

PROBIÓTICOS



O que são? Para que servem? Como e quando utilizá-los? Qual seu papel na dinâmica físico-química e microbiológica da água de viveiros de cultivo do *Litopenaeus vannamei*.

SUMÁRIO

Micro-organismos.....	3
Tipos de células microbianas	4
Crescimento microbiano.....	9
Aplicações comerciais dos micro-organismos	18
Uso de probióticos na Carcinicultura Brasileira.....	19
Probióticos em carcinicultura	23
Mecanismos de ação dos probióticos na carcinicultura.....	29
Desenvolvimento de produtos probióticos	34
ANEXO I: Bactérias utilizadas como probióticos na carcinicultura e suas ações.....	35
ANEXO II: Metabólitos produzidos por bactérias benéficas presentes nos probióticos.	37
Referências Bibliográficas.....	38
ANEXO III: Artigo da Revista da ABCC, 2017 – “Os Benefícios do Uso de Probióticos na Aquicultura” .	41
Referências bibliográficas.....	56

Micro-organismos

A microbiologia é uma ciência destinada ao estudo dos micro-organismos. Esta área de estudo trata também da diversidade e evolução das células microbianas, abrangendo o porquê e como os diferentes tipos de micro-organismos surgiram. Além de abranger a ecologia, que compreende os estudos dos locais onde os micro-organismos vivem na Terra, como eles se associam e cooperam uns com os outros, bem como, qual a função deles nos ecossistemas. Dentre os micro-organismos podemos citar as bactérias, arqueobactérias e fungos, que possuem grande importância ambiental (MADIGAN, 2016).

Os micro-organismos estão presentes em qualquer lugar da Terra e dão suporte à vida. Esses hábitat incluem o solo, a água, os animais e as plantas, bem como praticamente todas as estruturas feitas pelos seres humanos (MADIGAN, 2016). Nesse contexto, os micro-organismos também estão presentes nos ambientes de cultivo de animais aquáticos, como camarões e peixes, tanto na água, no solo, na superfície do corpo e sistema digestivo dos animais. Essa microbiota ambiental desempenha um papel fundamental para a manutenção do equilíbrio nesses ecossistemas e desenvolvimento dos animais aquáticos.

Os micro-organismos estão nos ambientes onde vivem em altas densidades. No corpo humano, por exemplo, os números das células microbianas superam em dez vezes o número de células do nosso corpo. A esterilidade (ausência de formas de vida) em qualquer amostra natural é extremamente rara. Os micro-organismos podem ser encontrados também em

locais muito extremos, tais como geleiras, vulcões e fundo do mar, sendo de fundamental importância o estudo dos micro-organismos de ambientes inóspitos a fim de se entender quais são os limites ambientais para a vida e para buscar novos produtos que podem beneficiar os seres humanos e o planeta (TORTORA, 2012).

Os micro-organismos marinhos e de água doce constituem a base da cadeia alimentar em oceanos, lagos e rios. A microbiota do solo ajuda a degradar detritos e incorporar nitrogênio gasoso do ar em compostos orgânicos, reciclando assim os elementos químicos entre o solo, a água, os seres vivos e o ar. Os seres humanos e muitos outros animais também dependem dos micro-organismos em seus intestinos para realizar a digestão e sintetizar algumas vitaminas que seus corpos requerem, incluindo algumas vitaminas do complexo B e vitamina K (TORTORA, 2012). É importante ressaltar que apenas uma minoria dos micro-organismos é patogênica (causadora de doenças), o conhecimento prático sobre os micróbios é de fundamental importância para a biotecnologia, medicina, bem como, para a conservação do meio ambiente e o desenvolvimento das ciências relacionadas à saúde.

Tipos de células microbianas

As células microbianas são compartimentos vivos que interagem com o meio circundante e com outras células de forma dinâmica. Algumas características e determinados componentes podem ser observados em vários tipos de células. Todas as células possuem uma barreira de permeabilidade

chamada de membrana citoplasmática que separa o interior da célula, do ambiente externo.

O citoplasma é uma mistura aquosa de macromoléculas – proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e polissacarídeos – moléculas orgânicas menores (principalmente precursores de macromoléculas), diversos íons inorgânicos, e ribossomos, as estruturas sintetizadoras de proteínas das células.

A parede celular confere resistência estrutural à célula. É uma estrutura relativamente permeável localizada exteriormente à membrana plasmática, além de ser uma camada muito mais forte do que a membrana em si. Células de plantas e a maioria dos micro-organismos possuem parede celular, enquanto as células animais, com raras exceções, não possuem (MADIGAN, 2016).

A análise da estrutura interna da célula revela dois padrões, chamados de procariota e eucariota (Figura 1). Os procariotas incluem as Bactérias e Archaeas e possuem células pequenas e estruturalmente simples. Os eucariotas são caracteristicamente maiores que os procariotas e contêm uma variedade de estruturas citoplasmáticas envoltas em membranas chamadas de organelas. Essas incluem o núcleo que contém o DNA, mitocôndrias, cloroplastos, retículos endoplasmáticos, além de diversas outras organelas. Os micro-organismos eucariotas incluem algas, protozoários e outros protistas, bem como, fungos filamentosos e leveduras. As células de plantas e animais também são eucarióticas.

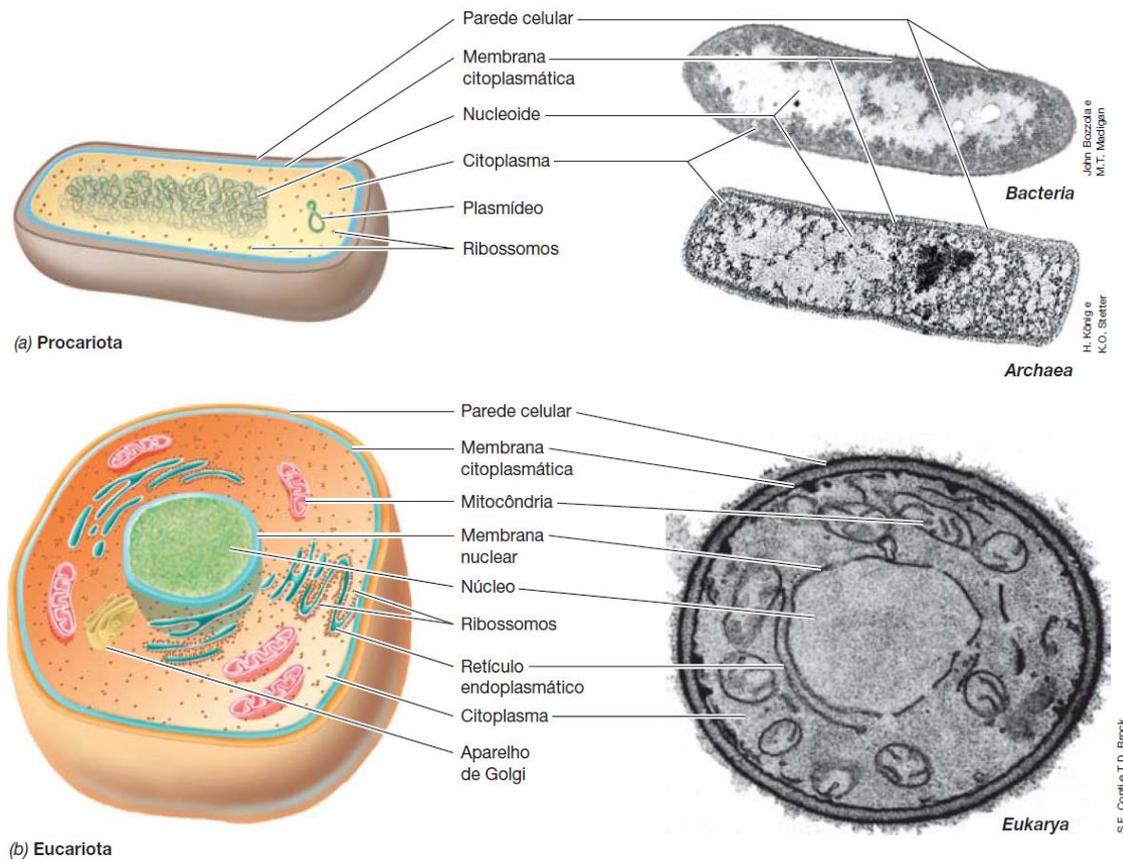


Figura 1: Estrutura da célula microbiana. (a) Diagrama de uma célula procariota (à esquerda). Micrografia eletrônica de *Heliobacterium modesticaldum* (Bacteria, a célula tem em torno de 1 mm de diâmetro) de *Thermoproteus neutrophilus* (Archaea, a célula tem em torno de 0,5 mm de diâmetro) (à direita). (b) Diagrama de uma célula eucariota (à esquerda). Micrografia eletrônica de uma célula de *Saccharomyces cerevisiae* (Eukarya, a célula tem em torno de 8 mm de diâmetro) (à direita). Fonte: MADIGAN, 2016.

A forma celular ativa dos micro-organismos é chamada de forma vegetativa. Determinadas espécies de Bacteria além da forma vegetativa, podem produzir estruturas latentes de resistência denominadas endósporos (Figura 2), durante um processo denominado esporulação. Os endósporos (o prefixo “endo” significa “no interior”) são células altamente diferenciadas que exibem extrema resistência ao calor, bem como, produtos químicos fortes e mesmo a radiação. Os endósporos atuam como estruturas de sobrevivência e permitem ao

organismo resistir a condições de crescimento adversas, como extremos de temperatura, dessecação ou carência nutricional (MADIGAN, 2016).

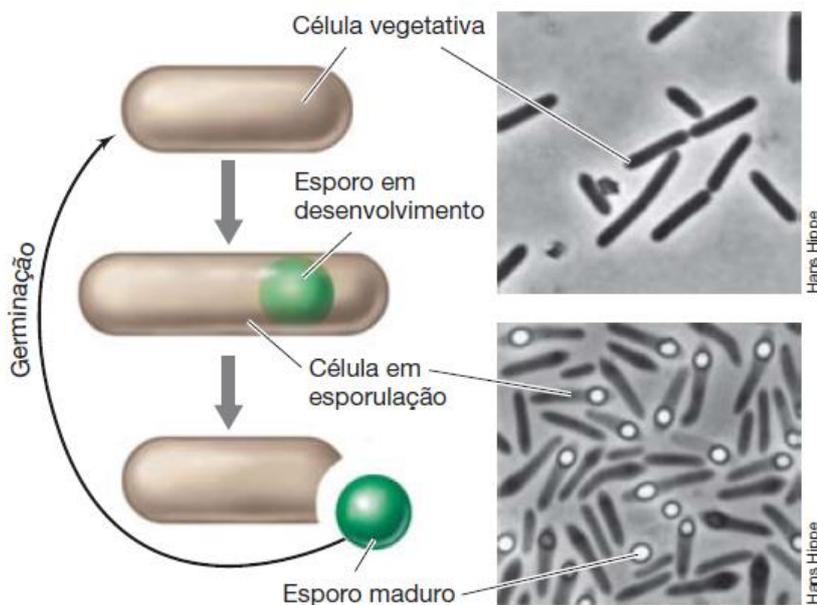


Figura 2: Ciclo de vida de uma bactéria formadora de endósporos. Fotomicrografias de contraste de fase de células de *Clostridium pascui*. Uma célula apresenta cerca de 0,8 μ m de largura. Fonte: MADIGAN, 2016.

Desse modo, os endósporos podem ser considerados como o estágio latente de um ciclo de vida bacteriano. Os endósporos também são facilmente dispersos pela ação do vento, da água ou por meio do trato gastrointestinal dos animais. As bactérias formadoras de endósporo são encontradas predominantemente no solo, sendo as espécies do gênero *Bacillus* os representantes mais bem estudados.

Dentre os micro-organismos mais estudados e utilizados na Aquicultura destacam-se as bactérias e as leveduras. As células bacterianas podem

apresentar de diferentes formas variando de formatos arredondados, para formatos de bastões, vírgula, bastões contorcidos ou espirais (Figura 3).

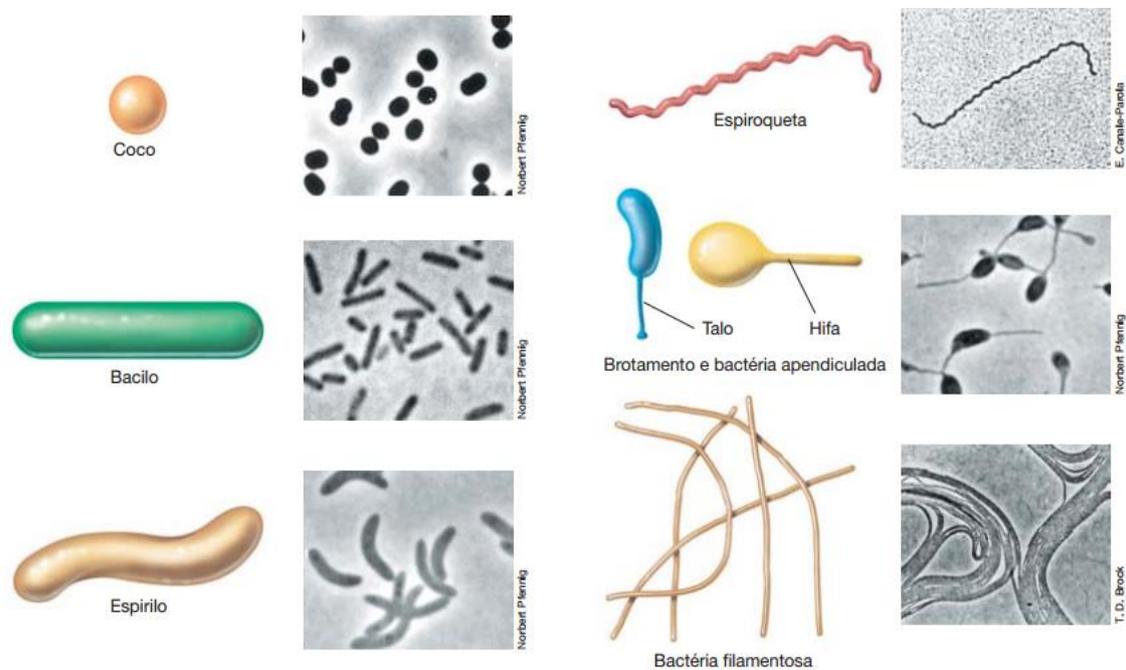


Figura 3: Morfologia celular. Ao lado de cada desenho das células existe uma fotomicrografia de contraste de fase demonstrando a morfologia. Coco (diâmetro celular na fotomicrografia, 1,5 μm); bacilo (1 μm); espirilo (1 μm); espiroqueta, (0,25 μm); bactérias com brotamento (1,2 μm); bactérias filamentosas (0,8 μm). Todas as fotomicrografias são de espécies de bactérias. Nem todas estas morfologias são conhecidas entre as arqueias. Fonte: MADIGAN, 2016.

Além dessa grande variedade de formatos, as células podem apresentar-se isoladamente ou em formas de arranjos celulares como estafilococos (como cachos de uva), estreptococos (como contas de um colar), tétrades (como um quadrado) e sarcina (como um cubo).

No mundo microbiano existem células que não possuem motilidade e outras que são capazes de se movimentarem através de flagelos que variam entre as espécies (Figura 4). A motilidade pode ser influenciada por diferentes

fatores ambientais como nutrientes, luminosidade, pH, magnetismo, dentre outras, sempre em busca de ambientes favoráveis de crescimento.

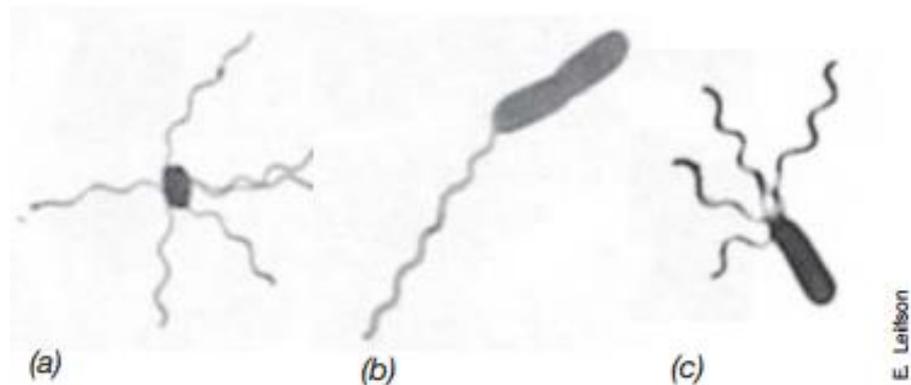


Figura 4: Flagelos bacterianos. Fotomicrografias ópticas clássicas, tiradas por Einar Leifson, de bactérias apresentando diferentes arranjos flagelares. As células foram coradas pelo método de Leifson de coloração de flagelos. (a) Peritríquio. (b) Polar. (c) Lofotríquio. Fonte: MADIGAN, 2016.

Crescimento microbiano

Os micro-organismos são cultivados em meios que contém nutrientes. Eles apresentam grandes diferenças com relação às condições físicas e nutricionais requeridas para o crescimento. Assim, as condições físicas e nutricionais devem ser ajustadas no laboratório para satisfazer as necessidades específicas de cultivo. Dessa forma, quatro condições principais influenciam o meio físico de um micro-organismo: temperatura, pH, atmosfera gasosa e pressão osmótica.

A temperatura tem grande influência no crescimento dos micro-organismos, uma vez que todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas que são afetadas pela temperatura. No entanto, a variação

da temperatura pode ter efeito maior para alguns e menor para outros. A temperatura na qual uma espécie de micro-organismo cresce mais rapidamente é temperatura ótima, nessas temperaturas favoráveis ao crescimento geralmente dobra a cada aumento de temperatura de 10° C.

Os micro-organismos podem ser divididos em 3 grupos, de acordo com a variação de temperatura na qual crescem melhor:

1 - Psicrófilos: crescem em baixas temperatura em torno de 15 a 20° C, embora possam crescer em temperaturas mais baixas, alguns morrem se expostos à temperatura ambiente.

2 - Mesófilos: crescem em temperatura moderadas, em torno de 25 a 40° C, incluem algumas bactérias saprofitas, fungos (limite mínimo), parasitários (limite máximo) e patogênicos (37° C).

3 - Termófilos: crescem em altas temperaturas, em torno de 40 a 85° C, mas crescem melhor entre 50 a 60°C. Podem ser encontrados em áreas vulcânicas, fertilizante e nascentes quentes.

Os micro-organismos em seu habitat natural necessitam de quantidades variadas de gases como o O₂, CO₂, N₂ e CH₄. De forma que para cultivar micro-organismos em laboratório, o gás apropriado deve estar presente. O CO₂ é utilizado por todas as células para certas reações químicas, entretanto o O₂ requerido por alguns é tóxico para outros.

De acordo com a resposta ao O₂ gasoso, os micro-organismos são divididos em 4 grupos fisiológicos:

1 - Aeróbicos: requerem O_2 para o crescimento e podem crescer em uma atmosfera padrão de 21% de O_2 . Ex: fungos filamentosos e algumas bactérias.

2 - Microaerófilos: podem utilizar O_2 nas reações químicas para a produção de energia, mas em concentrações abaixo do ar, entre 1 a 15%.

3 - Facultativos: são aqueles que crescem na presença do ar atmosférico e também podem crescer em anaerobiose. Não requerem O_2 para seu crescimento, embora possam utilizá-lo para produção de energia. Em condições anaeróbicas, eles obtêm energia por fermentação. Ex: Algumas leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*.

4 - Anaeróbicos: são aqueles que podem ser mortos pela presença do O_2 , não podem crescer na presença do ar e não utilizam o O_2 para produção de energia. Alguns podem tolerar baixas concentrações de O_2 , mas os anaeróbicos estritos são mortos em uma breve exposição ao O_2 , por exemplo: *Clostridium*. Para o cultivo de bactérias anaeróbicas, o O_2 deve ser eliminado, sendo possível utilizar a câmara de anaerobiose (H_2 , CO_2 e N_2) ou um redutor.

5 - Aerotolerantes: toleram o O_2 , mas não utilizam para seu crescimento. A maioria é capaz de fermentar carboidratos formando ácido lático, não precisa de cuidados especiais como os anaeróbicos. Ex.: *Lactobacillus*.

O pH ótimo para o crescimento microbiano encontra-se no valor mediano da variação de pH que o crescimento acontecerá, mas para crescer favoravelmente em um meio ácido ou básico um micro-organismo deve ser

capaz de manter seu pH intracelular em torno de 7,5 não importando qual o valor externo.

Para a maioria das bactérias o valor mínimo de pH está em torno de 4, com pH igual a 9 como máximo de crescimento, e pH ótimo em torno de 7,0. Importante ressaltar que existem bactérias e arqueias que crescem em pH extremos. Já os bolores e as leveduras apresentam uma variação de pH mais ampla do que as bactérias, com pH ótimo em torno de 5 a 6, mais baixo que das bactérias.

Quando os micro-organismos em crescimento ativo são cultivados em um meio de cultura, o pH do meio sofrerá alteração à medida que os compostos ácidos ou básicos são produzidos. Esta mudança de pH do meio pode ser tão grande que o crescimento pode ser prejudicado, podendo ser prevenidos pela adição de um tampão no meio de cultura.

Outro fator a ser considerado em um meio de cultivo é a força com a qual a água flui pela membrana de uma concentração baixa de sal para outra mais concentrada. Algumas bactérias que necessitam de altas concentrações de sais para seu crescimento são denominadas halofílicas.

Em relação aos nutrientes químicos necessários para nutrição dos micro-organismos, podemos citar como principais: carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fosforo, e alguns elementos-traço. Eles são divididos em macronutrientes e micronutrientes, de acordo com a quantidade utilizada para o metabolismo.

Dentre esses nutrientes, o carbono é um dos mais importantes, uma vez que todos os micro-organismos requerem carbono de alguma forma, como parte dos nutrientes orgânicos, como carboidratos, lipídeos e proteínas. Esses compostos fornecem energia para o crescimento das células e como unidade básica do material celular. Os que utilizam compostos orgânicos como principal fonte de carbono são denominados heterotróficos. Os organismos que utilizam o CO₂ como sua principal fonte de carbono ou até mesmo a única são os autotróficos, podem viver apenas com moléculas inorgânicas simples e íons absorvidos do meio.

O nitrogênio é a parte essencial dos aminoácidos que formam as proteínas e ácidos nucleicos. As bactérias podem utilizar diferentes formas de nitrogênio. Algumas podem fixá-lo diretamente do ar para síntese celular. Outras utilizam compostos nitrogenados (nitratos, nitritos e amônia) enquanto outras utilizam compostos orgânicos como aminoácidos e peptídeos.

O hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo são considerados elementos essenciais. O hidrogênio e oxigênio fazem parte de vários compostos orgânicos, enquanto o enxofre é necessário para biossíntese de cisteína e metionina. O fósforo é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e ATP (armazenamento e transferência de energia). Alguns desses elementos são encontrados na água, componentes de vários nutrientes ou na atmosfera gasosa do meio.

Como elementos traços temos o zinco, cobre, molibdênio, manganês, magnésio, ferro, cobalto, entre outros e eles são requeridos como cofatores de

enzimas. Podem ser adicionados como sais ao meio microbiológico, mas normalmente ocorrem como impurezas de outros componentes do meio.

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de micro-organismos podem ser quimicamente definidos, como composições definidas, ou podem ser meios de cultura complexos, os quais são preparados a partir de produtos naturais como extrato de carne, peptonas, extrato de levedura, sangue soro, leite, extrato do solo etc. Todos estes substratos são substâncias químicas complexas que contém açúcares, aminoácidos, vitaminas e sais, cuja composição exata é desconhecida.

Em geral, quando é necessário um meio solidificado para o cultivo é acrescentado um agente solidificante, como o ágar, que é extraído das algas. Este agente uma vez solidificado, o meio pode ser incubado e usado para inocular micro-organismos.

Existem centenas de meios de cultivos diferentes, disponíveis comercialmente. Os meios escolhidos para o cultivo de bactérias normalmente imitam seus habitats. Por exemplo, se preferem nutrientes do sangue, então o sangue pode ser adicionado ao meio. Alguns micro-organismos são mais exigentes e requerem vários aminoácidos e vitaminas para crescer e por isso são considerados fastidiosos, necessitando de meios quimicamente definidos.

Os micro-organismos de um modo geral também podem crescer em meio líquidos e o crescimento é superior ao meio sólido devido a maior disponibilidade de nutrientes.

Quanto à reprodução, pode-se afirmar que a maioria das bactérias se multiplica pelo processo de reprodução assexuada, um processo que não envolve células sexuais (gametas). Assim, novas células surgem apenas de uma célula parental. Cada célula divide-se em duas células-filhas idênticas.

A partir de uma única célula bacteriana através de divisão celular, pode-se obter uma colônia com milhares de bactérias. As bactérias dividem-se por fissão binária em crescimento exponencial, ou seja, em progressão geométrica, o que significa que cada célula se divide em duas, as duas em quatro e assim por diante. Este aumento pode ser expresso como uma progressão geométrica (PG) da seguinte maneira 2^n , onde n é o número de gerações.

O intervalo requerido para que cada micro-organismo se divida ou para que a população em uma cultura duplique em número é conhecido como tempo de geração. Nem todas as espécies tem o mesmo tempo de geração (min – horas). Os tempos de geração são fortemente influenciados pela composição nutricional do meio bem como pelas condições físicas de incubação.

O crescimento de uma espécie em cultura pode ser caracterizado em termos quantitativos, isto inclui o número de gerações que tem num período de incubação, o tempo de geração e a taxa de crescimento (número de gerações por hora). Os organismos de crescimento rápido são mais úteis em muitos tipos de pesquisas e aplicações industriais. Os valores de crescimento permitem aos cientistas predizer e controlar a quantidade de crescimento de qualquer espécie bacteriana.

Pode-se calcular o número de gerações numa cultura se o número das populações (inicial e final) for conhecido. Segundo a fórmula $n=3,3 (\log N_{10} - \log N_{0,10})$ e o tempo de geração “g” pode ser determinado pelo número de gerações que ocorre em um intervalo de tempo t, simplesmente pela divisão de t por n.

As células bacterianas crescendo em um frasco ou tubo com meio de cultura líquido estão em um sistema fechado, porque nenhum novo nutriente é adicionado ao sistema e nenhum produto de excreção é removido. Desta forma, as várias fases de crescimento em uma cultura microbiana constituem uma curva de crescimento típica (Figura 5), que demonstra o crescimento das células durante um período de tempo. Esta curva é obtida quando se realiza a contagem da população em intervalos de tempo após um inóculo de um número pequeno de bactérias em um meio líquido. Existem, basicamente, quatro fases de crescimento: Fase inicial (Lag), Fase exponencial (Log), Fase estacionária e Fase de Declínio (morte celular).

Durante um período de tempo o número de células sofre pequenas variações, pois as bactérias não se reproduzem imediatamente quando são colocadas num meio de cultura novo. Este período, que ocorre pouca ou ausência de divisão, é conhecido como fase Lag. Esta fase pode variar de 1 hora ou até vários dias. Salienta-se que embora os micro-organismos estejam em estado de latência eles estão em intensa atividade metabólica, principalmente para a síntese de DNA e de enzimas.

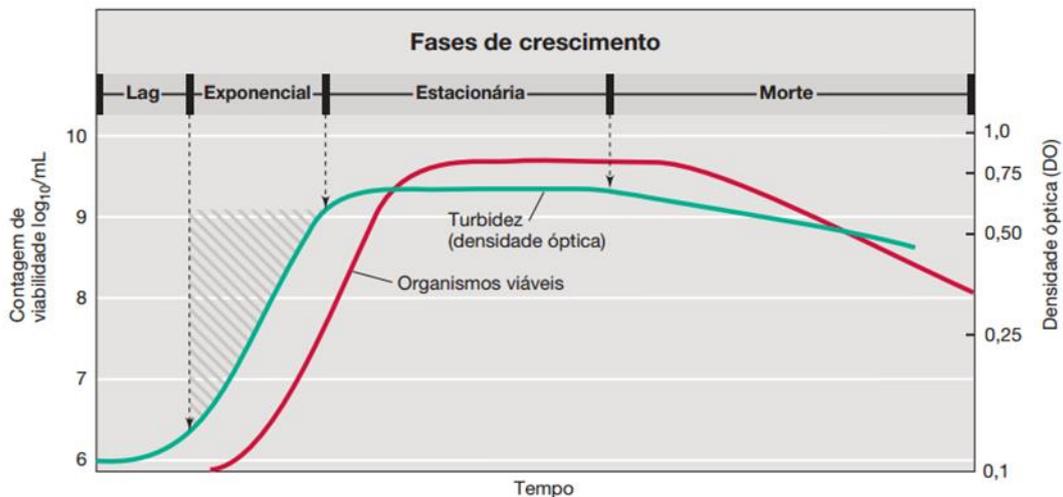


Figura 5: Curva de crescimento típica de uma população bacteriana. Uma contagem de viáveis mede as células presentes na cultura capazes de se reproduzir. A densidade óptica (turbidez), uma medida quantitativa da dispersão de luz por uma cultura líquida, aumenta de acordo com o aumento do número de células. Fonte: MADIGAN, 2016.

A partir de um determinado momento, as células iniciam seu processo de divisão entrando no período de crescimento logarítmico, o qual é chamado de fase exponencial ou logarítmica (LOG). Nesse período a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e é quando o tempo de geração atinge valor constante. É o período de maior atividade metabólica da célula, sendo o estágio preferido para fins industriais. No entanto, nesta fase os micro-organismos são sensíveis às mudanças ambientais, a radiações ou a compostos antimicrobianos.

Se a fase de crescimento exponencial continua durante um longo período, ocorrerá a formação de um grande número de células. Em determinado momento a velocidade de crescimento diminui e o número de mortes celulares é equivalente ao número de células novas e assim a população se torna estável. A atividade metabólica decresce, dando início à fase estacionária.

Diversos são os fatores que podem induzir à diminuição da fase exponencial, tais como: o esgotamento de nutrientes, o acúmulo de produtos de degradação e alterações no pH.

Em um determinado momento a população entra na fase de morte celular ou declínio, pois o número de células mortas excede o de novas, o que leva à existência de uma fração íntima da população ou ao seu total desaparecimento.

Aplicações comerciais dos micro-organismos

Os micro-organismos possuem muitas aplicações comerciais, sendo usados na síntese de produtos químicos como vitaminas, ácidos orgânicos, enzimas, álcoois e muitas drogas. A indústria de alimentos também usa micróbios para produzir ou conservar vinagre, chucrute, pickles, bebidas alcoólicas, azeitonas verdes, molho de soja, manteiga, queijos, iogurte e pão. Além disso, enzimas produzidas por micróbios podem ser manipuladas através de modificações genéticas de modo que os micro-organismos produzam substâncias que normalmente não sintetizariam. Estas substâncias incluem celulose, digestivos e compostos para limpeza de tubulações, além de substâncias de grande importância terapêutica como a insulina (TORTORA, 2012).

Dentre estas inúmeras aplicações de células microbianas e seus metabólitos, estão os micro-organismos denominados de probióticos, que são suspensões de micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios notáveis à saúde do hospedeiro (FAO, 2001), bem como, do ambiente explorado.

É sabido que os micro-organismos que fazem parte da microbiota normal de um ser crescem sobre e dentro do corpo, e são essenciais para o bem-estar de todos os organismos superiores. Os micro-organismos que adquirimos e retemos competem em vários locais do corpo com patógenos, inibindo colonização por estes organismos. Micro-organismos comensais que residem no intestino são participantes ativos na digestão dos alimentos e fabricação de nutrientes essenciais. Os seres podem manipular as bactérias do seu sistema digestivo, alterando, regulando ou reforçando a microbiota normal para aumentar os benefícios positivos através de certas bactérias selecionadas. Assim, micro-organismos ingeridos intencionalmente para este propósito são denominados probióticos.

Uso de probióticos na Carcinicultura Brasileira

A carcinicultura é uma atividade cujo desempenho está diretamente condicionado à qualidade físico-química e biológica da água que utiliza. Sem as condições ideais de água, simplesmente não haverá produção sustentável e econômica viável do camarão cultivado.

Dentre os fatores que contribuem para as alterações da qualidade da água de cultivo e do sedimento, a matéria orgânica, resultante do processo de cultivo e alimentação dos camarões (seja oriunda das fezes ou da ração não consumida) é o mais representativo. A matéria orgânica deposita-se no fundo dos viveiros e modifica os parâmetros físico-químicos da água, acarretando um desequilíbrio no ambiente de cultivo. Isso pode se agravar com a intensificação dos cultivos e a aplicação de forma incorreta da ração. Desse modo, o apropriado

manejo na oferta de alimento, evitando o desperdício e o excessivo acúmulo de matéria orgânica, atrelado ao controle da qualidade da água e do solo, pode auxiliar o produtor na manutenção do equilíbrio entre os níveis de produtividade almejados e a saúde ambiental dos cultivos.

Os surtos de doença são vistos como fatores limitantes da produção e comercialização em aquicultura vem afetando o desenvolvimento econômico do setor em muitos países. No Brasil, houve um relativo crescimento em número de produtores e na área total utilizada para o cultivo, embora dados recentes revelem que a produção total declinou e que, praticamente, o país deixou de exportar camarão em relação ao último levantamento realizado em 2004, e isto se deve em grande parte ao acontecimento de surtos derivados da proliferação de patógenos (ABCC, 2013).

Até agora, as abordagens convencionais têm tido um sucesso limitado na prevenção ou cura de doenças em animais aquáticos. Assim, estratégias como a utilização de probióticos podem se tornar importantes ferramentas tecnológicas por contribuir para a melhoria do ambiente de cultivo e, conseqüentemente, por trazer efeitos benéficos no que tange à sustentabilidade e ao aumento de produtividade (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Os probióticos podem ser usados em todas as fases durante o cultivo e são especialmente úteis nas fases larvais e iniciais de desenvolvimento, quando as vacinas não podem ser administradas (IBRAHEM 2013). São micro-organismos capazes de colonizar e crescer no intestino, mostrando vários efeitos benéficos, tais como a modulação de processos biológicos (CROSS 2002) e de

restabelecimento do equilíbrio microbiano indígena (CROSS, 2002; MORELLI et al., 2003).

As bactérias probióticas estão inseridas no grupo dos biocontroladores. De acordo com Vieira et al. (2010), as bactérias probióticas tem potencial para substituir os antibióticos por não poluir o ambiente, não selecionar cepas resistentes, além de possibilitar um melhor crescimento de pós-larvas de camarão em laboratório.

A microbiota intestinal bem estabelecida é crucial para a saúde dos camarões, uma vez que a microbiota tem impactos sobre a nutrição e a prevenção de infecções patogênicas, bem como, sobre a integridade e função dos órgãos digestivos, e também sobre o desenvolvimento do sistema imune. Isto pode ser feito pela suplantação das linhagens de bactérias potencialmente patogênicas por linhagens de micro-organismos benéficos presentes nos probióticos.

Outro fator que auxilia o controle e disseminação de doenças é o sistema de reuso e recirculação de água. As trocas de água reduzida favorecem a manutenção da qualidade da mesma nos ambientes de cultivo, em decorrência da conservação das comunidades microbianas e da redução dos riscos com infecções exógenas. Este manejo praticamente elimina o descarte de nutrientes ao meio ambiente, e diminui a possibilidade da introdução de patógenos ao sistema produtivo, protegendo-o das enfermidades de importância econômica.

Os probióticos são amplamente utilizados nos principais países produtores de camarão. No Brasil, de acordo com o último levantamento dos produtores de

camarão realizado pela Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2011), o uso continuado de probióticos ainda se restringe aos médios/grandes produtores, enquanto micro/pequenos carcinicultores não os empregam rotineiramente devido ao elevado custo destes produtos durante o cultivo.

De fato, muitos estudos demonstram a efetividade do uso de micro-organismos probióticos na aquicultura, e que o uso de bactérias benéficas (probióticas) para inibir patógenos através de processos naturais é, sem dúvida, um meio mais seguro e efetivo do que o uso de antibióticos para promover a saúde animal (GARCÍA; MASSAM, 2005). No entanto, a interação de micro-organismos com animais e seus ambientes numa produção de escala comercial deve ser gerenciada com cautela, principalmente porque os micro-organismos são passíveis de realizar transferência horizontal de genes e caso as cepas utilizadas contenham genes de resistência a antibióticos ou de virulência elas poderão transferir estes genes para bactérias ambientais, o que pode ser danoso à produção aquícola e ao meio ambiente.

Além disso, os dados sobre o uso de probióticos na carcinicultura no Brasil são escassos. Alguns dos probióticos mencionam todas as espécies de micro-organismos utilizados nas formulações. Outros não indicam as espécies de micro-organismos e alguns apenas fazem referência ao metabolismo destes organismos (COSTA, 2015).

É importante salientar que o uso de probióticos pressupõe que as linhagens microbianas utilizadas devam permanecer viáveis durante a estocagem e processamento de formulações e aplicações, podendo ser

aplicadas na forma de células vegetativas em culturas líquidas, ou na forma de células liofilizadas (secas), cujos micro-organismos podem se encontrar na forma vegetativa ou esporulada.

Probióticos em carcinicultura

A primeira questão a ser abordada quando se fala de probióticos na carcinicultura é a própria definição de probiótico que segundo a FAO, 2001 são “micro-organismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Está claro que esta definição de probióticos considera apenas os animais terrestres e desconsidera o fato de que a microbiota intestinal de um organismo aquático (principalmente os cultivados em cativeiro) está intimamente relacionada com a do ambiente externo.

Por este motivo existem diversas outras definições mais abrangentes de probióticos:

1 - Gatesoupe (1999) definiu probiótico como: “micro-organismo vivo que ao ser ministrado coloniza o trato digestório dos animais de cultivo com o objetivo de melhorar a saúde destes animais”.

2 - Moriarty (1998) propôs estender a definição de probióticos para “aditivos microbianos para água com o intuito de melhorar a qualidade de água e decompor matéria orgânica, biorremediadores”,

3 - Maeda et al. (1997) defendem o uso de componentes microbianos como biocontrole, onde utilizam a interação entre micro-organismos para reprimir o crescimento de bactérias e vírus patogênicos. Para outros, no entanto, as bactérias adicionadas diretamente na água de viveiros de camarão, por definição, não são consideradas probióticos e não devem ser comparadas com os organismos vivos adicionados à ração (FARZANFAR 2006; RENGPIPAT et al. 2003).

Assim, o conceito de probiótico em aquicultura apresenta-se como micro-organismos vivos que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, podendo ser capazes de modificar a microbiota (intestinal ou ambiental), melhorar a absorção dos alimentos ou seu valor nutricional, aumentar a resposta do hospedeiro em relação à doença, ou, ainda, melhorar a qualidade do seu ambiente de cultivo (VERSCHUERE et al., 2000).

Por conseguinte, como se vê são inúmeras as possibilidades de definição do termo probiótico, e por este motivo consideraremos como probióticos todas as formas possíveis de preparações microbianas para uso em aquicultura. A **Figura 6** apresenta um resumo das principais preparações microbianas e/ou químicas usadas em aquicultura. Observe ainda que estão incluídos nesta figura, o uso de prebióticos e simbióticos como conceito de preparações que podem ser usadas em aquicultura, mas lembre-se que estas preparações são químicas e foram incluídas apenas para fins didáticos.

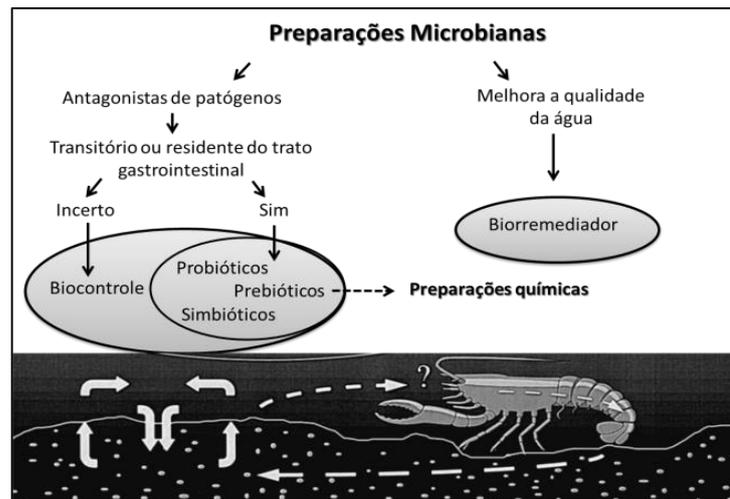


Figura 6: Resumo das principais preparações microbianas e/ou químicas usadas em aquicultura (adaptado de GATESOUBE, 1999).

Os exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos em aquicultura são:

- 1 - Bactérias ácido-láticas de diferentes espécies dos gêneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, etc;
- 2 - Bactérias gram-positivas formadoras de esporos de diferentes espécies como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. megaterium*, etc);
- 3 - Fungos, como é o caso das leveduras (principalmente espécies dos Gêneros *Saccharomyces*);
- 4 - Bactérias fotossintéticas e outros tipos de micro-organismos (veja também o ANEXOS I).

A administração de probióticos à água, ou à dieta, tem contribuído substancialmente para a melhora da qualidade ambiental. No ambiente de cultivo por exemplo, promove a redução das concentrações de compostos

nitrogenados ou fosforados, a melhoria dos parâmetros físico-químicos da água de cultivo e a inibição ou também, o crescimento de micro-organismos patógenos. No animal, contribui para regular a microbiota intestinal, com importante aporte de enzimas digestivas e com fatores de crescimento. Adicionalmente, os probióticos podem estimular o sistema imunológico nos organismos que os consomem.

Já os prebióticos são compostos não digeríveis nem pelas enzimas, nem por sais e ácidos produzidos pelo animal, e que ao contrário disso, são fermentadas seletivamente pelos micro-organismos presentes em seu trato gastrointestinal, estas substâncias são fornecidas em ingredientes da dieta ou adicionadas posteriormente a partir de fontes exógenas (AZEVEDO et al. 2015; MERRIFIELD et al. 2010). Ou seja, os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que seletivamente estimulam o crescimento e/ou o metabolismo de bactérias promotoras da saúde do trato intestinal, que ocorrem naturalmente nesse ambiente, melhorando o balanço intestinal do organismo (Figura 7).

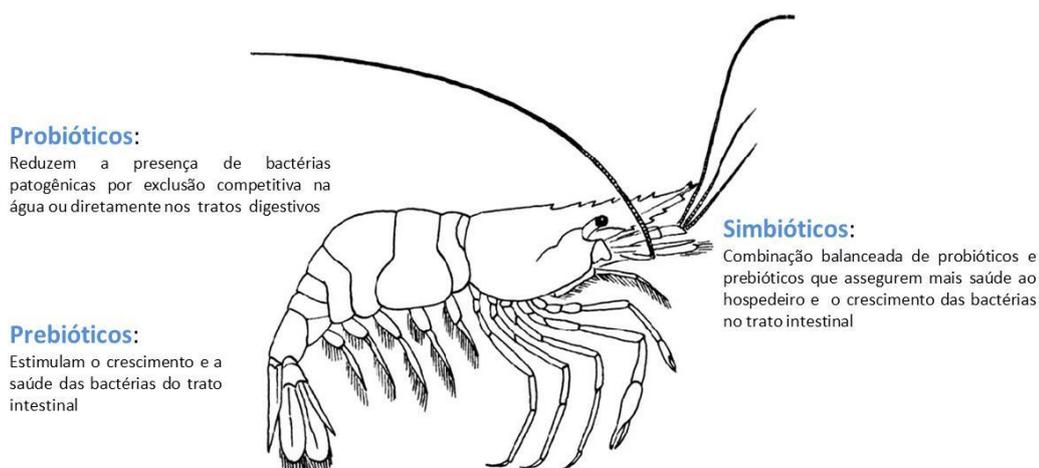


Figura 7: Esquema geral dos efeitos da aplicação de probióticos, prebióticos e simbióticos.

Desta maneira, os prebióticos agem em perfeita sintonia com os probióticos e se constituem em fonte de "alimento" para as bactérias probióticas. Os microorganismos mais frequentemente favorecidos pelos prebióticos são àqueles pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacter*, os quais tendem a limitar a presença de bactérias nocivas.

Como exemplos de prebióticos temos os açúcares absorvíveis ou não, as fibras, os alcoóis de açúcares e os oligossacarídeos, como os mananoligossacarídeos (MOS) e os frutooligossacarídeos (FOS). Na Figura 8 pode-se observar a molécula da inulina, a qual é utilizada como prebiótico.

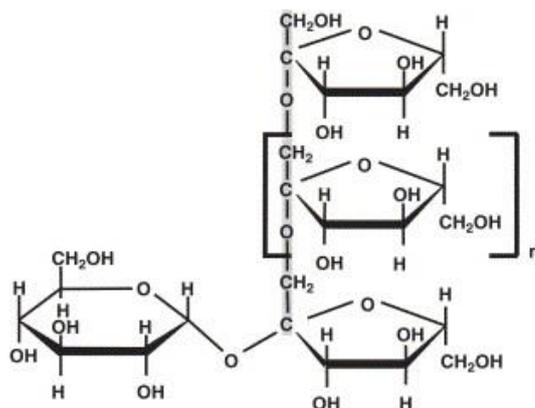


Figura 8: Molécula da inulina utilizada como prebiótico.

Os oligossacarídeos constituídos por cadeias curtas de 3 a 10 açúcares simples, ligados entre si, têm recebido mais atenção pelas inúmeras propriedades prebióticas atribuídas aos mesmos. Estes oligossacarídeos são derivados principalmente de componentes da parede celular de plantas e fungos. O uso de prebióticos também está associado ao aumento da área de absorção do trato gastrointestinal, favorecendo a assimilação de nutrientes.

Os simbióticos são feitos a partir de uma mistura de probióticos e prebióticos e que de forma sinérgica beneficiam o hospedeiro e melhoram suas taxas de sobrevivência, modulando a comunidade microbiana no trato gastrointestinal e estimulando seletivamente o crescimento ou ativação do metabolismo de bactérias benéficas (LI et al. 2009).

A ação combinada das duas tecnologias pode trazer mais benefícios ao hospedeiro por meio de processos sinérgicos do que o uso de cada composto/micro-organismo isoladamente. No entanto, estudos para verificar possíveis relações de antagonismo do prebiótico que se deseja utilizar frente ao micro-organismo presente nos probióticos devem ser realizados previamente.

O uso de simbióticos ainda é bastante restrito em aquicultura, mas os efeitos positivos dos prebióticos e probióticos podem conduzir ao desenvolvimento de protocolos visando a administração combinada destes componentes.

Apesar de comparativamente novos na aquicultura, estes produtos funcionais (prebióticos, probióticos e simbióticos) vem ganhando popularidade junto aos produtores, principalmente por melhorar a saúde e o desempenho zootécnico dos camarões cultivados, e pela possibilidade de complementar, ou substituir, os compostos quimioterápicos.

O conhecimento sobre os produtos funcionais, seus mecanismos de ação e formas de aplicação, é imprescindível para a correta aplicação destas tecnologias emergentes. Sua correta aplicação pode melhorar a eficiência

produtiva do setor, e ainda mitigar as ameaças ao meio ambiente e à diversidade biológica.

Mecanismos de ação dos probióticos na carcinicultura.

Existem várias formas de atuação dos probióticos, dentre elas podemos destacar:

- **Exclusão competitiva de bactérias patogênicas:** a adesão e a colonização da superfície gastrointestinal pelas bactérias presentes nos probióticos se apresentam como mecanismos de defesa contra patógenos por meio da competição por locais de fixação, formando uma barreira física às bactérias patogênicas, conforme é ilustrado na Figura 9. Desta forma, uma expressiva fração das bactérias patogênicas seria reduzida pela simples competição por espaço. Outra maneira de exclusão da microbiota indesejável é pela escassez de nutrientes disponíveis no sistema digestivo, devido à competição com os micro-organismos presentes nos probióticos fixados. Nesta situação, os micro-organismos presentes no trato gastrointestinal são favorecidos em relação aos patógenos por estarem em maior concentração após a colonização digestiva nos camarões cultivados.
- **Alteração das condições ambientais do intestino:** o aumento da produção de ácidos orgânicos, como os ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiónico, acético, butírico, láctico) e o lactato, contribuem para a redução dos valores do pH, o que ocasiona condições desfavoráveis para os micro-organismos patogênicos.

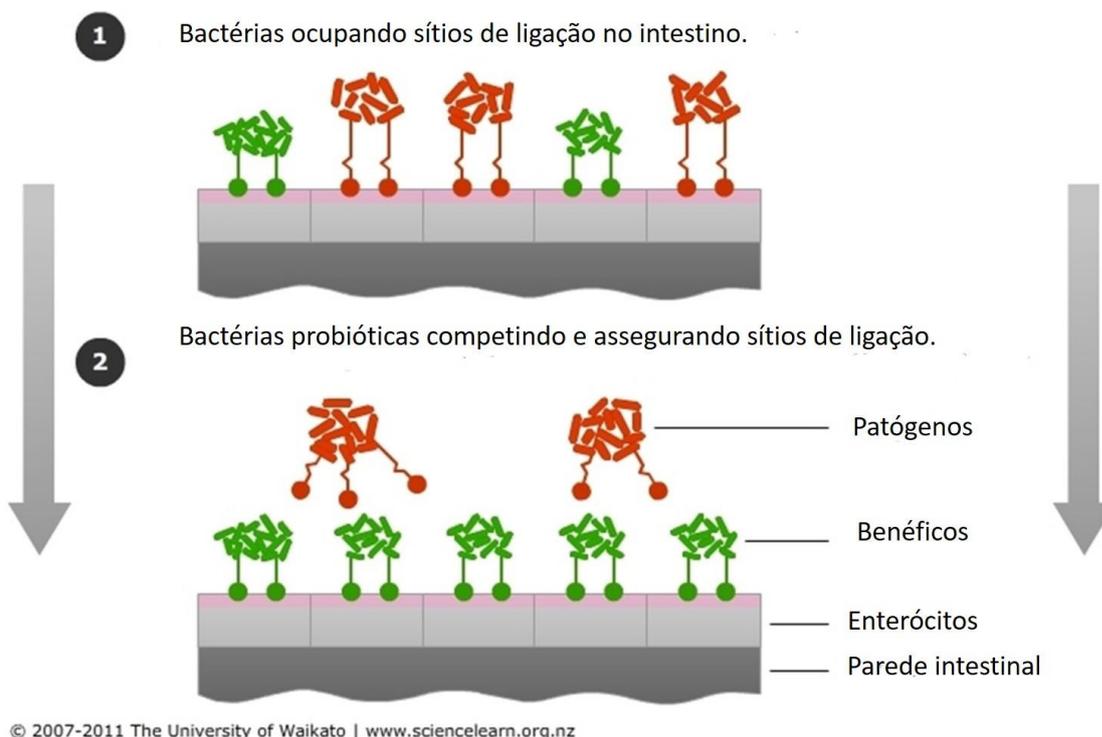


Figura 9: Esquema do mecanismo de exclusão competitiva promovido pelas células bacterianas dos probióticos, destacadas em verde, em relação as patogênicas em vermelho (Adaptado de <https://www.sciencelearn.org.nz/images/2271-bacterial-competition>).

- **Produção de compostos inibidores:** várias linhagens de bactérias probióticas são capazes de produzir compostos antimicrobianos (bacteriocinas, lactoferrina, lisozima, entre outros que podem ser visualizados no ANEXO II), os quais exibem atividade antibacteriana, especialmente em relação às bactérias patogênicas.
- **Inibição de *Quorum sensing*:** Muitas bactérias patogênicas possuem um mecanismo de virulência chamado de *Quorum sensing* (inclusive *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio harvey*). Este sistema se caracteriza pela comunicação intra e interespecies, e é realizado através da emissão de estímulos e de respostas que são dependentes da densidade populacional,

e permite a detecção da concentração de moléculas específicas determinantes para o comportamento dos micro-organismos e para a regulação da expressão gênica. Estas moléculas influenciam processos celulares de colonização de novos ambientes, de desenvolvimento de biofilmes, de produção de fatores de virulência, de produção de bacteriocinas, de formação de esporos, dentre outros. Muitas bactérias probióticas são capazes de atrapalhar esta comunicação celular (*quorum sensing*) e de regular as comunidades microbianas patogênicas nos sistemas de aquicultura. A ruptura do *quorum sensing* tem sido alvo de intensas pesquisas e desponta como uma nova estratégia para controle de patógenos em aquicultura.

- **Produção de enzimas digestivas:** alguns micro-organismos probióticos são capazes de produzir no intestino, enzimas microbianas digestivas, exógenas ao animal, que associada às enzimas que são naturalmente produzidas no intestino, otimizam a digestão de alimentos e promovem uma maior absorção de nutrientes. Nesse contexto, as enzimas como as proteases possuem um importante papel na promoção de uma maior absorção de aminoácidos, o que é fundamental para o crescimento do animal e aumento de sua massa corpórea. No intestino, os probióticos também podem ser capazes de sintetizar vitaminas e de otimizar a nutrição do animal.

- **Modulação da resposta imune intestinal:** a defesa imunológica do camarão tem relação com a microbiota intestinal. O organismo, simplesmente, não consegue sobreviver se não desenvolver uma microbiota

intestinal normal. Algumas bactérias dos probióticos estão diretamente relacionadas com o estímulo à resposta imunológica por meio do aumento da eficiência da modulação do sistema imune inato. Cabe destacar que, por não possuírem mecanismos de regulação imunológica secundária (memória imunológica), os crustáceos não possuem a capacidade de produzir anticorpos. Possuindo apenas o sistema imune do tipo inato, o qual é composto de hemócitos que atuam através da fagocitose, encapsulação e mediação da citotoxicidade. Assim para estes animais o alimento torna-se ainda mais importante, pois sua defesa imunológica é fortalecida por uma adequada e consistente alimentação.

- **Tratamento ambiental:** a administração de probióticos tem se mostrado eficiente para melhorar a qualidade no ambiente de cultivo através da redução das concentrações de matéria orgânica, de nitrogênio e de fósforo, além de inibir o crescimento de patógenos. Micro-organismos benéficos e maléficos existem naturalmente em todos os ambientes e podem ser estimulados bilateralmente resultando em ambientes saudáveis ou não. Nos sistemas produtivos existem micro-organismos patógenos e patógenos oportunistas, além de alguns grupos de decompositores anaeróbicos e aeróbicos que produzem gases nocivos ao sistema, como é o caso da Amônia (NH_3), dos Nitritos (NO_2), do Metano (CH_4) e dos Gases sulfídricos (H_2S). Alguns micro-organismos aeróbicos utilizados como probióticos, quando adicionados à água são eficientes na decomposição da matéria orgânica, degradando moléculas orgânicas totalmente na presença de oxigênio até formação de gás carbônico e água. Estes micro-organismos tem

o potencial de estimular a microbiota benéfica, presente no ambiente, suprimindo os micro-organismos nocivos ao sistema de cultivo. Ainda existe a degradação realizada por micro-organismos probióticos anaeróbicos que crescem na ausência de oxigênio, onde compostos orgânicos são transformados por um processo fermentativo que resulta na disponibilidade de compostos parcialmente oxidados, como por exemplo, os ácidos orgânicos e álcoois. Estes subprodutos da decomposição realizada pelos probióticos são responsáveis pelo controle das populações microbianas no fundo dos viveiros e pelo estímulo dos mais diferentes micro-organismos responsáveis pelos ciclos biológicos. Observe que este conceito é mais amplo do que a simples competição pelo espaço e por nutriente entre micro-organismos como ocorre no intestino dos hospedeiros, ele aborda o estabelecimento de um equilíbrio sustentável da biota de todo um sistema biológico.

É importante atentar a respeito das condições que os probióticos são utilizados em cada situação a fim de garantir o melhor desempenho do produto aplicado e que diferentes probióticos possam ser utilizados para atender às demandas específicas, desde que sejam compatíveis e que de forma geral, os probióticos devem possuir a capacidade de serem estocados com sua viabilidade mantida até o momento de uso. Devem ser capazes, ainda, de melhorar a qualidade da água, de colonizar o intestino do camarão, de não ser tóxico, de ser inócuo para o consumo humano e animal, de beneficiar o animal hospedeiro pelo seu uso, de auxiliar na digestão e absorção de nutrientes, de possuir ação

inibitória no crescimento de bactérias patogênicas e de estimular o sistema imunológico.

Desenvolvimento de produtos probióticos

As etapas para obtenção de um probiótico comercial envolvem desde a coleta de informações, isolamento e seleção de cepas microbianas, bem como estudos de características fisiológicas, das propriedades probióticas, da capacidade de inibição de patógenos, da ausência de patogenicidade e da avaliação de seus efeitos sobre o hospedeiro, além do estudo dos custos e da viabilidade econômica. Os produtos disponíveis no mercado devem estar registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como aditivo probiótico. Os micro-organismos devem ser linhagens puras, corretamente identificadas, seguras e não patogênicas à aquicultura ou ao homem, bem como, não resistentes a antibióticos e estarem em concentrações adequadas para atingir os resultados almejados.

ANEXO I: Bactérias utilizadas como probióticos na carcinicultura e suas ações.

Bactérias utilizadas como probióticos na carcinicultura e seu modo de ação			
Bacteria	Ação	Espécie de Camarão	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Aumento do crescimento	<i>L. vannamei</i>	FAR et al, 2009; LI et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al 2007a;2007b; TSENG et al, 2009
	Aumento na digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2009
	Aumento da sobrevivência	<i>L. vannamei</i>	FAR et al, 2009
	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	TSENG et al, 2009
<i>Bacillus sp.</i>	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	RENGPIPAT et al.,2000; Gullian 2004; LI et al 2009
	Aumento na resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>P. monodon</i>	RENGPIPAT et al.,1998,2000;
	Melhora na microbiota Intestinal	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2009 Gullian 2004; LI et al 2009
	Aumento da sobrevivência	<i>L. vannamei</i> <i>F. indicus</i>	WANG et al.,2005; ZIAEI-NEJAD et al, 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>L. vannamei</i>	WANG et al.,2005;
	Aumento na digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	LIN et al.,2004;
	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>F. indicus</i>	ZIAEI-NEJAD et al, 2006
	Aumento na atividade de enzimas digestivas	<i>F. indicus</i>	ZIAEI-NEJAD et al, 2006
<i>B. fusiformis</i>	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>L. vannamei</i> <i>F. indicus</i>	GUO et al, 2006
<i>Bacillus coagulans</i>	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>L. vannamei</i>	ZHUO et al, 2009
	Aumento na atividade de enzimas digestivas	<i>L. vannamei</i>	ZHUO et al, 2009
<i>Bacillus licheniformis</i>	Melhora na microbiota intestinal	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2007
	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2007
<i>Bacillus pumilus</i>	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>P. japonicus</i>	EL-SERSY et al, 2006
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al, 2008
	Aumento da sobrevivência	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al, 2008
	Aumento das defesas antioxidantes	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al, 2008

<i>Lactobacillus</i> <i>sp</i>	Aumento na resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	PERAZA-GOMES et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>P. monodon</i>	PHIANPHAK et al, 1999
	Aumento do crescimento	<i>P. monodon</i>	PHIANPHAK et al, 1999
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	CHIU et al, 2007
	Aumento da digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	BUGLIONE NETO et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	CHIU et al, 2007
<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	Aumento do crescimento	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
<i>Lactobacillus</i> <i>sporogenis</i>	Aumento do crescimento	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
<i>Arthobacter</i> <i>sp</i>	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2008
	Inibição in vitro de patógenos	<i>F. chinensis</i>	LI et al, 2006
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>F. chinensis</i>	LI et al, 2006
<i>Streptococcus</i> <i>sp</i>	Aumento do crescimento	<i>P. monodon</i>	DAS et al, 2006
<i>Micrococcus</i> <i>sp</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>M. rosenbergii</i>	JAYAPRAKASHI et al, 2005
<i>Vibrio</i> <i>fluvialis</i>	Aumento da sobrevivência	<i>P. japonicus</i>	EL-SERSY et al, 2006
<i>Vibrio</i> <i>alginolyticus</i>	Aumento na resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	RODRIGUEZ et al, 2007
	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	GULLIAN et al, 2004
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al, 2007a
<i>Roseobacter</i> <i>gallaeciensis</i>	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al, 2007b
<i>Pseudomonas</i> <i>aestumarina</i>	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al, 2007b
<i>Streptococcus</i> <i>phocae</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>P. monodon</i>	SWAIN et al, 2009
<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>P. monodon</i>	SWAIN et al, 2009

Fonte: Vieira, 2010.

ANEXO II: Metabólitos produzidos por bactérias benéficas presentes nos probióticos.

Metabólitos Produzidos Por Bactérias Benéficas Presentes Nos Probióticos	
Bactéria Benéfica	Metabólito Produzido
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Peróxido de Hidrogênio
	Acidofilina
	Lactocidina
	Acidolina
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lactonina
	Peróxido de Hidrogênio
<i>Streptococcus</i>	Nisina
	Diplococcina
	Peróxido de Hidrogênio

Fonte: Revista Eletrônica Nutritime, V.6, n1, Pag. 837-846, Jan/Fev – 2008.

Referências Bibliográficas

ABCC 2013. Levantamento da Infraestrutura Produtiva e dos Aspectos Tecnológicos, Econômicos, Sociais e Ambientais da Carcinicultura Marinha no Brasil em 2011 [Online] Disponível em: <http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2013/12/levantamento-da-infraestrutura-produtiva.pdf>.

Azevedo, R.V. De et al. 2015. Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile nile tilapia. *Revisa Ciência Agroômica* 46, pp. 72–79.

Brasil 2011. *Interministerial Normative Instruction, Nº 28, of June, 2011. Technical Standars for the Organic Aquaculture Production Systems to be followed by any individual person or legal entity responsible for production units under conversion or for organic produc.*

Costa, S.P. (2015). Microbiomas do solo de viveiros e do intestino do camarão *Litopenaues vannamei* relacionados ao uso de probióticos na carcinicultura. 2015. 129p. Tese. Universidade Federal do Ceará.

Cross, M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS immunology and medical microbiology* 34(4), pp. 245–53.

Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS immunology and medical microbiology* 48(2), pp. 149–58.

Garcia, F. J. P.; Massam. 2005. Elimination of antibiotics in hatcheries while improving production levels by use of probiotics. *World Aquiculture*.v. 35 n. 1, p. 57-59.

Gatesoupe, F.. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180(1-2), pp. 147–165.

Ibrahem, M.D. 2013. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. *Journal of Advanced Research* (2013), pp. 1–27.

Kesarcodi-Watson, A. et al. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274(1), pp. 1–14.

Li, J. et al. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 291(1-2), pp. 35–40.

Madigan, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

Maeda, M. et al. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* 358(Figure 1), pp. 285–290.

Merrifield, D.L. et al. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302(1-2), pp. 1–18.

Morelli, L. et al. 2003. Assessment of a new synbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strains and its effect on the indigenous flora. *Nutrition journal* 2, p. 11.

Moriarty, D.J.. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164(1-4), pp. 351–358.

Rengpipat, S. et al. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Diseases of aquatic organisms* 55(2), pp. 169–73.

Tacon, A.G.J. 1993. Aquaculture Feeds and Feeding in the Next Millennium : Major Challenges and Issues. *Tropical Feeds and Feeding Systems*, pp. 145–157.

Tendencia, E. a and de la Pena, L.D. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds {UR} {-://WOS:000167647700001}. *Aquaculture* 195, pp. 193–204.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 655–671.

Vieira, F. do N.. Seleção e Utilização de Bactérias Probióticas na Carcinicultura marinha. 2010. 133p. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina.

ANEXO III: Artigo da Revista da ABCC, 2017 – “Os Benefícios do Uso de Probióticos na Aquicultura”.

Artigo publicado na Revista da ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão), Ano XIX N°1 Junho 2017. Autores Dr. Alysson Lira Angelim e Dra. Samantha Pinheiro da Costa da empresa Biotrends Soluções Biotecnológicas LTDA, Fortaleza, Ceará.

Os Benefícios do Uso de Probióticos na Aquicultura

Dr. Alysson Lira Angelim¹; Dra. Samantha Pinheiro da Costa¹

¹ Biotrends Soluções Biotecnológicas LTDA, Fortaleza, Ceará.

www.biotrends.com.br

Email: alysson@biotrends.com.br

A aquicultura de camarão e peixes é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, consequência da crescente demanda mundial por esse tipo de alimento.

A intensificação dos sistemas produtivos para aumentar produtividade e atingir as métricas desejadas promove o surgimento de um ecossistema desequilibrado, muito diferente do ambiente natural de crescimento destes animais, o que favorece o surgimento de doenças. A implementação de boas práticas de manejo e de ações preventivas para mitigar danos são as principais estratégias para superar ou conviver com estes surtos.

A utilização de antimicrobianos sintéticos deve ser evitada, pois é considerada uma prática insustentável e ecologicamente inadequada, tendo em vista que o uso indiscriminado destes compostos promove a seleção de microorganismos resistentes a antibióticos e aumenta as chances de ocorrerem transferências horizontais de genes de resistência entre as populações microbianas.

Uma estratégia que tem chamado a atenção do setor da aquicultura é o desenvolvimento de produtos eficazes e ambientalmente amigáveis. A aplicação de probióticos no controle de bactérias e vírus patogênicos tem sido uma estratégia bastante utilizada e bem aceita, uma vez que os probióticos promovem diversos benefícios que melhoram os parâmetros zootécnicos e o ambiente de cultivo.

Probióticos como micro-organismos benéficos

Os probióticos são micro-organismos vivos que quando consumidos em quantidade adequada conferem um benefício para o hospedeiro. Existem diferentes definições de probióticos e alguns autores desconsideram a aplicação direta na água, no entanto, este conceito deve ser expandido quando se trata de animais aquáticos, devido a importância que um meio ambiente equilibrado tem sobre estes animais.

Assim, o conceito de probiótico em aquicultura apresenta-se como micro-organismos vivos que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, podendo ser capazes de modificar a microbiota (intestinal ou ambiental), melhorar a absorção dos alimentos ou seu valor nutricional, aumentar a resposta do hospedeiro em relação à doença, ou, ainda, melhorar a qualidade do seu ambiente de cultivo (Verschuere et al., 2000).

Na formulação de produtos probióticos, as linhagens de micro-organismos devem ser de ocorrência natural e não patogênicas, podendo ser originadas tanto da microbiota autóctone quanto exógena dos animais. Os produtos podem ser constituídos de espécies únicas ou associadas em consórcios, nos quais

utilizam várias espécies de micro-organismos com diferentes potenciais metabólicos. Os efeitos sinérgicos da utilização de consórcios microbianos despontam como uma ferramenta eficiente para aumentar o crescimento e otimizar a modulação do sistema imunológico dos animais frente a enfermidades.

Dentre as espécies microbianas presentes em produtos comerciais, as frequentemente utilizadas pertencem ao filo de bactéria Firmicutes, como as espécies ácido-láticas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus* e as bactérias gram-positivas formadoras de esporos, como as diferentes espécies de *Bacillus*. Algumas espécies de fungos também são utilizadas, como as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

Alguns produtos comerciais disponíveis são compostos exclusivamente de espécies de *Bacillus*, enquanto outros produtos possuem uma abordagem sinérgica de micro-organismos com metabolismos aeróbicos e anaeróbicos, combinando espécies diferentes de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Saccharomyces*, dentre outras, o que confere ao produto versatilidade para atuar em diferentes condições ambientais.

Mecanismos de ação dos probióticos

Os micro-organismos probióticos atuam modificando a composição das comunidades microbianas nos ambientes onde são inseridos. O efeito da aplicação de probióticos não está relacionado a um único mecanismo. Os efeitos benéficos estão relacionados a vários processos inter-relacionados ou dependentes. Nesse contexto, a ação dos probióticos pode ocorrer diretamente

no hospedeiro ou de forma indireta, através da melhoria da qualidade ambiental, ou mesmo da combinação de ambos. Eles podem influenciar a microbiota do hospedeiro, inibir patógenos, modular a imunidade do animal, contribuir com nutrientes e enzimas, aumentar o crescimento e melhorar a qualidade do solo e da água (**Figura 01**). Esta ampla perspectiva da ação probiótica é resultado da utilização de micro-organismos tanto na alimentação como na água e no solo.

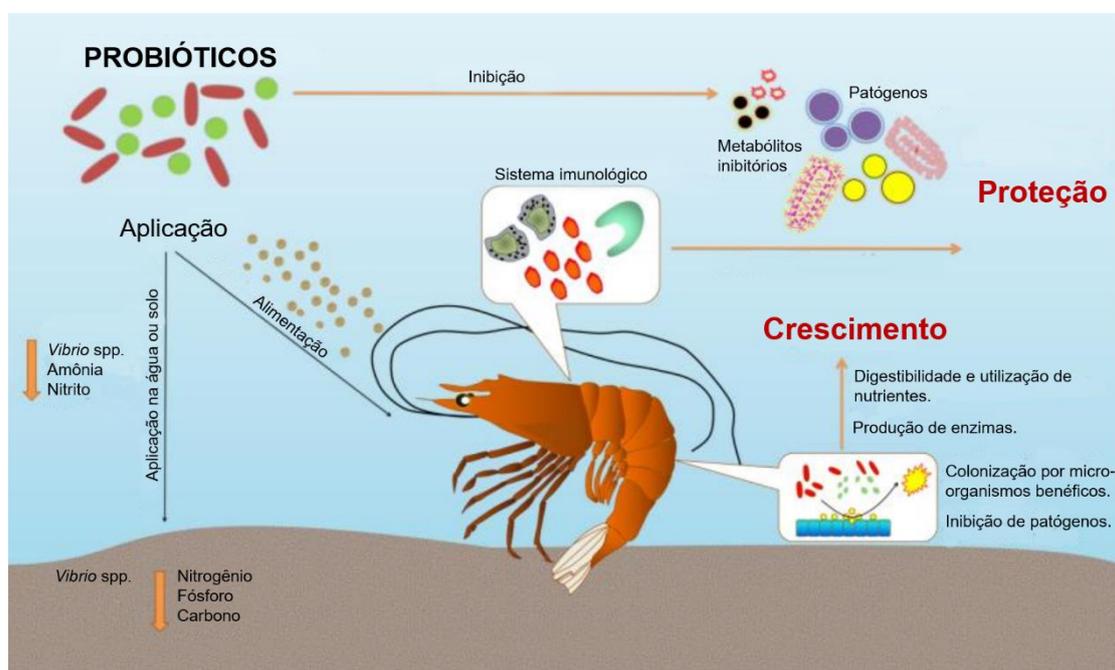


Figura 01. Mecanismos de ação dos probióticos no camarão e no meio ambiente. Fonte: Adaptado de Lazado et al., 2015.

Microbiota do hospedeiro

A microbiota do trato digestório de animais aquáticos bem como as comunidades ambientais são passíveis de modificação através da aplicação de probióticos. O equilíbrio da microbiota intestinal do animal é desafiado diariamente por micro-organismos invasores potenciais patogênicos oriundos do

meio ambiente. A manutenção dos micro-organismos probióticos benéficos no trato digestivo proporciona uma proteção adequada para prevenir a dominância de micro-organismos prejudiciais à saúde do animal.

Os probióticos são capazes de colonizar a mucosa intestinal, de regular o crescimento de patógenos, de melhorar a digestibilidade e absorção dos nutrientes e de modular o sistema imune. Dentre os mecanismos de exclusão competitiva de patógenos no intestino, destacam-se: (1) criação de um microambiente hostil às outras espécies de bactéria, através da produção de ácidos orgânicos e de outras moléculas que criam um ambiente seletivo; (2) ocupação dos sítios receptores por bactérias benéficas, o que dificulta a adesão e o estabelecimento de comunidades microbianas patogênicas no epitélio intestinal; (3) competição por nutrientes, causando indisponibilidade de nutrientes para os agentes patogênicos; (4) produção de substâncias que agem de forma antagonista ao mecanismo de comunicação celular (*quorum sensing*) e (5) produção de metabólitos antimicrobianos com efeitos bactericidas ou bacteriostáticos, usualmente peptídeos (bacteriocinas) ou enzimas com atividade bacteriolítica, que são ativos contra outros micro-organismos patogênicos.

Além das modificações nas comunidades microbianas do intestino do animal, é importante ressaltar que o uso de probióticos na água e na ração também promove efeitos benéficos através da modulação da microbiota externa do corpo, devido a adesão e colonização desses micro-organismos na superfície do animal.

Qualidade ambiental

Os parâmetros físico-químicos e a atividade biológica do solo e da água nos sistemas produtivos são cruciais para o sucesso de um cultivo. Eventuais problemas com infecções podem estar relacionados à baixa qualidade ambiental.

O princípio da aplicação de probióticos no ambiente consiste na introdução de micro-organismos benéficos no ecossistema para que estes possam se desenvolver, ocupar vários nichos ecológicos e otimizar as cascatas microbianas, de forma a favorecer o correto funcionamento dos ciclos biogeoquímicos, otimizando a ciclagem de resíduos orgânicos e de dejetos que contaminam a água e controlando o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos.

A vulnerabilidade a surtos de espécies patogênicas, como as espécies do gênero *Vibrio*, é um ponto que requer muita atenção. Os vibrios são bactérias presentes naturalmente em sistemas produtivos de camarão. Estes micro-organismos são nativos de ambientes marinhos e estuarinos, altamente adaptados a crescer em ambiente salinos e patógenos oportunistas. Apesar destas características, suas densidades populacionais permanecem controladas em condições normais de cultivo. Contudo em situações onde o ambiente apresenta quantidade excessiva de matéria orgânica e desequilíbrios nos parâmetros ambientais, ocorre um crescimento excessivo destes micro-organismos, ocasionando infecções nos animais (vibriose). Atualmente, especula-se que os surtos de espécies de vibrios sejam um dos principais

gatilhos para desenvolvimento do vírus da mancha branca, o qual ocasiona altos índices de mortalidade.

A utilização de probióticos consiste em uma estratégia apropriada e eficaz para o controle ambiental de patógenos. Os sistemas produtivos tratados com micro-organismos benéficos apresentam quantidades inferiores de agentes infecciosos, em especial os do gênero *Vibrio*, e limitada formação de compostos tóxicos como amônia, nitrito e sulfeto de hidrogênio, comparado a ambientes não tratados, onde ocorrem elevadas taxas de *Vibrio* spp. e excessiva produção de compostos tóxicos.

Dentre as espécies microbianas utilizadas como probióticos, os micro-organismos mais eficientes em depurar matéria orgânica e compostos tóxicos são os pertencentes ao gênero *Bacillus*, por serem aeróbicos e capazes de degradar completamente os compostos orgânicos utilizando o oxigênio e produzindo biomassa, CO₂ e água.

No que se refere aos compostos nitrogenados, a redução de amônia e nitrito é atribuída especialmente à capacidade das espécies de *Bacillus* de mineralizar estes resíduos via assimilação da amônia por degradação quimioheterotrófica de moléculas de carbono (açúcares). Estes compostos nitrogenados tóxicos, também podem ser metabolizados quando existem condições físico-químicas específicas, por bactérias quimiolitotróficas ambientais do ciclo do nitrogênio, como *Nitrosomonas* spp., *Nitrobacter* spp., etc.

Devaraja et al. (2013) utilizaram um consórcio de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* para tratamento de água e de solo em sistemas produtivos de camarão. Estes autores relataram que o consórcio composto pelos três *Bacillus* foi capaz de biorremediar o ambiente através da produção de protease, amilase e lipase, e de inibir o desenvolvimento de diferentes espécies do gênero *Vibrio*, sem afetar a sanidade do camarão. As bactérias do gênero *Bacillus* também foram capazes de reduzir amônia e nitrito, nitrato e fosfato.

Para se aproveitar ao máximo o potencial dos micro-organismos presentes em produtos probióticos, uma estratégia apropriada consiste em realizar sua correta ativação celular antes da aplicação, tendo em vista que a produção destes micro-organismos é realizada em biorreatores, sob condições ótimas de cultivo e que, posteriormente, eles são desidratados e incluídos em produtos secos. Nesta forma, alguns micro-organismos, como os *Bacillus*, apresentam-se geralmente na forma de estruturas de resistências (esporos), enquanto outros, como por exemplo, os *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Saccharomyces*, que não possuem a capacidade de esporular, permanecem em sua forma vegetativa.

Quando desidratados os micro-organismos tornam-se inativos e apenas serão metabolicamente ativados quando forem reidratados e encontrarem condições ambientais favoráveis, o que nem sempre ocorre no sistema produtivo.

No momento da aplicação, os micro-organismos probióticos sofrem inúmeros estresses devido à complexidade das condições físico-químicas e

biológicas do ambiente natural à qual são submetidos. As principais adversidades incluem a ausência de nutrientes essenciais, condições ambientais inadequadas para germinação dos esporos e/ou ativação de células vegetativas, flutuações ou extremos de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, toxicidade de poluentes, competições intra e interespecíficas entre os micro-organismos introduzidos e os autóctones, e predação dos micro-organismos por protozoários existentes na água.

Essas limitações relacionadas à introdução dos micro-organismos probióticos no sistema produtivo e sua posterior adaptação são pontos críticos para o estabelecimento destas comunidades e para a obtenção dos resultados almejados. Logo, faz-se essencial a utilização de micro-organismos capazes de sobreviver e serem ativos no meio ambiente.

Um correto processo de ativação, disponibilizando fonte de carbono, macro e micronutrientes essenciais, é uma alternativa adequada para entregar células metabolicamente ativas para atuar no ambiente. O processo de ativação realizado em condições de fazendas é bastante delicado e deve ser orientado pelo fabricante para não ocorrer descaracterização do produto, perda de diversidade e nem contaminações por micro-organismos indesejados.

Inibição de patógenos

O antagonismo microbiano é um fenômeno comum na natureza. As interações ecológicas desempenham um papel fundamental no equilíbrio entre os micro-organismos benéficos e os potencialmente patogênicos.

Os micro-organismos probióticos produzem uma variedade de moléculas de amplo espectro de atuação, incluindo bacteriocinas, lisozimas, enzimas diversas e peróxidos de hidrogénio no intestino do animal. Eles também são capazes de alterar o metabolismo da microbiota, de forma a produzir ácidos graxos de cadeia curta, alterar o pH intestinal e estimular o sistema imunológico, constituindo uma barreira contra a proliferação de patogênicos oportunistas.

O controle de comunidades patogênicas ocorre tanto em nível de intestino como na superfície dos animais. Patógenos capazes de proliferar na parte externa do animal são controlados por bactérias que limitam sua proliferação.

As diferentes espécies de bactérias ácido-lácticas presentes em produtos probióticos como, por exemplo, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Pediococcus acidilactici*, despontam como potenciais candidatas para produção de peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas).

Nos últimos anos, vários estudos têm relatado a produção dessas moléculas também por bactérias do gênero *Bacillus*, como por exemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, dentre outros.

Um dos mecanismos de virulência envolvido na atuação de muitas bactérias patogênicas, incluindo *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio harveyi*, é o sistema *Quorum sensing*, o qual se caracteriza pela comunicação intra e interespecies, realizada através da emissão de estímulos e de respostas dependentes da densidade populacional. Estas interações permitem a detecção da concentração de moléculas específicas determinantes para o comportamento

dos micro-organismos e para a regulação da expressão gênica. Estas moléculas influenciam processos celulares de colonização de novos ambientes, de desenvolvimento de biofilmes, de produção de fatores de virulência, de produção de bacteriocinas, de formação de esporos, dentre outros.

Muitas bactérias probióticas são capazes de atrapalhar a comunicação celular do *quorum sensing* e, assim, regular as comunidades microbianas patogênicas nos sistemas de aquicultura. Intensas pesquisas estão sendo realizadas para descobrir e melhor compreender como os micro-organismos são capazes de produzir compostos que atuam inibindo estes sinais de comunicação.

A ruptura do *quorum sensing* desponta como uma nova estratégia anti-infecciosa na aquicultura e como uma nova geração de agentes antimicrobianos.

Crescimento e absorção de nutrientes

A utilização de probióticos na aquicultura via alimentação influencia positivamente o crescimento dos animais através do ganho de peso e do aumento do comprimento corporal. Os dois principais mecanismos envolvidos para ocorrer esses benefícios são o aumento do apetite e a melhor digestibilidade dos alimentos.

Os probióticos quando presentes no intestino podem otimizar a utilização de nutrientes e minerais. Os parâmetros que influenciam a condição nutricional são dependentes da qualidade da ração, da fisiologia digestiva e do estado de saúde do animal.

Os micro-organismos probióticos influenciam diretamente a fisiologia enzimática do intestino através da produção de enzimas digestivas, dentre elas proteases, lipases, amilases, celulasas, capazes de atuar na quebra de moléculas complexas em estruturas mais simples e fáceis de absorver pelo hospedeiro. Esta atividade enzimática pode ocorrer pela estimulação da produção de enzimas endógenas ou pela contribuição das enzimas exógenas produzidas pelos micro-organismos administrados.

A atuação enzimática da microbiota probiótica contribui para um melhor coeficiente de digestibilidade de matéria seca, proteína bruta, lipídeos, fósforo, aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais e ácidos graxos, o que influencia diretamente em melhores fatores de conversão alimentar.

A proteína presente na alimentação é considerada um nutriente determinante para o ganho de massa corpórea e para o crescimento dos animais. Desta forma, o uso de linhagens probióticas produtoras de proteases é considerado um excelente recurso para aumentar a atividade proteolítica no intestino do hospedeiro, facilitar a digestão de proteínas e absorção de aminoácidos.

Modulação da resposta imune

A aplicação de probióticos na alimentação pode modular o sistema imune de animais aquáticos. É sabido que o camarão depende do sistema imune não específico para combater organismos patogênicos e tem sido observado que este sistema pode ser estimulado por probióticos.

O mecanismo pelo qual os probióticos estimulam a imunidade do camarão ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que a utilização de probióticos influencia a defesa celular do camarão promovendo o aumento no número de hemócitos, de espécies reativas de oxigênio, da atividade da fenoloxidase e da fagocitose hemocítica. O processo de ativação e transcrição de vários genes relacionados com imunidade também é modulado por tratamentos com probióticos.

Dentre os micro-organismos utilizados, podemos citar os efeitos da utilização de *Lactobacillus plantarum* para aumentar as respostas imunes e a expressão gênica na espécie de *Litopenaeus vannamei*. Chiu et al., 2007 demonstraram que a utilização de *L. plantarum* na alimentação influenciou as defesas imunológicas celulares e aumentou as atividades de fenoloxidase, profenoloxidase, superóxido dismutase e a eficiência na supressão de *Vibrio alginolyticus*. A utilização de *L. plantarum* também aumentou a transcrição de mRNA de peroxinectina e a taxa de sobrevivência dos animais após o desafio com *V. alginolyticus*.

É importante ressaltar que o tratamento com probióticos não só aumenta as defesas antioxidantes do camarão, mas também pode aliviar o estresse oxidativo induzido pela exposição a patógenos. Estas defesas imunitárias estimuladas pelos probióticos desempenham um papel crucial nas respostas e eventual proteção durante a exposição a patógenos.

Desenvolvimento de produtos probióticos

O desenvolvimento de um produto probiótico é um processo de múltiplas etapas focadas em segurança, funcionalidade e características tecnológicas. As etapas para obtenção de um probiótico comercial envolvem desde a coleta de informações, isolamento e seleção de cepas microbianas, bem como estudos das características fisiológicas, das propriedades probióticas, da capacidade de inibição de patógenos, da ausência de patogenicidade e da avaliação de seus efeitos sobre o hospedeiro, além do estudo dos custos e da viabilidade econômica.

Os produtos disponíveis no mercado devem estar registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como aditivo probiótico. Os micro-organismos devem ser linhagens puras, corretamente identificadas, seguras e não patogênicas à aquicultura e ao homem, não resistentes a antibióticos e estarem em concentrações adequadas para atingir os resultados almejados.

A aquicultura atualmente desenvolve-se focada em um gerenciamento de cultivo mais proativo do que reativo. Nesse contexto, o uso de probióticos e seus benefícios têm se demonstrado como uma promissora ferramenta profilática para a gestão da saúde dos animais, da qualidade ambiental e da sustentabilidade da atividade econômica.

Referências bibliográficas

Chiu, C. H., Y. K. Guu, C. H. Liu, T. M. Pan, and W. Cheng, 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23 (2): 364–377.

Devaraja, T., S. Banerjee, Y. M. Sariff, and H. Khatoon, 2013. A holistic approach for selection of *Bacillus* sp. as a bioremediator for shrimp post larvae culture. *Turk. J. Biol.*, 37: 92–100.

Lazado, Carlo Cabacang; Lacsamana, Jermaine I.; Caipang, Christopher M.A. Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines*. ed. / Christopher Marlowe A. Caipang; Mary Beth I. Bacano-Maningas; Fernand F. Fagutao. Kerala: Research Signpost, 2015. p. 89-114.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete, 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655–671.

Vikash Kumar, Suvra Roy, Dharmendra Kumar Meena & Uttam Kumar Sarkar, 2016. Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24:4, 342-368, DOI: 10.1080/23308249.2016.1193841.