2 . Os tratamentos foram organizados em: Controle (sem adição de probiótico), 2 ppm ($1,08 \cdot 10^5 \text{ UFC. g}^{-1}$), 4 ppm ($2,17 \cdot 10^5 \text{ UFC. g}^{-1}$) e 6 ppm ($3,25 \cdot 10^5 \text{ UFC. g}^{-1}$), distribuídos aleatoriamente nas unidades experimentais com 4 repetições cada. Foram realizadas análises microbiológicas nos dias 0, 20 e 40 do estudo, para verificação da abundância das bactérias probióticas na água de criação e no hepatopâncreas dos camarões. Os resultados indicaram maior presença de *B. subtilis* no hepatopâncreas, e *B. licheniformis* na água, sendo as espécies diferenciadas pela morfologia das colônias e confirmadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando *primers* específicos. Este estudo demonstrou que concentrações a partir de $1,08 \cdot 10^5 \text{ UFC. g}^{-1}$ contribuem para melhor sobrevivência de *M. rosenbergii* em sistema BFT.

Palavras-chave: Carcinicultura, Bioflocos, *Bacillus spp.*

Probiotic in the production of freshwater *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) in BFT system

Abstract

Shrimp farming is an activity known by the generation of environmental impacts, either by effluent containing nitrogen and phosphorus released into the environment without treatment or the use and possible escape of exotic species. Therefore new technologies were developed to mitigate such adverse effects, such as creating closed culture system which prevents escapes and stimulates cycling of nutrients in the water, and the addition of probiotic microorganisms. This study evaluated the use of probiotics containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* during the production of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* juveniles in biofloc system during a 40 days trial. Prawn juveniles (0.12 ± 0.32 g) were randomly distributed in 16 experimental units with 0.2 m^2 and 50 L at stocking densities equivalent to 150 prawns/ m^2 . Four treatments with four replicates were evaluated: Control (without probiotic addition), 2ppm ($1,08 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$), 4 ppm ($2,17 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) e 6 ppm ($3,25 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$). Microbiological analysis was performed at days 0, 20 and 40 to verify probiotic bacterial concentrations in the water and in digestive glands of prawns. Results demonstrated higher number of *B. subtilis* in the digestive gland and of *B. licheniformis* in the water of probiotic treatments. Species were identified through morphological analysis and confirmed by Polymerase Chain Reaction using specific *primers*. This study demonstrated the prawns reared in the presence of probiotics achieve significant higher survival ($p < 0.05$).

Keywords: Prawn farming. Biofloc, *Bacillus spp.*

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Coleta do hepatopâncreas (H) de *M. rosenbergii* das unidades experimentais.....16
- Fig. 2.** Aspecto Morfológico das colônias de *B. subtilis* (A) e das colônias de *B. licheniformis* (B).....17
- Fig. 3.** Diferenciação visual das colônias de (A) *Bacillus subtilis* e (B) *Bacillus licheniformis*. Em estereomicroscópio com aumento de 12 X.22
- Fig. 4.** População de *Bacillus subtilis* em amostras da água de criação de juvenis de *M. rosenbergii*, em sistema super intensivo com bioflocos, avaliados no vigésimo e quadragésimo dia de estudo experimental. Médias com letras sobrescritas maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças entre as médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).....23
- Fig. 5.** Concentração de *Bacillus subtilis* em amostras de hepatopâncreas de *M. rosenbergii*, avaliados no vigésimo e quadragésimo dia de estudo experimental. Médias com letras sobrescritas maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças de médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).....24
- Fig. 6.** Crescimento de *Bacillus licheniformis* em amostras da água de criação de juvenis de *M. rosenbergii*, aos 20 e 40 dias de experimento em sistema super intensivo com bioflocos. Médias com letras sobrescritas maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças entre as médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).....25
- Fig. 7.** Concentração de *Bacillus licheniformis* de amostras de hepatopâncreas de *M. rosenbergii*, avaliados no vigésimo e quadragésimo dia de estudo experimental. Médias com letras sobrescritas maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças de médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).....26
- Fig. 8.** Gel **A.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR de 602 pb do final da região 16S do gênero *Bacillus*, em amostras de água. Gel **B.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR de 602 pb do final da região 16S do gênero *Bacillus*, em amostras de hepatopâncreas. Gel **C.** *Bacillus licheniformis* em amostras de água e hepatopâncreas (Controle, 2 ppm, 4 ppm e 6 ppm). Gel **D.** *Bacillus subtilis* em amostras de água e hepatopâncreas (Controle, 2 ppm, 4 ppm e 6 ppm). M: Marcador de tamanho molecular 100 pb (Norgen)27
- Fig. 9.** Dados da sobrevivência de *M. rosenbergii* entre os tratamentos. Letras sobrescritas diferentes indicam a diferença estatística entre os tratamentos, S (%) ($p = 0,014$).....28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Médias (\pm erro padrão) para as variáveis de temperatura ($T\text{ }^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($\text{O}_2\text{D mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e pH em todos os tratamentos.....19
- Tabela 2: Médias (\pm erro padrão) para as variáveis de sólidos suspensos decantáveis (SSD mL/L), sólidos suspensos totais (SST mg/L) e sólidos suspensos voláteis (SSV mg/L) em todos os tratamentos.....19
- Tabela 3: Médias (\pm erro padrão das quatro repetições) para as concentrações de amônia (N-AT mg/L) nitrito (NO^-_2 mg/L), alcalinidade total (mg CaCO_3/L) e dureza (mg CaMg/L), nos tratamentos.....20
- Tabela 4: Médias (\pm erro padrão das quatro repetições) para peso final (PF, g), ganho de peso (GP, g), ganho de biomassa (GB, g), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de conversão alimentar (TCA), nos tratamentos.....28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1.1. <i>Local e desenho experimental</i>	12
2.1.2. <i>Inóculo</i>	12
2.1.3. <i>Preparo do probiótico</i>	13
2.1.4. <i>Alimentação</i>	13
2.1.5. <i>Variáveis Físicas e Químicas da Água</i>	13
2.2. <i>Análise Microbiológica</i>	14
2.2.1. <i>Extração do DNA genômico das bactérias probióticas</i>	16
2.2.2. <i>Identificação molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	16
2.3. <i>Desempenho zootécnico do camarão</i>	17
2.4. <i>Análise estatística</i>	18
3. RESULTADOS	19
3.1. <i>Variáveis físicas e químicas da água</i>	19
3.2. <i>Contagem microbiana</i>	20
3.2.2. <i>Confirmação molecular da espécie B. licheniformis</i>	26
3.2.3. <i>Confirmação molecular da espécie B. subtilis</i>	27
3.4. <i>Desempenho zootécnico</i>	27
4. DISCUSSÃO	29
4.1. <i>Variáveis físicas e químicas da água</i>	29
4.2. <i>Contagem microbiológica</i>	30
4.3. <i>Desempenho zootécnico</i>	32
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS	37

1. Introdução

Entre as atividades de aquicultura a carcinicultura é uma das mais destacadas devido ao seu grande potencial econômico (Marques e Moraes-Valenti, 2012). Os dados mais recentes da FAO (2016) indicam produção mundial de 4.454.602 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 (FAO 2016).

Apesar da sua grande importância, a carcinicultura é uma atividade que pode provocar graves impactos ao meio ambiente, seja pela liberação de efluentes ricos em nitrogênio e fósforo aos corpos de água naturais, ou utilização de espécies exóticas como é o caso da espécie *Macrobrachium rosenbergii* (David et al., 2015). Esta espécie é originária do Sul e Sudeste da Ásia e parte da Oceania, conhecida como Gigante da Malásia, a qual apresenta desenvolvimento favorável em regiões tropicais, devido as suas características de rusticidade e adaptação aos sistemas de produção em cativeiro (Kumar et al., 2013). Desta forma, a aquicultura moderna tem buscado o desenvolvimento de sistemas de produção fechados ou com mínima renovação de água para evitar a eutrofização dos corpos de água que recebem os efluentes dos sistemas produtivos e evitar o escape das espécies exóticas (David et al., 2015).

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 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 dos crustáceos (Ballester et al., 2010; Ferreira et al., 2015).

Tendo em vista que o controle dos microrganismos presentes neste tipo de sistema é fundamental para o sucesso da produção, outra forma de garantir a qualidade de produção sem degradar o ambiente, é a adição de microrganismos probióticos que são definidos como microrganismos benéficos, que estimulam o crescimento de outros organismos trazendo contribuições nutricionais e para a saúde do hospedeiro, podendo agir principalmente na região intestinal (Zhang et al., 2011). Além disso, proporcionam a manutenção de bactérias benéficas no sistema excluindo possíveis patógenos (Xue et al., 2016; Kumar et al., 2013).

As bactérias probióticas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Kumar et al., 2013) podem ser encontradas naturalmente no ambiente terrestre e aquícola, e têm sido empregadas na formulação de misturas probióticas por não serem consideradas patógenas humanas, 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).

Além destas espécies, outros microrganismos podem estar presentes em sistemas de aquicultura, e por isso, análises microbiológicas e técnicas de biologia molecular têm sido bastante úteis como ferramentas de identificação. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos, que permitem amplificação de sequências do DNA dos microrganismos tem sido utilizada com sucesso na identificação de bactérias probióticas em sistemas de aquicultura (Cruz et al., 2012).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, através de técnicas microbiológicas e moleculares, a influência de diferentes concentrações de bactérias *B. subtilis* e *B. licheniformis* no desempenho de *M. rosenbergii* produzido em sistema de bioflocos e na qualidade de água do sistema. Além disso, foi avaliada a permanência destas bactérias no trato digestivo e na água do ambiente de produção.

2. Material e Métodos

2.1.1. Local e desenho experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Carcinicultura da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Juvenis de *M. rosenbergii* com peso médio inicial de $0,12 \text{ g} \pm 0,32$ e comprimento médio inicial de $24,29 \text{ mm} \pm 0,004$) foram distribuídos em 16 tanques de poliestireno com volume útil de 50 L e área de $0,20 \text{ m}^2$ em densidade equivalente a 150 camarões/ m^2 , abastecidos com água contendo bioflocos. O experimento teve duração de 40 dias e foram avaliados quatro tratamentos: Controle, 2 ppm, 4 ppm e 6 ppm de probiótico comercial INVE[®] ProW, com quatro repetições escolhidas aleatoriamente para cada tratamento. Externamente entre os tanques foram montadas barreiras de poliestireno para evitar a disseminação de microrganismos entre as unidades experimentais devido ao "spray" causado pela aeração. Na parte superior dos tanques havia tela de proteção para prevenir o escape dos camarões e no interior das unidades, foram instalados substratos artificiais de modo que servisse de proteção aos camarões prevenindo o canibalismo e aumentando a área de superfície para fixação de microrganismos.

2.1.2. Inóculo

A água contendo o biofloco foi previamente preparada, em dois tanques (310 L cada) em sistema de recirculação. Estes tanques foram colonizados com a densidade de 50 camarões/ m^2 com peso médio inicial de $11,94 \text{ g} \pm 0,12$ e comprimento $10,38 \text{ cm} \pm 1,79$, os quais foram alimentados diariamente com ração Guabi[®] 40-J (40% proteína bruta) e fertilizados com Cloreto de Amônio (NH_4Cl) com o intuito de elevar a concentração de nitrogenados na água e estimular o desenvolvimento de microrganismos aptos à conversão de compostos nitrogenados. No preparo do inóculo, melão em pó foi adicionado à água para limitar a concentração de nitrogênio na forma de amônia total (N-AT) em, no máximo, 1 mg/L^{-1} , desta forma, a quantidade de melão adicionada seguiu recomendações descritas em Ebeling et al. (2006).

2.1.3. Preparo do probiótico

O probiótico adicionado nas unidades experimentais foi previamente preparado (2 g/L) em balde com água clara, e permaneceu sob agitação por bomba por período de 8 horas. Posteriormente foram adicionadas as concentrações equivalentes aos tratamentos, baseadas na concentração inicial:

2ppm ($1,08 \cdot 10^5$ UFC. g⁻¹) = 50 mL

4ppm ($2,17 \cdot 10^5$ UFC. g⁻¹) = 100 mL

6 ppm ($3,25 \cdot 10^5$ UFC. g⁻¹) = 150 mL

2.1.4. Alimentação

Os juvenis foram alimentadas com ração Guabi[®] J-40, contendo 40% de proteína bruta. A ração foi ofertada 2 vezes ao dia (9:00 h e 17:00 h) na quantidade inicial de 7% da biomassa total/dia, e posteriormente aumentada para 9%/dia, no 17º dia, conforme verificação do consumo nos tanques.

2.1.5. Variáveis físicas e químicas da água

Foram mensurados diariamente e na parte da manhã, oxigênio, pH e temperatura através do uso dos equipamentos: oxímetro digital (YSS 550 –A), medidor de pH (Tecnopon MPA - 210) e termômetro de mercúrio, respectivamente. Duas vezes por semana foram quantificados os sólidos suspensos decantáveis (SSD) por meio do cone ImHoff (de Vita, 2008).

No laboratório de Qualidade de Água da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina foram analisadas semanalmente as variáveis de alcalinidade (CaCO₃ mg/L), dureza (CaMg mg/L), volume de sólidos suspensos totais (SST mg/L) e sólidos suspensos voláteis (SSV), através da metodologia de APHA (2005) sendo os resultados de alcalinidade e dureza determinados em espectrofotômetro digital (Spectrophometer SP 2000 UV).

Quanto às concentrações de amônia total (N-AT) e nitrito (N-NO₂) estas foram mensuradas duas vezes por semana, com base nos métodos de Koroleff (1976) e Griess (1879), respectivamente, tendo como objetivo assegurar o limite de concentração de 1 mg/L de N-AT, conforme Ebeling et al. (2006), que indica adição de quantidades de melaço em pó, como fonte extra de carbono, quando forem determinadas concentrações iguais ou superiores a 0,5 mg/L de N-AT.

2.2. Análise microbiológica

Análises de concentração das bactérias probióticas e foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Para avaliação da concentração real de UFCs (unidades formadoras de colônias) no probiótico (INVE[®] ProW), foi diluído 0,07 g do probiótico em 900 µL de água peptonada e realizada a contagem microbiana em 4 repetições cada, que indicaram concentração média total de $3,8.10^3$ unidades formadoras de colônias (UFC).mL⁻¹ ou $5,4.10^4$ UFC.g⁻¹ do probiótico, uma vez que para *B. licheniformis* a concentração média foi igual a $2,4.10^3$ UFC.mL⁻¹ ou $3,4.10^4$ UFC.g⁻¹ e para *B. subtilis* foi de $1,4.10^3$ UFC.mL⁻¹ ou $2,0.10^4$ UFC.g⁻¹ do probiótico.

Foram coletadas amostras de água e hepatopâncreas (Fig. 1) nos dias 0, 20 e 40 do experimento. Para cada dia de plaqueamento foram coletados de cada unidade experimental, 100 µL de amostra de água e 2 juvenis de camarão, para retirada do hepatopâncreas. Os camarões foram escolhidos aleatoriamente, sendo posteriormente submetidos à desinfecção externa com álcool 70% e lavados com água destilada, e então dissecados com auxílio de pinça e bisturi previamente esterilizados, para a retirada do hepatopâncreas (Costa et al., 2013). O peso médio dos hepatopâncreas foi de 50 mg. Após extração os órgãos foram colocados em microtubos, contendo 1 mL de água peptonada, e sonificados em equipamento ultrassom (Allinger, 1975).

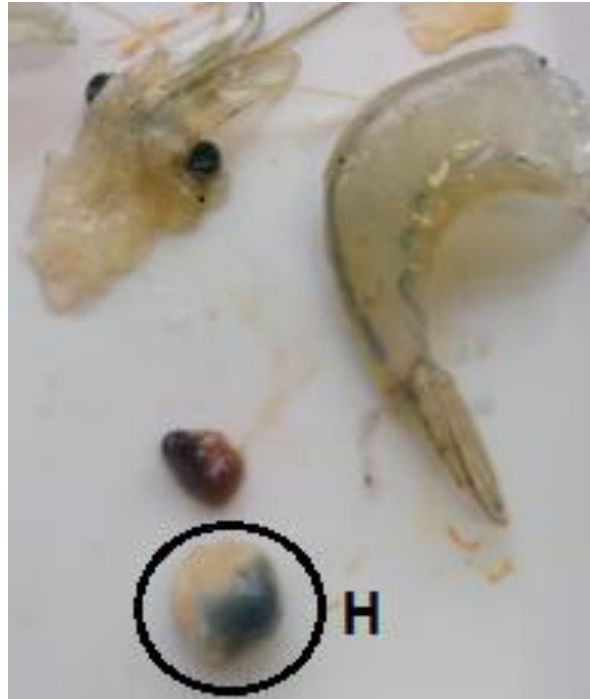


Fig. 1. Coleta de hepatopâncreas (H) dos camarões.

O meio de cultura Tryptona Soya Agar (TSA) com 2,5% de NaCl, foi utilizado para solução de e cultivo de *Bacillus sp.* (Decamp et al., 2008). Os tubos com as respectivas diluições foram aquecidos a 80 °C por 10 min e posterior resfriamento em gelo a -10 °C por 10 s (Leuschener et al., 2003).

Foi realizada diluição seriada (1:10) de 10^{-1} a 10^{-8} e em um volume inicial do extrato de 100 μ L para 900 μ L de água peptonada (1,5%) e o plaqueamento seguiu conforme a técnica de microgota, em que cada diluição havia três repetições de microgotas com volume de 5 μ L, (Romeiro, 2001). Após a secagem das gotas, as placas foram incubadas a 37 °C, e após 18 h, foi realizada a contagem das colônias (Leuschener et al., 2003).

2.2.1. Extração do DNA genômico das bactérias probióticas

Colônias de bactérias de alguns isolados foram escolhidas aleatoriamente, tendo em vista a diferença de morfologia de *B. subtilis*, a qual é caracterizada pelo aspecto de colônias irregulares e consistência cremosa, enquanto as colônias de *B. licheniformis* apresentam aspecto de líquens, são secas e aderentes no ágar, conforme apresentadas na Fig. 2.

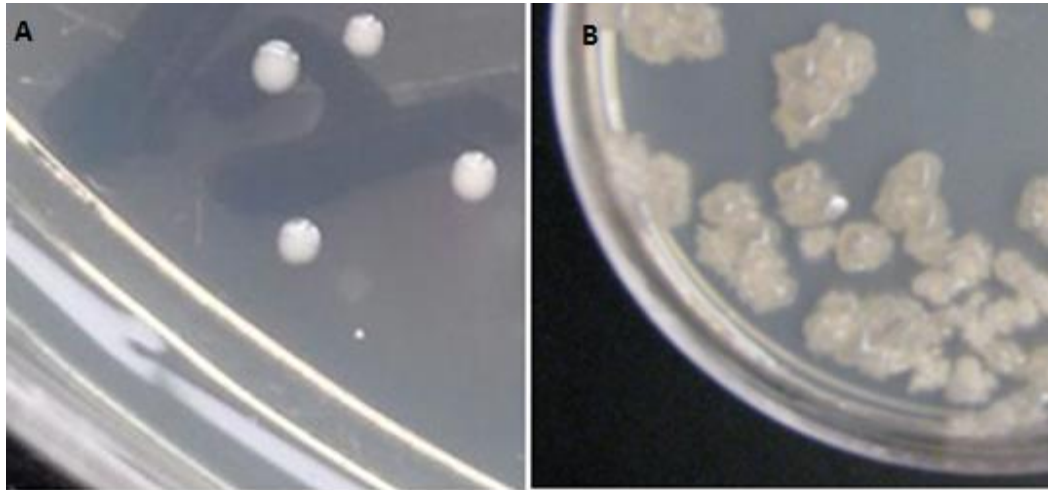


Fig. 2. Aparência Morfológica das colônias de *B. subtilis* (A) e das colonias de *B. licheniformis* (B).

Após isolamento das colônias correspondentes a cada espécie, tanto as de amostras de água quanto de hepatopâncreas, os microrganismos foram cultivados em meio Luria-Bertani líquido (LB) e mantidas por aproximadamente 16 horas, sob agitação a 120 RPM, a 28 °C. Posteriormente o DNA genômico foi extraído de acordo com o método descrito por Shahriar et al. (2011), a partir de 3 mL da cultura. O DNA extraído foi diluído na proporção 1:10 em água Milli-Q e a sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0).

2.2.2. Identificação molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para confirmação do gênero *Bacillus*, foram utilizados os *primers reverse* 602-R 5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3' e *forward* 602-F 5'-CTGAAACTCAAAGGAATTGACG-3', que amplificam uma região de 602 pb da sequência final da região 16SrRNA, específica do gênero *Bacillus*. A confirmação da especificidade do par de *primers* foi realizada pelo alinhamento utilizando a ferramenta Blastn (NCBI).

Os primers utilizados para confirmação da espécie *B. subtilis* foram: *forward* EN1F 5'-CCAGTAGCCAAGAATGGCCAGC-3' e *reverse* EN1R 5'-GGAATAATCGCCGCTTTGTGC-3' (Ashe et al., 2014) e para a espécie *B. licheniformis* foram: *forward* ADK-F 5'-GGTAAAGGGACACAGGCTGA-3' e *reverse* ADK-R 5'-TCGAGTAAAGGCTGGGTTTG-3' (Madslie et al., 2012).

Para todas as regiões, a reação de PCR foi realizada em 20µL com 2 µL do DNA genômico diluído 1:10, Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da *Taq* DNA Polimerase (4G Pesquisa e Desenvolvimento) e 0,2 µM de cada primer. As reações foram amplificadas em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96). As condições de amplificação para a região de 602 pb foram: foram 5 min iniciais a 94°C, e 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, como extensão final de 7 minutos a 72°C. Para EN-1 foi 3 min iniciais a 95°C, e 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55,3°C e 1 minuto a 72°C, como extensão final de 10 minutos a 72°C. Para ADK as condições foram: foi 5 min iniciais a 94°C, e 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58,8°C e 1 minuto a 72°C, como extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X utilizando o padrão de peso molecular de 100pb (Norgen), com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e fotodocumentados em equipamento Loccus Biotecnologia L.PIX.

2.3. Desempenho zootécnico do camarão

Ao final do experimento, foi realizada a contagem dos camarões remanescentes nas unidades experimentais e biometria para determinar a Sobrevivência (S%), Peso final (PF), Ganho de peso (GP), Taxa de Crescimento Específico (TCE), Ganho de Biomassa (GB) e Taxa de Conversão Alimentar Aparente (TCAA), conforme as fórmulas abaixo:

$$\text{Sobrevivência (S\%)} = (\text{número final de camarões} / \text{número inicial de camarões}) \times 100$$

$$\text{Ganho de Peso (GP)} = [(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}] \times 100$$

$$\text{Ganho de Biomassa (GB)} = (\text{biomassa final} - \text{biomassa inicial})$$

$$\text{Crescimento Específico (TCE)} = \frac{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{tempo de experimento}}{100} \times$$

$$\text{Conversão Alimentar Aparente (TCAA)} = \frac{\text{Total de ração fornecida (g)}}{\text{ganho de biomassa}}$$

2.4. Análise estatística

Para avaliação das variáveis de qualidade de água e do desempenho zootécnico do camarão foi aplicada análise de variância Anova uma via, e o Teste de Tukey HSD a nível de significância 5 %. A variável sobrevivência foi transformada para arcoseno (\sqrt{x}) para análise, contudo, na tabela estão presentes os valores originais. Os testes foram aplicados após serem confirmadas a distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov's) e homogeneidade das variâncias (Fisher LSD). Para avaliar as diferenças de contagem microbiana entre os tratamentos, e o longo do período experimental foi realizada análise Anova Fatorial 4x2 e o teste de Tukey a 5%, através do programa estatístico Genes (Cruz, 2006).

3. Resultados

3.1. Variáveis físicas e químicas da água

Em todos os tratamentos, a temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e pH não variaram estatisticamente entre os tratamentos ao longo do período experimental ($p > 0,05$), conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1
Médias (\pm erro padrão) para as variáveis de temperatura (T C^o), oxigênio dissolvido (O₂D mg.L⁻¹) e pH em todos os tratamentos.

Tratamento	T C ^o	O ₂ D	pH
Controle	25,85 \pm 0,06	7,67 \pm 0,05	7,54 \pm 0,01
2 ppm	25,77 \pm 0,12	7,57 \pm 0,02	7,60 \pm 0,02
4 ppm	25,86 \pm 0,09	7,60 \pm 0,02	7,56 \pm 0,02
6 ppm	26,08 \pm 0,12	7,60 \pm 0,06	7,55 \pm 0,01
<i>P</i>	0,19	0,40	0,15

Os valores de SSD e SST e SSV não diferiram significativamente entre os tratamentos ($p > 0,05$), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2
Médias (\pm erro padrão) para as variáveis de sólidos suspensos decantáveis (SSD mL/L), sólidos suspensos totais (SST mg/L) e sólidos suspensos voláteis (SSV mg/L) em todos os tratamentos.

Tratamento	SSD (mL/L)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)
Controle	12,43 \pm 2,67	415,00 \pm 10,72	307,00 \pm 12,39
2 ppm	11,06 \pm 1,39	430,66 \pm 15,67	265,00 \pm 27,42
4 ppm	12,00 \pm 2,15	455,83 \pm 28,37	278,50 \pm 18,24
6 ppm	08,67 \pm 0,88	438,33 \pm 32,03	238,00 \pm 11,63
<i>P</i>	0,52	0,68	0,12

As concentrações de amônia e nitrito, a alcalinidade total e a dureza da água não diferiram estatisticamente entre os tratamentos ($p > 0,05$), os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

Médias (\pm erro padrão das quatro repetições) para as concentrações de amônia (N-AT mg/L) nitrito (NO_2^- mg/L), alcalinidade total (mg CaCO_3/L) e dureza (mg CaMg/L), nos tratamentos.

Tratamento	N-AT mg/L	NO_2^- mg/L	CaCO_3 mg/L	CaMg mg/L
Controle	0,010 \pm 0,003	0,002 \pm 0,002	113,89 \pm 1,84	109,00 \pm 2,83
2 ppm	0,0010 \pm 0,002	0,010 \pm 0,006	107,74 \pm 0,29	167,90 \pm 2,16
4 ppm	0,003 \pm 0,0025	0,030 \pm 0,018	107,00 \pm 1,09	107,34 \pm 1,39
6 ppm	0,005 \pm 0,006	0,018 \pm 0,004	107,86 \pm 0,75	108,46 \pm 0,47
<i>P</i>	0,07	0,24	0,16	0,10

3.2. Contagem microbiana

Previamente, foi realizado teste da concentração efetiva de *B. subtilis* e *B. licheniformis* na mistura probiótica, e os resultados apontaram para a concentração de $5,4 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ de bactérias totais, enquanto o número da população fornecida na embalagem era correspondente a $1,0 \cdot 10^{10}$ UFC.g⁻¹ de bactérias totais no probiótico, e a concentração média de *B. subtilis* encontrada foi $2,0 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ de probiótico e *B. licheniformis* foi $3,4 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ de probiótico.

Posteriormente ao crescimento das colônias nas placas, foram identificadas as espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis* através da diferenciação morfológica conforme Embrapa (2012), ilustrada na Fig. 3.

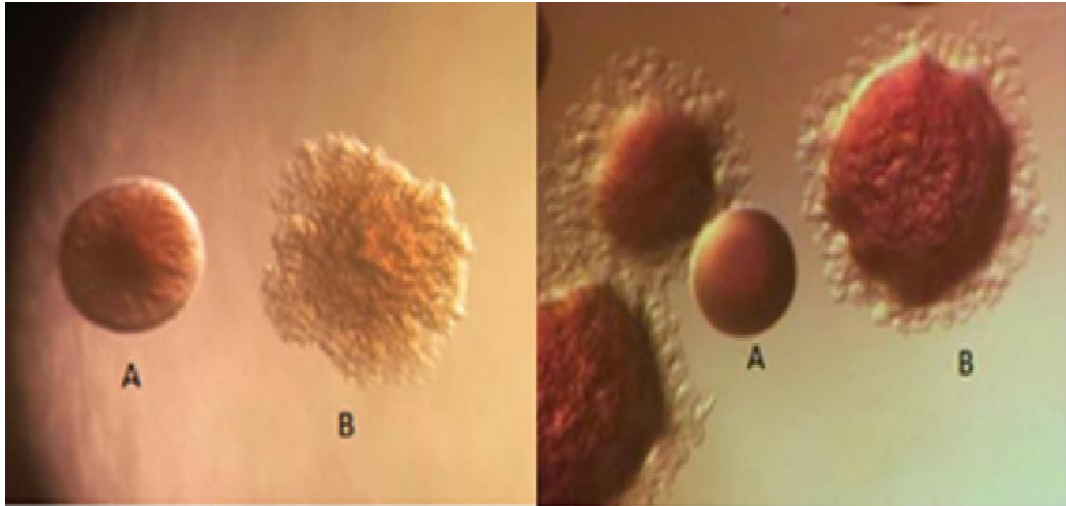


Fig. 3. Diferenciação visual das colônias de (A) *Bacillus subtilis* e (B) *Bacillus licheniformis*. Em estereomicroscópio com aumento de 12 X.

Não houve crescimento bacteriano na água e no hepatopâncreas na fase inicial do povoamento dos crustáceos amostrados para ambas as bactérias. O plaqueamento realizado com amostras da água dos tanques para avaliação da presença de *B. subtilis* mostrou que, após 20 dias de experimento, não houve crescimento no tratamento controle e, nos tratamentos 2, 4 e 6 ppm, e as médias de crescimento desta bactéria foram de $4 \cdot 10^4$; $0,5 \cdot 10^4$ e $4,5 \cdot 10^4$ UFC.mL⁻¹, respectivamente. Aos 40 dias foram observadas $5,7 \cdot 10^4$ UFC.mL⁻¹ no tratamento controle e aumentos de 2,6 vezes, 2,5 vezes e 4 vezes, para os tratamentos 2, 4 e 6 ppm (Fig. 4).

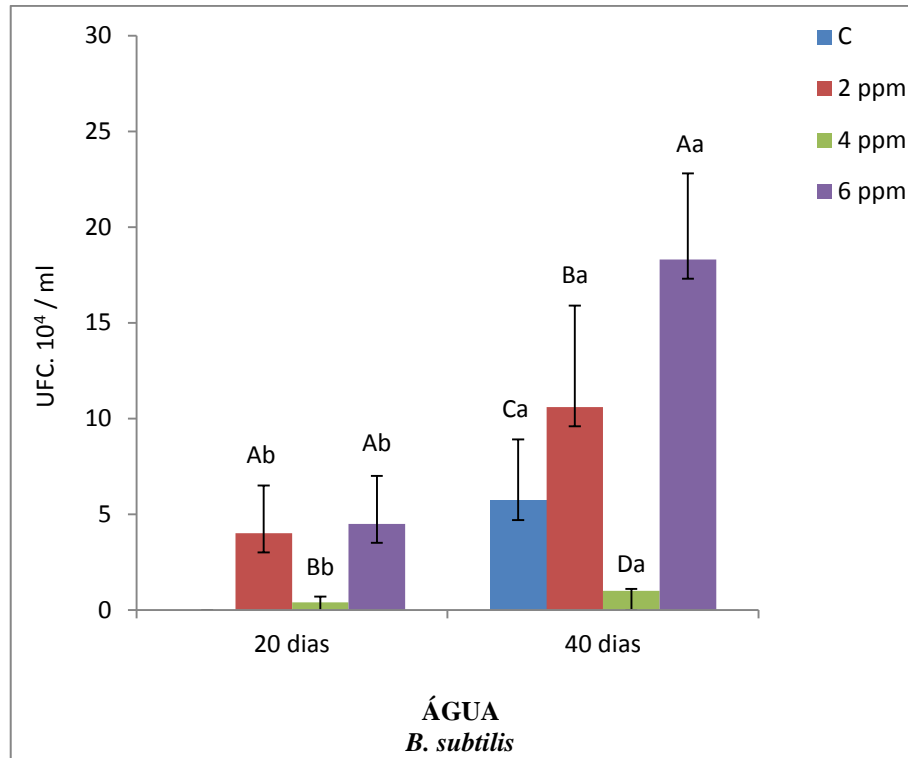


Fig. 4. Densidade de *Bacillus subtilis* em amostras da água de criação de juvenis de *M. rosenbergii*, em sistema super intensivo com bioflocos, avaliados no vigésimo e quadragésimo dia de estudo experimental. Médias com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças entre as médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).

A presença da bactéria *B. subtilis* no hepatopâncreas dos crustáceos aos 20 e 40 dias, foi menor do que na água, sendo detectado apenas no tratamento 4 ppm, aos 20 dias e 40 dias ($5,6 \cdot 10^2$ UFC.mg⁻¹), enquanto que no tratamento com 6 ppm de probiótico somente foi observado aos 40 dias ($1,1 \cdot 10^3$ UFC.mg⁻¹), conforme Fig. 5.

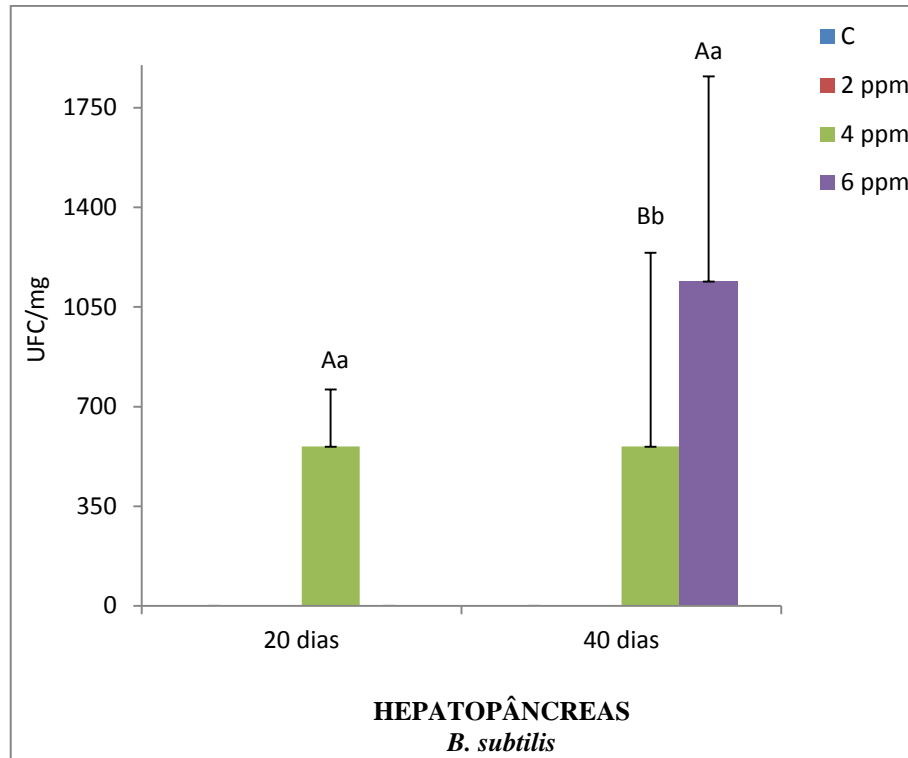


Fig. 5. Densidade de *Bacillus subtilis* em amostras de hepatopâncreas de *M. rosenbergii*, avaliados no vigésimo e quadragésimo dia de estudo experimental. Médias com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças de médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).

Para a bactéria *B. licheniformis* nas amostras da água, aos 20 dias o tratamento controle apresentou $3,2 \cdot 10^4$ UFC.mL⁻¹ e não houve a presença desta estirpe aos 40 dias. Para os tratamentos 2, 4 e 6 ppm as médias encontradas foram de: $12 \cdot 10^4$; $16,8 \cdot 10^4$ e $17,3 \cdot 10^4$ UFC.mL⁻¹, respectivamente. Aos 40 dias, houve um aumento significativo da microbiota presente na água, com acréscimos de 2,4 vezes; 1,4 vezes e 2,7 vezes, respectivamente, conforme Fig. 6.

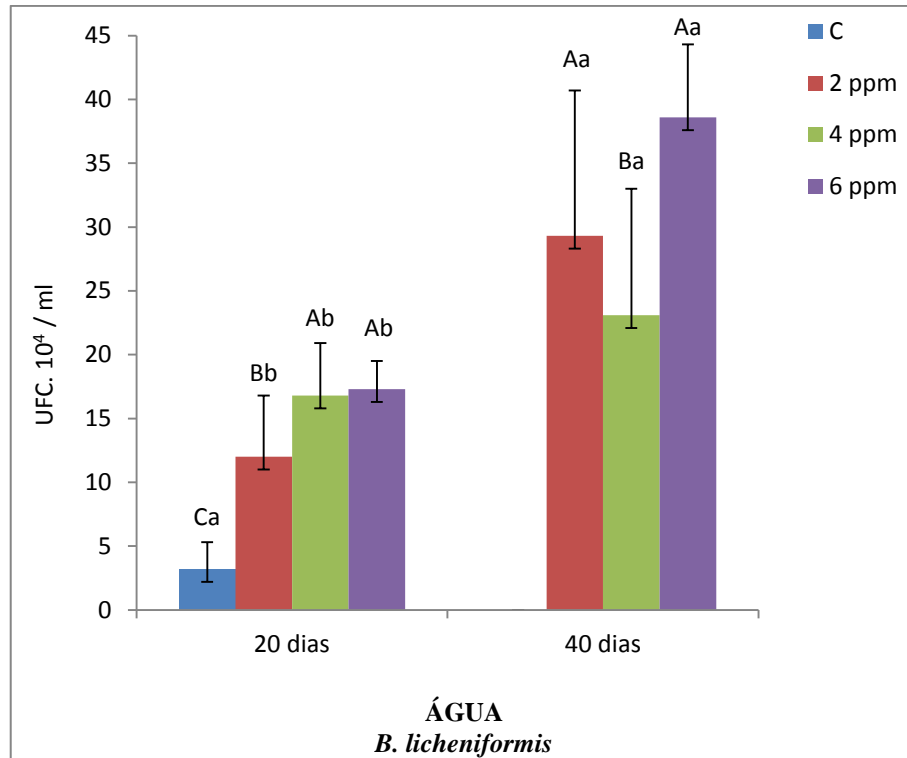


Fig. 6. Densidade de *Bacillus licheniformis* em amostras da água de criação de juvenis de *M. rosenbergii*, aos 20 e 40 dias de experimento em sistema super intensivo com bioflocos. Médias com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças entre as médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).

Nas amostras do hepatopâncreas a presença de *B. licheniformis* foi baixa, sendo que apenas no tratamento com adição de 6 ppm de probiótico foi determinada presença desta bactéria, aos 20 dias ($5,2 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{mg}^{-1}$). Aos 40 dias de experimento foi encontrada a concentração de $0,6 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{mg}^{-1}$ no tratamento 4 ppm e no tratamento 6 ppm a concentração foi de $6,0 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Figura 7).

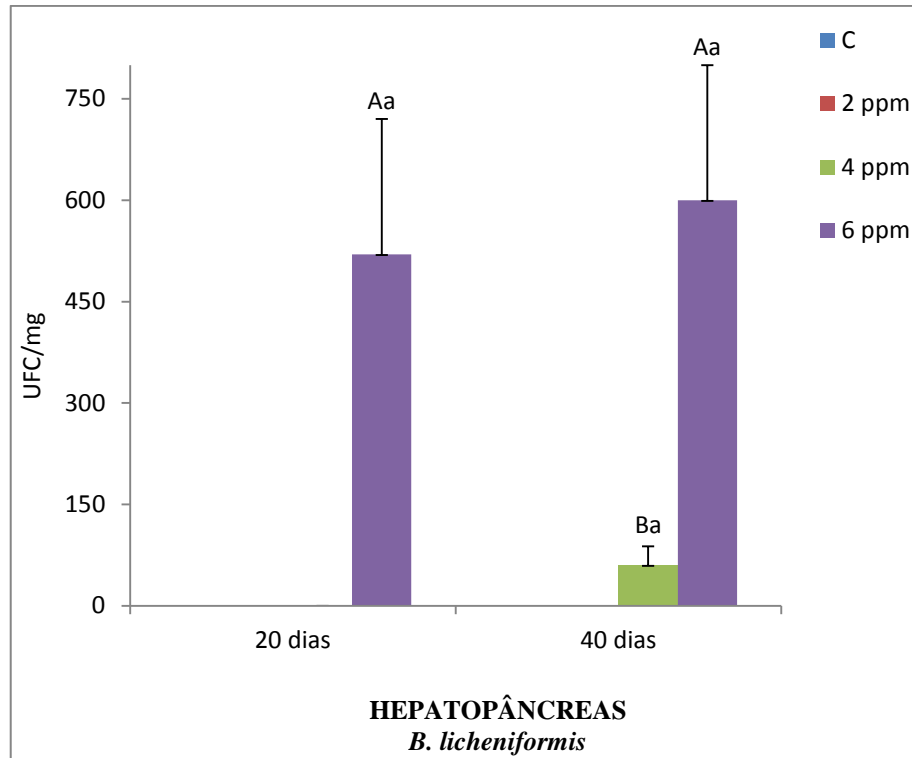


Fig. 7. Densidade de *Bacillus licheniformis* de amostras de hepatopâncreas de *M. rosenbergii*, avaliados no vigésimo e quadragésimo dia de estudo experimental. Médias com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada dia de plaqueamento. Letras minúsculas significam diferenças de médias de cada tratamento aos 20 e 40 dias ($p < 0,05$).

3.2.1. Confirmação molecular do gênero *Bacillus* spp.

Um total de duas amostras de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, previamente caracterizadas pela análise de morfologia de colônia, correspondente a uma amostra de cada tratamento aos 20 e 40 dias, sendo representados pelas letras A (água) e H (hepatopâncreas), foi caracterizado através da amplificação do final da região RNAr 16S pela técnica de PCR para a confirmação do gênero *Bacillus* (Fig. 8). A presença de um fragmento de 602 pb confirma que todos os isolados pertencem a este gênero.

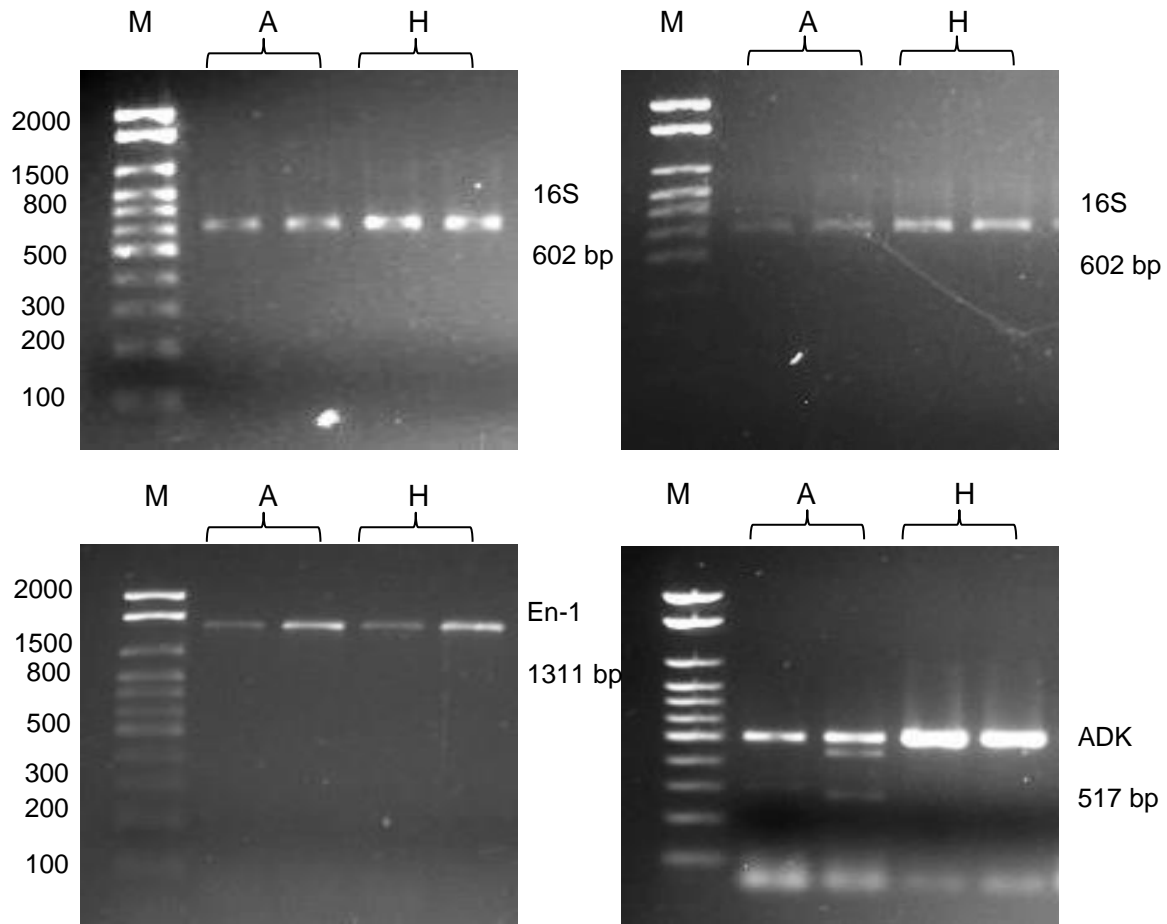


Fig. 8. Gel A. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR de 602 pb do final da região 16S do gênero *Bacillus*, em amostras de água. Gel B. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR de 602 pb do final da região 16S do gênero *Bacillus*, em amostras de hepatopâncreas. Gel C. *Bacillus licheniformis* em amostras de água e hepatopâncreas (Controle, 2 ppm, 4 ppm e 6 ppm). Gel D. *Bacillus subtilis* em amostras de água e hepatopâncreas (Controle, 2 ppm, 4 ppm e 6 ppm). M: Marcador de tamanho molecular 100 pb (Norgen).

3.2.2. Confirmação molecular da espécie *B. licheniformis*

Os isolados pertencentes à espécie *B. licheniformis*, caracterizados pela análise de morfologia de colônia também foram caracterizados no nível de espécie, através da amplificação da região do gene ADK (Adenilato quinase), utilizando *primers* específicos para a espécie *B. licheniformis* (Fig. 8). A presença de um fragmento de 517 pb confirma que todos os isolados pertencem a esta espécie.

3.2.3. Confirmação molecular da espécie *B. subtilis*

Os isolados pertencentes à espécie *B. subtilis*, caracterizados pela análise de morfologia de colônia também foram caracterizados no nível de espécie, através da amplificação da região da região do gene EN-1 (Endonuclease), utilizando *primers* específicos para a espécie *B. licheniformis* (Fig. 6). A presença de um fragmento de 517 pb confirma que todos os isolados pertencem a esta espécie (Fig. 8). No entanto, apenas quatro amostras apresentaram amplificação reprodutiva, entre as doze amostras. As demais amostras apresentaram tanto bandas inespecíficas como ausência de amplificação.

3.4. Desempenho zootécnico

Excepcionalmente, a variável S (%) ($p = 0,014$), teve menor média no tratamento controle e diferiu significativamente dos demais tratamentos, conforme apresentado na Fig. 9.

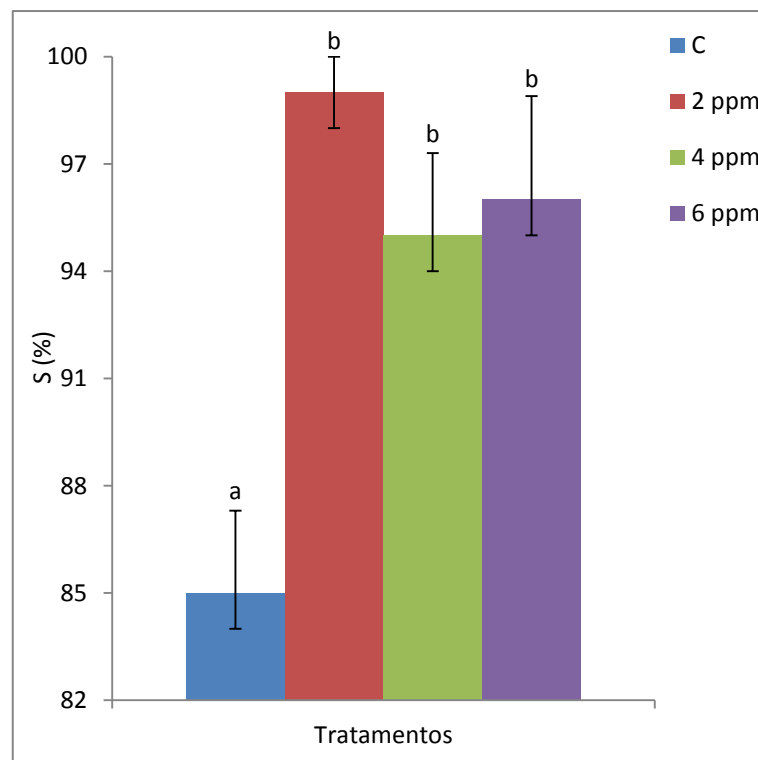


Fig. 9. Dados da sobrevivência de *M. rosenbergii* entre os tratamentos. Letras sobrescritas diferentes indicam a diferença estatística entre os tratamentos, S (%) ($p = 0,014$).

As médias de PF, GP, GB, TCE e TCAA não apresentara diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,05$), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4

Médias (\pm erro padrão das quatro repetições) para peso final (PF, g), ganho de peso (GP, g), ganho de biomassa (GB, g), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de conversão alimentar aparente (TCAA), nos tratamentos.

Tratamento	PF	GP	GB	TCE	TCAA
Controle	0,73 \pm 0,05	0,62 \pm 0,05	5,86 \pm 0,06	2,59 \pm 0,09	1,53 \pm 0,30
2 ppm	0,75 \pm 0,04	0,63 \pm 0,04	6,37 \pm 0,30	2,75 \pm 0,04	1,29 \pm 0,12
4 ppm	0,75 \pm 0,04	0,63 \pm 0,04	6,86 \pm 0,12	2,62 \pm 0,13	1,53 \pm 0,50
6 ppm	0,75 \pm 0,05	0,63 \pm 0,05	6,00 \pm 0,09	2,65 \pm 0,05	1,44 \pm 0,16
<i>P</i>	0,69	0,64	0,63	0,61	0,67

4. Discussão

4.1. Variáveis físicas e químicas da água

Os probióticos na carcinicultura têm o potencial de melhorar a qualidade da água através do equilíbrio das principais variáveis físicas e químicas, como a redução das concentrações de amônia e nitrito, que podem ser assimilados pelos microrganismos no processo de conversão em biomassa microbiana (Souza et al., 2012).

Neste trabalho, as concentrações de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, alcalinidade e dureza permaneceram dentro dos níveis seguros de criação para a espécie, sendo de 6-8 mg/L para o oxigênio, 7,0-8,0 para o pH, temperatura entre 25-28 C 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 por Avnimelech et al. (1999) e não diferenciaram significativamente entre os tratamentos com uso de probiótico e o controle. As variáveis de SSD, SST e SSV não variaram estatisticamente e os resultados foram inferiores a 30 ml/L de SSD (Avnimelech, 1999), para SST ficaram na faixa de até 500 mg/L, como indicada por Samocha et al. (2007). Para SSV foi registrado valor mais elevado no tratamento controle, assim como verificado por Samocha et al. (2007) na criação de *Litopenaeus vannamei* em sistema BFT. Na criação de *Farfantepenaeus brasiliensis* com adição de probiótico contendo *Bacillus spp*, em sistema BFT, Souza et al. (2012) também relataram resultados de qualidade de água dentro dos limites adequados para a espécie, nos tratamentos com adição probiótica e controle. No estudo de Silva et al. (2012) houve utilização de probiótico durante criação de *L. vannamei* e também não foram constatadas alterações na qualidade de água nos tratamentos com a mistura probiótica e o controle, assim como verificado também por Ferreira et al. (2015) e Xue et al. (2016) na criação da espécie *L. vannamei*. Diante destes resultados, supõe-se que a microbiota que compõe o sistema BFT, caracterizada pela presença de bactérias, protozoários, ciliados, flagelados e rotíferos (Ballester et al., 2010), atuaram de forma permanente e equilibrada na qualidade da água, uma vez que a matéria orgânica oriunda de células mortas, restos de ração e fezes dos organismos serviram como fonte de carbono para que as bactérias realizassem com sucesso o processo de conversão, prevenindo grandes variações nas concentrações de amônia e nitrito no ambiente de criação e a consequente necessidade de aplicação de melaço.

4.2. Contagem microbiológica

Diversos autores relataram diferentes formulações e concentrações bacterianas em probióticos usados na carcinicultura. Seenivasan et al. (2015) observaram a concentração de $10 \cdot 10^7$ UFC. g de *B. subtilis* e $10 \cdot 10^7$ UFC. g⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae*, na criação de *M. rosenbergii*., enquanto que Kumar et al. (2013) encontraram concentrações que variaram de $1 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^9$ UFC. g de probiótico contendo apenas a espécie *B. licheniformis*, durante crescimento de *M. rosenbergii*. Uma concentração de $1 \cdot 10^{13}$ UFC. g de *B. licheniformis* e *B. subtilis* foi relatada na espécie de camarão *L. vannamei*, no trabalho de Xue et al. (2016).

Neste trabalho, o probiótico utilizado indicava no rótulo a concentração de $10 \cdot 10^{10}$ UFC. g de probiótico de bactérias totais, contudo, a avaliação prévia deste probiótico apontou que a real população de bactérias totais era correspondente a menos de 1% da população informada no rótulo. Sendo assim, a variação da concentração bacteriana utilizada em probióticos destinados à carcinicultura demonstra que a dosagem adotada deve ser cuidadosamente definida, na tentativa de evitar super ou sub dosagens, uma vez que interferem na eficácia do produto e resultam em custos mais elevados (Keysami et al., 2012).

Foi constatada presença de *B. licheniformis* no tratamento controle, aos 20 dias, e *B. subtilis* neste mesmo tratamento aos 40 dias, confirmando que este gênero de bactérias pode estar presente naturalmente na água (Pandiyan et al., 2013; Keysami et al., 2007), conforme verificado por Zokaeifar et al. (2013) no plaqueamento inicial e posterior nas amostras de água do tratamento controle, e também demonstrado por Ferreira et al. (2015), na análise inicial da água de criação de *L. vannamei* em meio BFT.

No presente estudo foi constatada presença em maior quantidade das bactérias probióticas em amostras de água nos tratamentos com adição de probiótico, em contraste ao tratamento controle. No que diz respeito ao aumento da densidade de *B. subtilis* e *B. licheniformis* nos tratamentos 2, 4 e 6 ppm no primeiro e segundo período de avaliação das amostras de água, este pode ser atribuído à capacidade de competição destas bactérias, por nutrientes e área de adesão do tanque com outros microrganismos ali presentes (Zokaeifar et al., 2013). O mesmo não ocorreu para as amostras do hepatopâncreas, que apresentaram crescimento bacteriano nos tratamentos com concentrações mais elevadas de probiótico, como é o caso do tratamento 4 ppm que para *B. subtilis* da água teve crescimento aos 20 e aos 40 dias, e para *B. licheniformis* o crescimento foi apenas aos 40 dias. O tratamento 6 ppm apresentou crescimento de *B. subtilis* apenas aos 40 dias, e para *B. licheniformis* aos 20 e 40 dias. Diante dos resultados, recomenda-se o emprego de maior tempo de exposição dos

camarões a estas condições de criação, para que as bactérias se instalem no trato gastrointestinal, uma vez que outros pesquisadores utilizaram tempo variado de 56 a 60 dias (Kumar et al., 2013; Zhang et al., 2011; Zokaeifar et al., 2013).

Outra observação pertinente é a ausência de salinidade neste experimento, tendo em vista que a espécie *M. rosenbergii* é dulcícola. A maior parte dos trabalhos que envolvem testes com probióticos contendo o gênero *Bacillus spp.* utilizou espécies de camarões marinhos, como *L. vannamei* (Ferreira et al., 2015), *F. brasiliensis* (Souza et al., 2012), *F. duorarum* (Emerenciano et al., 2013) ou adicionaram probióticos na fase de larvicultura de *M. rosenbergii* (Kennedy et al., 2006; Keysami et al., 2007), a qual é realizada em água salobra. Estes autores obtiveram resultados melhores quanto a contagem e permanência destas bactérias. Keysami et al. (2012) destacaram a necessidade de concentrações mais elevadas de probióticos, com finalidade de maior colonização na mucosa intestinal, testando por 60 dias *B. subtilis* nas concentrações de $5,0 \cdot 10^6$ a $5,0 \cdot 10^{10}$ UFC. g de probiótico na criação de juvenis de *M. rosenbergii*. Com este trabalho, estes autores relataram diferença significativa apenas para GP e S, no tratamento em que havia sido aplicada a concentração de $5,0 \cdot 10^8$ UFC.g. Dessa forma, a literatura consultada aponta para a probabilidade de afinidade dessas bactérias em meio salino, conforme relatado por Decamp et al. (2008), que afirmou o crescimento de *Bacillus spp.* em meio de cultura salina como forma de exclusão de outros microrganismos que repulsam ambientes com salinidade.

A baixa concentração bacteriana encontrada no hepatopâncreas também pode ter sido influenciada por fatores ambientais, como temperatura, composição química do alimento ou densidade de estocagem. Segundo Zhang et al. (2011), estirpes diferentes de bactérias probióticas podem ocupar nichos diferentes na região da microflora intestinal. Resultados diferentes foram encontrados por Kumar et al. (2013) os quais mostraram que nos primeiros 15 dias de experimento com *M. rosenbergii* houve diferença significativa no aumento da população de *Bacillus spp.* na região intestinal do camarão em relação ao tratamento controle, ao adicionar maiores concentrações de $1,0 \cdot 10^6$ UFC/g a $1,0 \cdot 10^9$ UFC/g por grama de alimento. Outro ponto a ser considerado é a real população de bactérias aeróbias heterotróficas contidas no probiótico, uma vez que a população encontrada neste probiótico após contagem das UFCs foi bem abaixo da concentração informada na embalagem. Nimrat e Vuthiphandchai (2011) testaram a informação contida no rótulo de doze produtos probióticos comerciais e verificaram que destes, apenas um deles apresentou população bacteriana compatível com a informação da embalagem, e sugeriram que a baixa população encontrada nos demais marcas

pode estar associada à morte das bactérias durante período de estocagem assim como a diminuição da viabilidade dos microrganismos próximo ou após a validade do produto.

Zokaeifar et al. (2013) avaliaram a população microbiana adicionada em meio BFT, após período de 56 dias da adição de probiótico contendo *Bacillus subtilis* na concentração de $1,0 \cdot 10^8$ UFC/g, e verificaram maior densidade das bactérias em amostras do trato gastrointestinal, em comparação com doses menores ($1,0 \cdot 10^5$ UFC/g) do mesmo probiótico. Além disso, espécies de *Bacillus* são amplamente estudadas em carcinicultura, como *Bacillus cereus* (Li et al., 2015) e *B. licheniformis* (Kumar et al., 2013, Hamza et al., 2015). Xue et al. (2016) observaram que uma população de $10 \cdot 10^{12}$ UFC.g¹ de *B. subtilis* teve um melhor efeito sobre o crescimento de camarões da espécie *L. vannamei* que *B. licheniformis*. De acordo com Xue et al. (2016), a contínua adição e a dosagem adequada de probióticos na água de criação favorece o sucesso da colonização pelos microrganismos e otimiza a formação da comunidade microbiana que necessita de tempo para estabelecer-se.

Entre as espécies avaliadas, a predominância de *B. licheniformis* na água, em relação à *B. subtilis* demonstra que a primeira apresenta maior facilidade de colonização demonstrada pelo crescimento nas amostras de água, podendo ser explicado pela diferença de concentração das bactérias no produto, tendo em vista a concentração de *B. licheniformis* na mistura probiótica ser superior a concentração de *B. subtilis*.

Nas amostras de hepatopâncreas houve maior densidade de *B. subtilis*, indicando através dos resultados que esta bactéria apresenta boa capacidade de permanência na região intestinal, e por isso outros estudos descrevem esta espécie como preferencial na composição de probióticos (Balqadi et al., 2015, Li et al., 2015, Seenivisian et al., 2015). Segundo Keysami et al. (2012) a espécie *B. subtilis* é reconhecida pelo sucesso de aderência na mucosa intestinal de organismos aquáticos, como com a espécie *M. rosenbergii*, e consequente produção de substâncias antibióticas semelhantes a ação de bacitracin e bacillin, que agem contra variadas comunidades bacterianas, evidenciando seu emprego constante.

4.3. Desempenho zootécnico

Adição probiótica em aquicultura é uma alternativa profilática ao uso de antibióticos, tendo em vista que a microbiota probiótica pode competir com patógenos por nutrientes e área de adesão, assim como é capaz de produzir enzimas que melhoraram a saúde dos organismos de cultivo ao promover estímulos ao sistema imune (Li et al., 2015). Além disso,

microrganismos probióticos, como as bactérias *B. subtilis* e *B. licheniformis*, são reconhecidas por colonizarem e se multiplicarem na região intestinal do hospedeiro, interferindo significativamente no crescimento do camarão através do intermédio bacteriano que possibilita absorção extra de nutrientes, conforme relatado por Souza et al. (2012). Nos camarões o hepatopâncreas é um dos principais órgãos ligados ao aparelho digestório e sua principal função é a produção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, sendo também reconhecido pela retenção de microrganismos que auxiliam na digestão do alimento, que, em parceria com a microbiota intestinal auxiliam na preservação da saúde do camarão através da ativação das células do sistema imune (Browdy, 2013).

Contudo, neste trabalho não houve diferenças significativas para as variáveis zootécnicas de PF, GP, GB, TCE e TCA, comparando os tratamentos com uso de probiótico e o tratamento controle, assim como verificado por Ferreira et al. (2015), que utilizaram probiótico contendo *Bacillus spp.* ($1,15 \cdot 10^4$ UFC. g⁻¹) durante criação do camarão *L. vannamei*. Para Zokaeifar et al. (2013), a adição de *B. subtilis* ($1,0 \cdot 10^5$ UFC. g⁻¹ e $1,0 \cdot 10^8$ UFC. g⁻¹) durante 56 dias, na fase de engorda do camarão *L. vannamei*, demonstrou resultados significativamente melhores de GP, TCE e TCA em relação ao controle, assim como ocorreu no experimento de Seenivasan et al. (2012) que por 90 dias adicionou *B. subtilis* na fase de berçário do camarão *M. rosenbergii* e também verificou diferenças significativas para as variáveis citadas. Ferreira et al. (2015) também não constataram alterações físicas e químicas na água que pudessem interferir no desenvolvimento de *L. vannamei*, e, por isso, seus resultados de S, TCE e TCA foram melhores no tratamento controle.

Neste trabalho, houve resultados significativamente melhores de sobrevivência nos tratamentos com uso de probiótico em comparação ao tratamento controle, diferindo dos resultados encontrados por Kumar et al. (2013), que utilizou *B. licheniformis* por período de 60 dias na criação de *M. rosenbergii*, e obteve sobrevivência semelhante entre os tratamentos com probiótico e o controle. Para Zhang et al. (2011), a aplicação de *B. subtilis* e *B. licheniformis* ($1,0 \cdot 10^8$ UFC. g⁻¹) durante o crescimento de *P. japonicus* não apresentou diferenças significativamente melhores na sobrevivência, embora esta variável fosse menor no tratamento controle. Silva et al. (2012) também obtiveram resultados significativamente melhores para a sobrevivência, durante a larvicultura de *L. vannamei*, o que indica a influência positiva da adição probiótica durante o crescimento do camarão. No trabalho de Krummenauer et al. (2014) foi verificada sobrevivência significativamente melhor para *L. vannamei* nos tratamentos com aplicação probiótica também utilizando o sistema BFT,

entretanto, neste trabalho o probiótico foi aplicado nos tanques quando já havia sido detectado infecção por *Vibrio spp.* enquanto nos tanques controle não foi aplicado probiótico.

Zokaeifar et al. (2013) testaram probiótico contendo *Bacillus spp.* com concentração de $1,0 \cdot 10^8$ UFC. g^{-1} durante criação de *L. vannamei*, e destacaram que os tratamentos com a adição da mistura mantiveram os níveis de N-AT inferiores aos níveis encontrados no tratamento controle, contudo, os resultados maiores de sobrevivência no tratamento controle evidenciaram a influência do surgimento de *Vibrio spp.* no viveiro, e apontando que a presença o nitrogênio na forma de amônia não-ionizada além de ser tóxica aos camarões serve como porta de entrada para o estabelecimento de microrganismos oportunistas, que caracterizam situações adversas ao crescimento de camarões (Krummenauer et al., 2014). Neste trabalho, os níveis de nitrogenados, assim como as outras variáveis físicas e químicas estiveram dentro dos limites assegurados para a espécie, além disso, não foi detectada presença de microrganismos oportunistas, como *Vibrio spp.* responsáveis pelo subcrescimento de crustáceos, sendo assim, pode-se destacar que os probióticos adicionados agiram de forma a preparar os camarões para eventuais situações de estresse, de forma profilática e não remediadora como nos trabalhos citados.

A influência da composição não-bacteriológica da mistura probiótica, as espécies de microrganismos que o compõe, assim como a concentração da UFC/g determinam a qualidade e eficácia do probiótico, 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 ao controle, mas não apresentam variação significativa quando comparados a probióticos compostos por apenas uma espécie de *Bacillus*.

Os resultados diferentes obtidos nestes trabalhos podem ser explicados pela riqueza de nutrientes e microrganismos existente no meio BFT, que influenciam de modo integral na carcinicultura. O crescimento dos camarões, que poderia ter sido maximizado pela ingestão dos flocos, pode não ter implicado diferenças significativas entre os tratamentos devido à falta de estímulos estressantes no ambiente de criação e pela disponibilidade de ração nos tanques, tendo em vista que os camarões tinham grande disponibilidade de alimento. No estudo de Emerenciano et al. (2013), não foram constatadas alterações nas variáveis físicas e químicas da água ou diferenças de crescimento dos camarões do sistema BFT e o sistema de água clara.

Basicamente, o sistema BFT é formado por fitoplâncton, zooplâncton, partículas suspensas e bactérias que se estabelecem naturalmente na água de criação e se agregam em

flocos, estando integralmente disponível na água de criação, capaz de fornecer aminoácidos essenciais, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e minerais aos organismos de criação (Najdegerami et al., 2016; Souza et al., 2012). Emerenciano et al. (2013) observaram melhores taxas de sobrevivência para a espécie *F. duorarum* no tratamento controle (81,4%), em comparação com o tratamento com BFT (63,2%). Na criação de *L. vannamei* em sistema BFT, Krummenauer et al. (2011) verificou sobrevivência de 92% utilizando a densidade de estocagem semelhante a densidade utilizada nesse estudo, que foi de 150 camarões/m².

Portanto, as diferentes densidades das bactérias probióticas verificadas neste estudo pode ser atribuída à estrutura trófica formada pelos microrganismos presentes no meio, conforme observado por Ballester et al. (2010), que identificaram a presença de detritos agrupados em flocos colonizados por bactérias heterótrofas, cianobactérias filamentosas, dinoflagelados, ciliados, flagelados e rotíferos em sistema BFT. Segundo Fugimura et al. (2015), as microalgas e bactérias são consumidas por protozoários e nemátodes que são predados por pequenos metazoários como os rotíferos, por isso o sistema BFT é caracterizado pela predação em níveis tróficos que afetam a composição e a densidade da microbiota. Conforme comentado por Krummenauer et al. (2014), a composição da microbiota é influenciada pelas práticas de criação e condições ambientais principalmente quando há o sistema BFT, que tendem selecionar espécies de microrganismos. Desta forma os efeitos do probiótico são melhores visualizados quando as condições ambientais de criação estão desfavoráveis (Souza et al., 2012). Sendo assim, a baixa concentração das bactérias probióticas no hepatopâncreas pode estar relacionada com a competição de cianobactérias filamentosas com outros microrganismos pelo substrato, conforme destacou Emerenciano et al. (2013), uma vez que tais microrganismos comumente secretam substâncias antagonistas de efeitos inibitórios na água que tendem desfavorecer o crescimento de bactérias probióticas.

5. Conclusões

Os resultados da análise microbiológica demonstraram que *B. licheniformis* teve maior capacidade de colonização no meio BFT, quando utilizada a concentração de $3,25 \cdot 10^5$ UFC.g⁻¹, enquanto *B. Subtilis* respondeu melhor à colonização no hepatopâncreas dos camarões em concentrações a partir de $2,7 \cdot 10^5$ UFC.g⁻¹.

Em relação ao desempenho zootécnico foi determinado que adição do probiótico em concentrações a partir de $1,08 \cdot 10^5$ UFC.g⁻¹ proporcionou aumento significativo da sobrevivência dos camarões nas condições experimentais avaliadas. Por outro lado, a adição do probiótico não teve efeito significativo sobre os parâmetros de qualidade de água monitorados durante o experimento.

6. Referências

- Allinger, H., 1975. Laboratório americano, 7 (10), 75. Read more: https://www.hielscher.com/pt/extraction_01.htm#Allinger_1975#75571
- American Public Health Association (APHA), 2005. American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition.
- Ashe, S., Maji, U.J., Sen, R., Mohanty, S., Maiti, N.K., 2014. Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive *Bacillus subtilis* by PCR. 3 Biotech. 4 (5), 461-465. doi:10.1007/s13205-013-0177-6
- Avnimelech, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. 1999. Aquaculture 176, 227–235. doi:10.1016/S0044-8486(99)00085-X
- Avnimelech, Y., Kochva, M., Hargreaves, J.A., 1999. Sedimentation and resuspension in earthen fish ponds. J. World Aquac. Soc. 30, 401 – 409. doi:10.1111/j.1749-7345.1999.tb00988.x
- Ballester E.L.C., Abreu P.C., Cavalli R.O., Emerenciano M., Abreu L.; Wasielesky W. Jr, 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. Aquaculture Nutrition 16, 163–172. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00648.x
- Balqadi, A.A., Salama, A.J., Mohammad, A.M., Satheesh, S., 2015. Effect of a Probiotic Product, Promarine on Growth Responses of Indian White Prawn, *Penaeus (Fenneropenaeus) Indicus*. Yunus Araştırma Bülteni. 1, 33-43. doi:10.17693/yunus.96769
- Browdy, C.L. Dec. 2013. Proceedings of the Biofloc Technology and Shrimp Disease Workshop. Ho Chi Minh City Vietnam. The Aquaculture Engineering Society, Copper Hill, VA USA.
- Cruz, C.D. Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. v1. 285 p.
- Cruz, P.M.; Ibáñez, A.L.; Hermosillo, O.A.M.; Saad, H.C.R., 2012. Review Article: Use of probiotics in aquaculture. Internat. Sch. Res. Net. 1-13. doi: 10.5402.2012.916845
- Costa, C.B., Lyra, J.V., Ferreira, R.C.N., Peixoto, S., Borda, R. 2013. Seleção e identificação de bactérias probióticas para aplicação na larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – UFRPE: Recife, 09-13 de dezembro.
- de Vita, G.Q.L., 2008. Utilização de probiótico no cultivo super-intensivo do camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*) em um sistema sem renovação de água. Fundação Universidade do

Rio Grande - RS (Furg). Rio Grande, Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Aquicultura. 33 p.

David, F. S., Cohen, F. P. A., Valenti, W. C., 2015. Intensification of the Giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* hatchery production. *Aquacult. Res.*, 1–6. doi:10.1111/are.12824.x.

Decamp, O., Moriarty, D.J.W., Lavens, P., 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquacult. Res.* 39, 334-338. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x.

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. *Aquacult.* 257, 346–358. doi: 10.1016/s. 0044-8486.x.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. 1973-2012. Quantificação e Identificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Disponível em: < http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf >. Acesso em Mai. 2015.

Emerenciano, M., Cuzon, G., Paredes, A., Gaxiola, G., 2013. Evaluation of biofloc technology in pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* culture: growth performance, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. *Aquacult. Int.* 21, 1381–1394. doi:10.1007/s10499-013-9640-y

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Global Aquaculture Production 1950-2014. Disponível em: < <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en> >. Acesso em: Mai. 2016.

Ferreira, G.S., Bolívar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Seiffert, W.Q., 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 448, 273–279.

Fugimura, M.M.S., Flor, H.R., de Melo, E.P., da Costa, T.V., Wasielesky Jr, W., Oshiro, L.M.Y., 2015. Brewery residues as a source of organic carbon in *Litopenaeus schmitti* white shrimp farms with BFT systems. *Aquacult. Int.* 23, 509–522 doi:10.1007/s10499-014-9832-0

Griess, P. (1879), Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12: 426–428. doi: 10.1002/cber.187901201117

Hamza, F., Kumar, A.R., Zinjarde, S., 2015. Antibiofilm potential of a tropical marine *Bacillus licheniformis* isolate: role in disruption of aquaculture associated biofilms. *Aquacult. Res.* 47, 2661–2669. doi:10.1111/are.12716

- Kennedy, B., Venugopal, M.N.; Karunasagar, I.; Karunasagar, I., 2006. Bacterial flora associated with the giant freshwater *Macrobrachium rosenbergii*, in hatchery system. *Aquacult.* 261, 1156-1167. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.09.015
- Keysami, M.A.; Saad C.R., Sijam, K.; Daud, H.M.; Alimon, A.R. 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquacult. Nutrit.* 13; 131–136. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00463.x
- Keysami, M.A.; Mohammadpour, M. 2012. Response of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) to different levels of *Bacillus subtilis* isolated from chicken intestine as probiotics. *Agricult. Sc. Techn. B* 2; 988–996. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00463.x
- Koroleff, F., 1976. Determination of Nutrients. In: Grasshoff, K. (ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie Weinheim, New York, p. 117-181.
- Krummenauer, D., Poersch, L., Romano, L.A., G.R., Lara, Encarnação, P., Wasielesky Jr, W. 2014. The Effect of Probiotics in a *Litopenaeus vannamei* Biofloc Culture System Infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. App. Aquacult.* 26, 370–379. doi:10.1080/10454438.2014.965575
- Krummenauer, D., Peixoto, S. Cavalli, RO., Poersh, L.H. Wasielesky, W. 2011. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern brazil at different stocking densities. *J. World Aquac. Soc.* 42:726-733. doi: 10.1111/j.1749
- Kumar, N.R., Raman, R.P., Jadhao, S.B., Brahmchari, R.K., Kumar, K., Dash, G., 2013. Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquacult. Int.* 21, 387-403. doi:10.1007/s10499-012-9567-8
- Kumaresan, V., Palanisamy, R., Pasupuleti, M., Arockiaraj, J., 2016. Impacts of environmental and biological stressors on immune system of *Macrobrachium rosenbergii*. *Rev. Aquac.* doi:10.1111/raq.12139
- Leuschner, R.G.K., Bew, J. Cruz A., Adler, A., Auclair, E., Bertin, G., Braconnier, M., Domig, K., Jones. P., Kneifel, W., Krause, M., Marmo, S., Michard, J., Mietke, H., O'Briain, A., Olofson, A. S., Ruppitsch, W., Thalmann, A., Voets, A., Warmerdam, C. 2003. Enumeration of Probiotic Pediococci in Animal Feed: Interlaboratory Study. *J. AOAC Internat.* 86, 568-75.
- Li, J., Xu, Y., Jin, L., Li, X., 2015. 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). *Aquacult. Res.* 46, 3008–3019. doi: 10.1111/are.12453

- Luis-Villasenor, I.E., Macías- Rodríguez, M.E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., Campa-Córdova, A.I., 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult.* 321, 136-144. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.08.036
- Madslie, E.H., Olsen, J.S., Granum, P.E., Blatny, J.M., 2012. Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. *BMC Microbiol.* 12 (230). doi:10.1186/1471-2180-12-230
- Marques, H.L.A.; Moraes-Valenti, P.M.C. 2012. Review Article: Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) and the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862)) in Brazil. *Aquacult. Res.* 43, 984-992. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03032.x
- Najdegerami, E.H., Bakhshi, F., Lakani, F.B., 2016. Effects of biofloc on growth performance, digestive enzyme activities and liver histology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings in zero-water exchange system. *Fish Physiol.Biochem.* 42:457–465. doi: 10.1007/s10695-015-0151-9
- Nimrat, S., Vuthiphandchai, V., 2011. *In vitro* evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. *Afr. J. Biotechnol.* 10 (22), 4643-4650. doi:10.5897/AJB10.2404
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., Sadayappan, B., 2013. Probiotics in aquaculture. *Drug i n v e n t. Tod.* (5), 55-59. doi:10.1016/j.dit.2013.03.003
- Ribeiro, P.A.P., Logato, P.V.R. Criação de camarões de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). Departamento de Zootecnia da UFLA. (apostila) 2016.
- Romeiro, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. 1 ed. Viçosa. Editora UFV. 2001. V. 1. 279p.,
- 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 (2), 184-191. doi:10.1016/j.aquaeng.2006.10.004
- Seenivasan, C.; Radhakrishnan, S.; Muralisankar, T.; Bhavan, P.S., 2012. *Bacillus subtilis* on survival, growth biochemical constituents and energy utilization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Egypt. J. Aquacult. Res.* 38, 195-203. doi: 1016/j.ejar.2012.12.009
- Seenivasan, C., Radhakrishnan, S., Shanthi, R., Muralisankar, T., Saravana, P. Bhavan, P.S., 2015. Influence of Probiotics on Survival, Growth, Biochemical Changes and Energy Utilization Performance of *Macrobrachium rosenbergii* Post-larvae. *Proc Zool. Soc.* 68 (1), 74-83. doi:10.1007/s12595-014-0097-4

- Shahriar, M., Haque, R., Kabir, S., Dewan, I., Bhuyian, M.A., 2011. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA Extraction from Gram-positive Strains. *Stamford J. Pharm. Sci.* 4, 53–57. doi:<http://dx.doi.org/10.3329/sjps.v4i1.8867>
- Silva, E.F., Soares, M.A., Calazans, N.F., Vogeley, J.L., do Valle, B.C., Soares, R., Peixoto, S., 2012. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and post larvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.* 44, 13–21. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.03001.x
- Souza, D. M. , Suita, S. M., Leite, F. P.L., Romano, L. A., Wasielesky, W., Ballester, E. L. C. 2012. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. *Aquacult. Res.* 43, 1828–1837 doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02992.x.
- Xue, M., Wen, C., Liang, H., Ding, M., Wu, Y., Li, X., 2016. *In vivo* evaluation of the effects of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period. *Aquacult. Res.* 47, 1661-1669. doi: 10.1111/are.12719
- Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X. and 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). *Aquacult. Res.* 42, 943–952. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02 677.x
- 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. doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.007