

MARIA GABRIELA PADILHA FERREIRA

**EFEITO DE PROBIÓTICO COMERCIAL SOBRE O DESEMPENHO DE PÓS-
LARVAS DE *Litopenaeus vannamei* EM SISTEMA DE BIOFLOCO E SUA
INFLUÊNCIA SOBRE AS COMUNIDADES BACTERIANA E FITOPLANCTÔNICA**

RECIFE, PE

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**EFEITO DE PROBIÓTICO COMERCIAL SOBRE O DESEMPENHO DE PÓS-
LARVAS DE *Litopenaeus vannamei* EM SISTEMA DE BIOFLOCO E SUA
INFLUÊNCIA SOBRE AS COMUNIDADES BACTERIANA E FITOPLANCTÔNICA**

Maria Gabriela Padilha Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia
Orientador

RECIFE, PE
Fevereiro de 2012

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

F383e Ferreira, Maria Gabriela Padilha

Efeito de probiótico comercial sobre o desempenho de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* em sistema de biofloco e sua influência sobre as comunidades bacteriana e fitoplanctônica / Maria Gabriela Padilha Ferreira. – Recife, 2012.

69 f.: il.

Orientador: Eudes de Souza Correia.

Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2012.

Referências

1. Probiótico 2. *Litopenaeus vannamei* 3. Fase berçário 4. Sistema intensivo 5. Biofloco I. Correia, Eudes de Souza, orientador II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**EFEITO DE PROBIÓTICO COMERCIAL SOBRE O DESEMPENHO DE PÓS-
LARVAS DE *Litopenaeus vannamei* EM SISTEMA DE BIOFLOCO E SUA
INFLUÊNCIA SOBRE AS COMUNIDADES BACTERIANA E FITOPLANCTÔNICA**

Maria Gabriela Padilha Ferreira

Dissertação julgada adequada para obtenção do
título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
27/02/2012 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. EUDES DE SOUZA CORREIA

(Orientador)

Departamento de Pesca e Aquicultura – DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. MANUEL DE JESUS FLORES MONTES

(Membro titular externo)

Departamento de Oceanografia
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dr^a. ROBERTA BORDA SOARES

(Membro titular interno)

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. RONALDO OLIVERA CAVALLI

(Membro titular interno)

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. SÍLVIO RICARDO MAURANO PEIXOTO

(Membro suplente interno)

Departamento de Pesca e Aquicultura - DEPAq
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

*Dedico este trabalho primeiramente à Deus;
Aos meus grandes amores, Dayan e Isabela;
Aos meus super pais Cloves e Carminha;
À minha linda irmã e cunhado Dani e Gleydson;
E enfim, às minhas queridas tia e avó, Socorro e Maria José*

Agradecimentos

Agradeço à Deus pelas alegrias e conquistas obtidas no decorrer desses dois anos e pela força e coragem para enfrentar os desafios e para seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis;

À minha querida família por todo incentivo, palavras de ânimo e sabedoria, incansáveis cuidados com a minha filhota Isabela na minha ausência e pelo amor incondicional em todos os momentos da vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eudes de Souza Correia pela amizade, confiança, pelo aceite na orientação, por acreditar no meu potencial e, principalmente, pelos seus sábios ensinamentos que levarei comigo pelo resto da vida. Ao senhor, professor, minha eterna gratidão;

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto;

A todos os professores do PPG-RPAq da UFRPE, especialmente ao Prof. Dr. William Severi, à Prof^a. Dr^a. Emiko S. Mendes, ao Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes e ao Prof. Dr. Alfredo Galvez pelas suas significativas contribuições nas análises de água, bacteriológicas, estatística e no fornecimento das microalgas, respectivamente;

Aos grandes amigos do LAPAQ Fabiana Penalva e João Paulo Lima, pelas sugestões, grande ajuda no experimento e na estatística e pelas muitas risadas que demos juntos. Aprendi muito com vocês! Aos grandes amigos e colegas que pertencem e que pertenceram ao LAPAQ nas pessoas de Marcony Vasconcelos, Rivaldo Siqueira, Thales Veríssimo, Renato Araújo, Eduardo Lima, Marcela Vasconcelos, Albérico Camello, Cláudio Bittencourt e Cecília Cruz, cuja ajuda foi essencial para a realização deste experimento desde a manutenção dos tanques até as análises laboratoriais. Às mestrandas Bruna Carvalho e Xélen Wambach e aos graduandos e estagiários Felipe Santos, Rodolfo Ferreira, Rafael Liano e Reginaldo Carneiro pelo apoio, amizade e agradável convivência;

Aos funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura (DEPAq) e da Estação de Aquicultura da UFRPE pela atenção e ajuda sempre quando foi preciso;

E a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte da minha vida e me ajudaram no decorrer do mestrado. **Muito Obrigada!**

Resumo

A adição de probióticos nas fazendas de camarão tem aumentado como alternativa ao uso de antibióticos e devido à demanda por uma aquicultura mais sustentável. Eles tem melhorado o desempenho e a saúde do hospedeiro e a qualidade da água e do solo, atuando como agentes de biocontrole e biorremediação nos sistemas de cultivo. O presente estudo investigou os efeitos de diferentes concentrações de um probiótico comercial na qualidade da água, desempenho zootécnico, comunidade bacteriana e fitoplanctônica no cultivo berçário do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema intensivo com bioflocos. O experimento teve a duração de 61 dias. Os tanques foram estocados com pós-larvas (PL₁₀) a uma densidade de 2100 PL/m³ e peso médio inicial de 2 mg. Os tratamentos consistiram de quatro diferentes concentrações de probiótico e um controle, com quatro repetições cada: 1) P0.5 (0,5 g/m³ – 2,5 x 10⁷ UFC/L); 2) P1.0 (1 g/m³ – 5 x 10⁷ UFC/L); 3) P2.0 (2 g/m³ – 10⁸ UFC/L); 4) P3.0 (3 g/m³ – 1,5 x 10⁸ UFC/L); e 5) CTL (controle - sem probiótico). O probiótico comercial foi composto por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Os camarões apresentaram médias de peso final variando de 465 a 625 mg, sobrevivência de 68,8 a 89,9%, taxa de crescimento específico de 8,9 a 9,4%/dia, rendimento de 1,01 a 1,21 Kg/m³ e fator de conversão alimentar de 1,2 a 1,6. A aplicação do probiótico não interferiu em nenhuma dessas variáveis e também não influenciou a qualidade da água, a composição fitoplanctônica e bacteriana, onde não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (P≥0,05), com exceção para as bactérias autotróficas (P<0,05). As bactérias naturalmente presentes no biofoco revelaram contribuir melhor para manter o equilíbrio das variáveis de cultivo que o probiótico testado.

Palavras-chave: Probiótico, *Litopenaeus vannamei*, Berçário, Sistema intensivo, Biofoco.

Abstract

The addition of probiotics in shrimp farms has increased as alternative to use of antibiotics and because the demand for more environment-friendly aquaculture. They have been found to improve host performance and health and water and soil qualities, acting as biocontrol and bioremediation agents in the culture systems. The present study investigated the probiotic effects in water quality, shrimp performance, phytoplankton and bacterial community in intensive nursery system with biofloc for the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Tanks were stocked with post-larvae (PL₁₀) at a density of 2100 PL m⁻³ and initial weight of 2 mg. Commercial probiotic consisted of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Treatments consisted of four different concentrations of probiotic: 1) P0.5 (0,5 g/m³ – 2,5 x 10⁷ UFC/L); 2) P1.0 (1 g/m³ – 5 x 10⁷ UFC/L); 3) P2.0 (2 g/m³ – 10⁸ UFC/L); 4) P3.0 (3 g/m³ – 1,5 x 10⁸ UFC/L); and 5) CTL (control - without probiotic). Shrimps presented final weight ranging from 465 to 625 mg, survival from 68.8 to 89.9%, specific growth rate from 8.9 to 9.4% / day, yield from 1.01 to 1.21 kg m⁻³ and feed conversion rate of 1.2 to 1.6. However, the application of the probiotic did not interfere any of these variables and also did not affect water quality, the composition of phytoplankton and bacteria, without showing significant differences between treatments (P≥0.05), except for autotrophic bacteria (P<0.05). Bacteria naturally present in biofloc showed to be sufficient to maintain the culture system balance.

Keywords: Probiotic, *Litopenaeus vannamei*, Nursery phase, Intensive system, Biofloc.

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Variação temporal do nitrogênio da amônia total – TAN (a), nitrogênio do nitrito – NO ₂ -N (b), sólidos sedimentáveis (c) e nitrogênio do nitrato – NO ₃ -N (d) nos 61 dias de cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	56
Figura 2. Variação semanal de vibrio (a), bactérias heterotróficas (b) e bactérias autotróficas (c) nos 61 dias de cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	56
Figura 3. Sucessão dos grupos fitoplancctônicos, (a) Bacillariophyta, (b) Cianophyta, (c) Chlorophyta, (d) Haptophyta, (e) Pirrophyta e (f) Euglenophyta no cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	57

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Valores médios (\pm erro padrão) das variáveis semanais de qualidade de água no cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	58
Tabela 2- Valores médios (\pm erro padrão) das variáveis semanais de qualidade de água no cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	59
Tabela 3- Desempenho de crescimento (média \pm erro padrão) de <i>L. vannamei</i> nos 61 dias de cultivo intensivo com biofloco e probiótico comercial	60
Tabela 4 - Ocorrência de bactérias (média \pm erro padrão e amplitude) nos 61 dias de cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	60
Tabela 5 - Densidade média (cél/mL) e Frequência de ocorrência (%) do fitoplâncton nos 61 dias de cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> com biofloco e probiótico comercial	61

Sumário

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO - Effect of commercial probiotic on performance of <i>Litopenaeus vannamei</i> post-larvae in biofloc system and its influence on bacterial and phytoplanktonic communities	27
4.1 Introdução	29
4.2 Material e Métodos	32
4.3 Resultados	36
4.4 Discussão	40
4.5 Conclusão	44
4.6 Agradecimentos	45
4.7 Referências	45
5 ANEXO - Normas da Revista Aquaculture International	62

1 Introdução

A aquicultura mundial vem crescendo rapidamente, superando até mesmo os outros setores da produção de alimentos de origem animal e, dessa forma, vem respondendo à crescente demanda global por peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos (FAO, 2010). A produção mundial em 2008 aumentou para 52,5 milhões de toneladas, com uma taxa de crescimento médio anual de 8,3% entre os anos de 1970 e 2008, sendo os crustáceos o terceiro maior item produzido (5 milhões de toneladas), com destaque para *Litopenaeus vannamei* pela China (FAO, 2010).

Com relação à aquicultura brasileira, estudos mais recentes do Ministério da Pesca e Aquicultura relatam que a carcinicultura é a atividade mais expressiva, apresentando uma produção de 65.188 toneladas em 2009. Tais estudos afirmam ainda que a maior produção está voltada para o cultivo de camarões marinhos, estando mais concentrada na região Nordeste (principalmente no Rio Grande do Norte e Ceará), com o Estado de Pernambuco (3.518 toneladas) ocupando o quarto lugar da região (MPA, 2008-2009).

A aquicultura visa o cultivo de organismos aquáticos que forneça a maior eficiência na produção e rentabilidade quanto possível, usando para isto, altas densidades de estocagem, rações de alta qualidade e manejo constante da qualidade de água (EBELING et al., 2006). No intuito de melhorar o rendimento do cultivo e incrementar as taxas de sobrevivência, vem sendo incentivado o uso de berçários e o aprimoramento de técnicas para uma maior adaptação do camarão ao sistema de cultivo. A fase de berçário é definida como uma fase intermediária entre o estágio pós-larval e a fase de engorda, onde as pós-larvas são estocadas em tanques de transição até atingirem tamanho ideal, e então, serem transferidas para viveiros de crescimento (SAMOCHA e LAWRENCE, 1992). A incorporação dessa fase na produção do camarão inclui o aumento da sobrevivência, melhoramento da eficiência alimentar, aumento do desempenho do crescimento e minimização dos riscos de introdução à doenças

(SAMOCHA et al., 2000). O uso da fase de berçário é mais comum para atender os sistemas de cultivo semi-intensivo a super-intensivo, os quais se caracterizam por apresentar altas densidades de estocagem, tecnologia avançada e produção superior a 30.000 kg/ha/ano (SAMOCHA e LAWRENCE, 1992).

Para promover a sustentabilidade ambiental da aquicultura, novas estratégias de produção foram desenvolvidas a fim de utilizar limitada ou nenhuma troca de água, visando principalmente, a redução do uso e desperdício de água e a minimização do impacto causado pela descarga dos nutrientes (WASIELESKY Jr. et al., 2006). Segundo Burford et al. (2003, 2004), tais nutrientes, que antes eram descartados, passam a ser reutilizados pelos microrganismos e fitoplâncton e servir como combustível para a formação do bioflocos, sendo essas comunidades as grandes responsáveis pelo aumento da viabilidade desse sistema de cultivo (MISHRA et al., 2008). Outra estratégia que vem sendo bastante empregada é o cultivo de bactérias com potencial efeito probiótico, como por exemplo, bactérias não patogênicas do gênero *Bacillus*, que são as mais utilizadas (BROWDY et al., 2001). Os benefícios do uso de probióticos nos sistemas de cultivo tem sido relatado principalmente por substituir a aplicação de antibióticos (cujo uso indiscriminado aumenta a resistência microbiana) e controlar o aparecimento de patógenos e o surgimento de doenças, colaborando para o aumento da produção pela presença de animais mais saudáveis e evitando também as trocas de água.

Nesses sistemas em que não são realizadas trocas de água, o alto nível de amônia excretada pelos animais e oriunda da decomposição das rações, precisa ser controlada por meio do ajuste da relação Carbono:Nitrogênio devido à sua toxicidade quando em excesso (EBELING et al., 2006). A fertilização do sistema com fontes ricas em carbono orgânico, como por exemplo, o melaço sob aeração constante, pode otimizar a relação C:N e estimular a formação de uma biota predominantemente aeróbica e heterotrófica dominante sobre a

autotrófica (AVNIMELECH, 1999; SCHNEIDER et al., 2006; SAMOCHA et al., 2007). A grande vantagem é que os microrganismos heterotróficos possuem uma alta taxa de crescimento, são mais estáveis e conseguem assimilar rapidamente a amônia e o nitrito e, além disso, ainda reciclam os nutrientes e os resíduos e servem como recurso protéico adicional para o camarão (AVNIMELECH, 2009).

A necessidade do controle de doenças e da sustentabilidade do ambiente de cultivo e do seu entorno, tem incentivado a aplicação de tecnologias que reduzam a introdução e o lançamento de água e resíduos potencialmente contaminados e que selecionem a composição microbiana do sistema, visando melhor estado de saúde, sobrevivência e produção dos animais cultivados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* na fase de berçário, cultivado com diferentes concentrações de probiótico em sistema de cultivo intensivo utilizando a tecnologia do bioflocos. Também foi analisada a influência dos níveis de probiótico sobre a qualidade da água, o fitoplâncton e a comunidade bacteriana no ambiente de cultivo.

2 Revisão de literatura

Os probióticos vêm emergindo como suplemento alimentar microbiano muito eficaz no campo da profilaxia (GÓMEZ et al., 2007). Salminen et al. (1999) definiram probiótico como preparações de células microbianas ou parte delas não necessariamente restritas ao uso em alimentos, que possuem efeito benéfico na saúde e no bem estar do hospedeiro. O seu uso em animais terrestres e no ser humano vem sendo, inclusive, aprovado pela FAO/WHO (2001), a qual afirma que, quando consumidos em quantidades adequadas, esses microrganismos vivos conferem benefícios para a saúde. Contudo, esses conceitos foram desenvolvidos para animais terrestres, dos quais os animais aquáticos são muito diferentes (GATESOUBE, 1999).

Animais aquáticos possuem uma estreita relação com o seu ambiente e, para o uso de probióticos nesses animais, é importante entender que os fatores atuam de formas diferentes entre as espécies aquáticas e as terrestres (KESARCODI-WATSON et al., 2008). O ar serve apenas como meio de transporte, diferentemente da água que funciona como um meio para transporte e crescimento de microrganismos (HANSEN e OLAFSEN, 1999), possuindo o meio aquático muito mais influência no estado de saúde do animal, com microrganismos e hospedeiros compartilhando o mesmo ambiente (VERSCHUERE et al., 2000).

Em animais aquáticos, os microrganismos oriundos do ambiente externo e da alimentação podem mudar rapidamente sua microbiota intestinal devido ao contínuo fluxo de água pelo corpo, necessário para manter o processo de osmorregulação (GATESOUBE, 1999). A alteração das condições normais do ambiente como, por exemplo, oscilações na salinidade (RINGO e STROM, 1994), na temperatura, na concentração de oxigênio, no pH e no equilíbrio osmótico, além da presença de vários poluentes (GRIFFITHS, 1991) e de forças químicas ou abrasivas na superfície epitelial do animal, podem enfraquecer as defesas e permitir a colonização, penetração e invasão de bactérias patogênicas oportunistas nos tecidos

hospedeiros (HANSEN e OLAFSEN, 1999). Os mesmos autores relatam que essas bactérias fazem parte da microflora normal da água do mar e não necessitam obrigatoriamente do hospedeiro para se proliferar.

Sung et al. (2001) demonstraram uma grande relação entre a incidência de doenças e a composição de *Vibrio* na água de cultivo e no hepatopâncreas de *Penaeus monodon* e afirmaram que, para a vibriose ocorrer, é necessário existirem fatores ambientais estressantes que irão influenciar no decréscimo da diversidade microbiana e no aumento do número de espécies patogênicas. Além disso, o camarão deve estar suscetível ao patógeno. Sendo assim, microrganismos no meio aquático podem estabelecer ou não algum tipo de associação com o hospedeiro, estando ativos tanto na pele, brânquias e trato gastrointestinal quanto no próprio ambiente (VERSCHUERE et al., 2000).

Com base nessa estreita relação, a definição de probiótico para ambientes aquáticos precisou ser modificada (KESARCODI-WATSON et al., 2008) e sua atuação vem sendo cada vez mais estudada (AJITHA et al., 2004). Na área da aquicultura, a definição foi ampliada para incluir a adição das bactérias provenientes do intestino do hospedeiro (GUZMÁN, 1992) ou encontradas naturalmente em tanques e reservatórios, servindo como suplementos alimentares para os animais cultivados e como aditivos na qualidade da água e do sedimento por modificar a comunidade microbiana local (MORIARTY, 1998, 1999). Várias outras definições podem ser encontradas em Gatesoupe (1999), Irianto e Austin (2002), Ajitha et al. (2004) e Balcázar et al. (2006), entre outros.

Efeitos adicionais do probiótico também podem ser considerados de interesse para a aquicultura, como a mudança na qualidade da água e a interação com o fitoplâncton (VERSCHUERE et al., 2000). Das et al. (2006), Wang (2007) e Qi et al. (2009) correlacionam a melhoria dos parâmetros de água, como elevação do pH, redução dos níveis de amônia e nitrito e aumento dos níveis de nitrato, fosfato e silicato, com a atuação de

diversos probióticos. Com relação à comunidade fitoplanctônica, Kesarcodi-Watson et al. (2008) acreditam que ela é capaz de produzir substâncias tóxicas a outras bactérias e que podem potencialmente atuar de maneira benéfica, agindo contra patógenos. Sendo assim, os probióticos podem ser muito úteis para a produção de microalgas, estimulando o seu crescimento (FUKAMI et al., 1997; SUMINTO HIRAYAMA, 1997).

Gomez-Gil et al. (2002) encontraram um probiótico bacteriano para camarão (codificado como C7b e identificado como *Vibrio alginolyticus*), o qual foi cultivado simultaneamente com a microalga *Chaetoceros muelleri* (muito usada como alimento de estágios larvais de peneídeos), sem lhe causar danos e melhorando o seu crescimento. Da mesma forma, Avendaño e Riquelme (1999) verificaram que quatro linhagens de bactérias probióticas não afetaram o crescimento da microalga *Isochrysis galbana* quando cultivadas juntas, pelo contrário, melhoraram a ingestão das bactérias (através da microalga) pelas larvas do molusco bivalve *Argopecten purpuratus* e promoveram inibição de patógenos.

Os modos de ação dos probióticos ainda precisam ser melhor explicados, contudo o seu uso vem sendo visto como uma alternativa ao tratamento com antibióticos (WANG et al., 2008). Dentre os seus benefícios podem ser citados: Produção de compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos (ex.: a produção de antibióticos naturais - bacteriocinas, de moléculas que captam ferro em ambientes com deficiência deste - sideróforos, de enzimas que quebram a parede bacteriana - lisozimas, de proteases, de peróxido de hidrogênio e de ácidos orgânicos); competição por espaço, nutrientes ou oxigênio; aumento da resposta imune; melhoria da qualidade da água; interação com o fitoplâncton; fonte de macro e micronutrientes; contribuição enzimática para a digestão (ex.: carboidrases, fosfatases, esterases, lipases e peptidases); inibição de microrganismos patogênicos; atividade antimutagênica e anticarcinogênica; fatores de promoção de crescimento (RENGPIPAT et al., 1998; VERSCHUERE et al., 2000; IRIANTO e AUSTIN,

2002; RAMIREZ e DIXON, 2003; AJITHA et al., 2004; WANG et al., 2005; BALCÁZAR et al., 2006; WANG, 2007; CASTEX et al., 2008; WANG e HE, 2009; SUGITA et al., 2011).

Diversos microrganismos vem sendo testados como probióticos. Recentes pesquisas usaram *Bacillus pumilus* na ração (10^6 e 10^{12} cél/kg) em combinação com um probiótico comercial (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces* e *Aspergillus oryzae* - 10^{11} cél/kg) para melhorar o crescimento, a sobrevivência e a resistência a doenças em *Oreochromis niloticus*, aumentando a imunidade e o estado de saúde do animal (ALY et al., 2008). Em outro estudo foi demonstrada a redução das concentrações de nitrogênio e fósforo e o aumento da qualidade da água e da produção do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado com adição de probióticos comerciais (nas concentrações de 10, 3 e 5 mg/L) contendo *Bacillus* sp., bactérias fotossintéticas, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. e *Nitrobacter* sp. (WANG et al., 2005). Microrganismos muito encontrados em ambientes aquáticos como *Pseudomonas* I-2 também tem sido alvo de estudos probióticos por inibir todas as cinco espécies de v́brios testadas *in vitro* e *in vivo* (*V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*) por meio da produção de algum componente extracelular anti-v́brio (CHYTHANYA et al., 2002).

Na China e em vários outros países, os probióticos mais usados na aquicultura são principalmente: 1- Bactérias fotossintéticas (estimulam o crescimento e aumentam a taxa de sobrevivência). Ex.: Filos Chlorobi, Cyanobacteria, Chloroflexi, Firmicutes e Proteobacteria; 2- Bactérias antagonistas (bactérias que promovem equilíbrio entre microrganismos benéficos e potencialmente patogênicos). Ex.: *Pseudoalteromonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Alteromonas* sp, *Phaeobacter* sp, *Bacillus* sp; 3- Microrganismos que contribuem de forma nutricional e enzimática para a digestão. Ex.: bactérias ácido lácticas, como os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium*, leveduras, entre outros; 4- Bactérias que melhoram a qualidade da água. Ex.: bactérias nitrificantes e desnitrificantes; 5- *Bdellovibrio* (bactérias Gram-negativas que atacam

outras células Gram-negativas) e 6- Probióticos comerciais (QI et al., 2009). Uma das principais bactérias probióticas registradas no cultivo de camarão tem sido linhagens de *Bacillus* (MORIARTY, 1998; RENGPIPAT et al., 1998; ZIAEI-NEJAD et al., 2006; WANG, 2007) ou linhagens não patogênicas de bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas* e *Vibrio* (CHYTHANYA et al., 2002; ALAVANDI et al., 2004), além de probióticos desenvolvidos para animais terrestres, mas autorizados para uso em espécies aquáticas, como é o caso das bactérias ácido lácticas (AJITHA et al., 2004; CASTEX et al., 2008).

O uso de probióticos na aquicultura vem crescendo, sendo bem aceito, e atualmente é utilizado em diversas fazendas de cultivo de peixes, camarões e moluscos de várias formas: incorporados na água de cultivo (WANG et al., 2005) no sedimento (WANG e HE, 2009); fornecidos por meio do alimento artificial (RENGIPIPAT et al., 2000) e através de banho de imersão (GRAM et al., 2001). Castex et al. (2008) encontraram melhores resultados na utilização do probiótico *Pediococcus acidilactici* suplementado na dieta, atuando favoravelmente na sobrevivência e conversão alimentar de *L. stylirostris* e levando a uma redução de *V. nigripulchritudo* e a uma melhor utilização da ração pelos animais cultivados. Já Zhou et al. (2009) observaram aumentos significativos na taxa de sobrevivência e na atividade de algumas enzimas digestivas com o probiótico *Bacillus coagulans* SC8168 suplementado na água do cultivo de larvas de *L.vannamei*.

Algumas das principais propriedades de um microrganismo candidato a probiótico são a não patogenicidade ao hospedeiro (CHYTHANYA et al., 2002) e a boa aceitação pelo hospedeiro através da ingestão, colonização e replicação (KESARCODI-WATSON et al., 2008). Além disso, a capacidade de colonização do probiótico pode estar baseada em características como: predominância no trato digestório (IRIANTO e AUSTIN, 2002) ou na superfície do animal, na água ou no sedimento (RENGPIPAT et al., 1998); propriedades antibacterianas e tolerância ao pH ácido e à bile (BALCÁZAR, 2008). Um comum meio para

verificação de efeitos probióticos são testes de inibição de patógenos *in vitro* e *in vivo* (GÓMEZ et al., 2007). De acordo com GUZMÁN (1992), a verdadeira colonização do probiótico acontece quando os microrganismos administrados continuam se multiplicando mesmo depois de muito tempo, passando a fazer parte da flora intestinal do hospedeiro.

Durante a última década, doenças causadas por bactérias e vírus (SHEN et al., 2010), destacando-se as vibrioses (SUNG et al., 2001) tem levado a grandes perdas econômicas, afetando severamente a produção mundial de camarão (VASEEHARAN e RAMASAMY, 2003). Víbrios são bactérias Gram negativas frequentemente encontradas em ambientes aquáticos e, segundo Moriarty (1990), são comumente encontradas crescendo em algas, podendo alcançar altas densidades populacionais em viveiros de aquicultura em comparação com ambientes naturais, devido às altas densidades animais e algais. Quando ingeridos por peixes e camarões, passam a ser bactérias intestinais (MORIARTY, 1998), sendo *Vibrio* e *Pseudomonas* os gêneros mais comumente encontrados em crustáceos (MORIARTY, 1990). As linhagens patogênicas de *Vibrio* são oportunistas e geralmente causam doenças sob condições de cultivo não ideais (DECAMP et al., 2008). Podem ainda colonizar e infectar primeiramente apêndices, intestino anterior, intestino médio, hepatopâncreas e finalizar com infecções letais como, por exemplo, septicemia (microrganismos ou suas toxinas no sangue-hemolinfa) como resultado de outras doenças infecciosas, doenças nutricionais, estresse ambiental e ferimentos (AJITHA et al., 2004).

A comunidade microbiana de ambientes aquáticos é extremamente variável (MAYER, 2011). Essa variação pode ser positiva, beneficiando os animais cultivados com o aparecimento de espécies favoráveis à saúde dos mesmos e à qualidade da água e do solo; ou negativa, com o surgimento de patógenos oportunistas ou não, causando doenças e perdas para a aquicultura em consequência de manejos e parâmetros ambientais inadequados. Como prevenção e combate a esses fatores e em substituição ao uso de antibióticos, vem crescendo a

utilização de probióticos tanto a nível experimental quanto de produção nos sistemas de cultivo. Sendo assim, os probióticos podem ser usados como agentes de bioremediação e biocontrole para melhorar a produção dos diversos organismos cultivados como peixes, moluscos, microalgas e camarões, com destaque para o camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, atualmente uma das espécies mais cultivadas.

3 Referências bibliográficas

ALAVANDI, S.V.; VIJAYAN, K.K.; SANTIAGO, T.C.; POORNIMA, M.; JITHENDRAN, K.P.; ALI, S.A.; RAJAN, J.J.S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, p.115-120, 2004.

ALY, S.M.; MOHAMED, F.M.; JOHN, G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 647-656, 2008.

AJITHA, S.; SRIDHAR, M.; SRIDHAR, N.; SINGH, I.S.B.; VARGHESE, V. Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria Against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) *indicus* (H. Milne Edwards). **Asian Fisheries Science**, v.17, p. 71-80, 2004.

AVENDAÑO, R.E.; RIQUELME, C.E. Establishment of mixed culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 893-900, 1999.

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

AVNIMELECH, Y. *Biofloc Technology – A practical guide book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 182p. 2009.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173–186, 2006.

BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J.L.; GIRONES, O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, p. 188 –191, 2008.

BROWDY, C.L., BRATVOLD, D., STOKES, A.D., MCINTOSH, R.P. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. pp 20-34, 2001. *In*: Eds BROWDY, C.L. e JORY, D.E. The new wave: Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture. Aquaculture, 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana USA.

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

BURFORD, M.A.; THOMPSON, P.J.; MCINTOSH, R.P.; BAUMAN, R.H.; PEARSON, D.C. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, p. 525 – 537, 2004.

CASTEX, M.; CHIM, L.; PHAM, D.; LEMAIRE, P.; WABETE, N.; NICOLAS, J.-L.; SCHMIDELY, P.; MARIOJOULS, C. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. **Aquaculture**, v. 275, p. 182– 193, 2008.

CHYTHANYA, R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. **Aquaculture**, v.208, p. 1-10, 2002.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. Application of streptomycetes as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). **The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, v. 58, N. 3, p. 198-204, 2006.

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

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

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, FAO. 197p. 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Acesso realizado em: novembro de 2011.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>. Acesso realizado em dezembro de 2011.

FUKAMI, K.; NISHIJIMA, T., ISHIDA, Y. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. **Hydrobiologia**, v. 358, p. 185–191, 1997.

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

GÓMEZ, R.G.D.; BALCÁZAR, J.L.; SHEN, M.A. Probiotics as Control Agents in Aquaculture. **Journal of Ocean University of China** (Oceanic and Coastal Sea Research), v. 6, n.1, p.76-79, 2007.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; VELASCO-BLANCO, G. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. **Aquaculture**, v. 211, p. 43–48, 2002.

GRAM, L.; LOVOLD, T.; NIELSEN, J.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis **Aquaculture**, v. 199, p.1–11. 2001.

GRIFFITHS, E. Environmental regulation of bacterial virulence - implications for vaccine design and production. **TIBTECH**, v. 9, p. 309–315, 1991.

GUZMÁN, G.A. Aplicación de probióticos en la acuicultura. p. 332-337, 1992. In: SUÁREZ, L. E.C.; MARIE, D.R.; ALFARO, R.M. (Eds). Avances en nutrición acuícola I. Memorias del

Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 11 a 13 de novembro de 1992. Universidade Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

HANSEN, G.H.; OLAFSEN, J.A. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. **Microbial ecology**, v. 38, p. 1–26, 1999.

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

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

MAYER, E.M.S.; SANTOS, G.A.; ENCARNAÇÃO, P. Do Probiotics work in aquaculture? **Global Aquaculture Advocate**, v. 14, n. 3, maio/junho, pp 17-18, 2011.

MISHRA, J.K.; SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; GANDY, R.L.; ALI, A.-M. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. **Aquacultural Engineering**, v. 38, p. 2–15, 2008.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasília-DF, Brasil. 100p. 2008-2009. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>. Acesso realizado em dezembro de 2011.

MORIARTY, D.J.W. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. *In*: LÉSEL, R. (Ed.), *Microbiology in Poecilothersms*. Elsevier, Amsterdam, p.217-222, 1990.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 164, p. 351-358, 1998.

MORIARTY, D.J.W. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. *Microbial Interactions in Aquaculture*. *In*: BELL, CR; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-

GREEN, P. (Eds). *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999.

QI, Z.; ZHANG, X. H.; BOON, N.; BOSSIER, P. Probiotics in aquaculture of China - Current state, problems and prospect. **Aquaculture**, v. 290, p. 15–21, 2009.

RAMIREZ, R.F.; DIXON, B.A. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). **Aquaculture**, v. 227, p. 417–426, 2003.

RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v.167, p. 301–313, 1998.

RINGO, E.; STROM, E. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 623-629, 1994.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 107–110, 1999.

SAMOCHA, T.M.; LAWRENCE, A.L. Shrimp nursery systems and management. p. 87-105, 1992. *In*: WIBAN, J. (Ed.). Proceedings of the special session on shrimp farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana-EUA.

SAMOCHA, T.M.; CORDOVA, J.; BLACHER, T.; DE WIND, A. Raceway nursery production increases shrimp survival and yields in Ecuador. **The Global Aquaculture Advocate**, dezembro, 2000.

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. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquacultural Engineering**, v. 36, p. 184–191, 2007.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E.H.; VERRETH, J.A.J. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. **Aquaculture**, v. 261, p. 1239–1248, 2006.

SHEN, W.-Y.; FU, L.-L.; LI, W.-F.; ZHU, Y.-R. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1691-1698, 2010.

SUGITA, H.; MIZUKI, H.; ITOI, S. Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. **Aquaculture Research**, p.1-8, 2011.

SUMINTO HIRAYAMA, K. Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. **Hydrobiologia**, v.358, p. 223–230, 1997.

SUNG, H.-H.; HSU, S.-F.; CHEN, C.-K.; TING, Y.-Y.; CHAO, W.-L. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, v. 192, p. 101–110, 2001.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 83–87, 2003.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.2, p. 655–671, 2000.

WANG, Y.B.; XU, Z.R.; XIA, M.S. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. **Fisheries science**, v. 71, p. 1034–1039, 2005.

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

WANG, Y.-B.; LI, J.-R.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. **Aquaculture**, v. 281, p. 1–4, 2008.

WANG, Y.-B.; HE, Z. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. **Aquaculture**, v. 287, p. 94–97, 2009.

WASIELESKY Jr., W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C.L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396–403, 2006.

ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M. H.; TAKAMI, G.A.; LOVETT, D.L.; MIRVAGHEFI, A.-R.; SHAKOURI, M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516–524, 2006.

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

4 Artigo Científico

Artigo científico a ser encaminhado à Revista **Aquaculture International**. Todas as normas de redação e citação, doravante atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

EFFECT OF COMMERCIAL PROBIOTIC ON PERFORMANCE OF *Litopenaeus vannamei* POST-LARVAE IN BIOFLOC SYSTEM AND ITS INFLUENCE ON BACTERIAL AND PHYTOPLANKTONIC COMMUNITIES

Maria Gabriela Padilha Ferreira^{1*}, Fabiana Penalva de Melo¹, João Paulo Viana de Lima²,
William Severi³, Eudes de Souza Correia^{1*}

¹Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAq), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE);

²Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA); ³Laboratório de Limnologia (LALIMNO), Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE).

*M.G.P. Ferreira e-mail: mariagabriela.ferreira@gmail.com; E. S. Correia e-mail: ecorreia@depaq.ufrpe.br.

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Telefone: (55 81) 3320-6517.

Abstract

The addition of probiotics in shrimp farms has increased as alternative to use of antibiotics and because the demand for more environment-friendly aquaculture. They have been found to improve host performance and health and water and soil qualities, acting as biocontrol and bioremediation agents in the culture systems. The present study investigated the probiotic effects in water quality, shrimp performance, phytoplankton and bacterial community in intensive nursery system with biofloc for the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Tanks were stocked with post-larvae (PL₁₀) at a density of 2100 PL m⁻³ and initial weight of 2 mg. Commercial probiotic consisted of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Treatments consisted of four different concentrations of probiotic: a) P0.5 (0,5 g m⁻³ – 2.5 x 10⁷ CFU L⁻¹),

2) P1.0 ($1 \text{ g m}^{-3} - 5 \times 10^7 \text{ CFU L}^{-1}$), 3) P2.0 ($2 \text{ g m}^{-3} - 10^8 \text{ CFU L}^{-1}$), 4) P3.0 ($3 \text{ g m}^{-3} - 1.5 \times 10^8 \text{ CFU L}^{-1}$) and 5) CTL (control - without probiotic). Shrimps presented final weight ranging from 465 to 625 mg, survival from 68.8 to 89.9%, specific growth rate from 8.9 to 9.4% / day, yield from 1.01 to 1.21 kg m^{-3} and feed conversion ratio of 1.2 to 1.6. However, probiotic application did not interfere any of these variables and also did not affect water quality, the composition of phytoplankton and bacteria, without showing significant differences between treatments ($P \geq 0.05$), except for autotrophic bacteria ($P < 0.05$). Bacteria naturally present in biofloc showed to be sufficient to maintain the culture system balance.

Keywords: Biofloc, Intensive system, *Litopenaeus vannamei*, Nursery phase, Probiotic.

Abreviações

TCE	Taxa de crescimento específico
S	Sobrevivência
FCA	Fator de conversão alimentar
C:N	Relação carbono : nitrogênio
NAT	Nitrogênio da amônia total
NO ₂ -N	Nitrogênio do nitrito
NO ₃ -N	Nitrogênio do nitrato
SiO ₂	Silicato
PO ₄ -P	Ortofosfato
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
Temp.	Temperatura
OD	Oxigênio dissolvido
F	Frequência de ocorrência
UFC	Unidade formadora de colônias

Introdução

A aquicultura tem sido indicada como a atividade mais promissora para suprir as necessidades alimentares da população mundial (FAO 2008, 2010). Apesar da produção de grandes quantidades de resíduos (Kuhn et al. 2010) como, excesso de nutrientes, compostos tóxicos e patógenos (Avnimelech 2009), a aquicultura vem tomando medidas mais sustentáveis nas etapas de produção e procurando aliar retorno financeiro e mínimo impacto ambiental.

Um meio de aumentar a sustentabilidade tem sido a implementação de sistemas de cultivo utilizando alta densidade de animais e com mínima ou nenhuma troca de água (Burford et al. 2004; Samocha et al. 2007; Mishra et al. 2008). Esses sistemas utilizam a tecnologia do biofoco, que consiste na degradação de resíduos orgânicos e nitrificação ou assimilação da amônia por uma ampla comunidade microbiana, que sob intensa aeração e mistura se agrupam e formam os biofocos (Avnimelech 2009).

Os biofocos são compostos por uma variedade de microrganismos (fitoplâncton, bactérias, rotíferos, oligoquetos, protozoários), restos de ração, células mortas, fezes e detritos (Avnimelech 2007; Azim e Little 2008; Ray et al. 2010a,b; Emerenciano et al. 2011). Esse sistema utiliza uma fonte adicional de carbono (exemplo melão) sob controlada relação C:N para induzir a proliferação das bactérias heterotróficas no cultivo (Ebeling et al. 2006). As bactérias, por sua vez, atuam na manutenção da qualidade da água e são uma fonte suplementar de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais aos animais cultivados com mínima ou zero troca de água (Avnimelech 1999).

Uma das espécies mais cultivadas nesse sistema é o camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, sendo bastante utilizado em todo o mundo por sua alta capacidade de adaptação a diversas condições ambientais. *L. vannamei* consegue sobreviver a amplas variações de

salinidade (Palacios e Racotta 2007; Maicá et al. 2011), temperatura (Wyban et al. 1995; Ponce-Palafox et al. 1997) densidade de estocagem (Mcneil 2000; Neal et al. 2010) e se alimentar do biofloco (em torno de 20 - 30% da sua alimentação diária) (Epp et al. 2002; Burford et al. 2004), sendo possível a redução dos custos com ração e excelentes respostas no crescimento, sobrevivência, ganho de peso e conversão alimentar (Wasielesky Jr. et al. 2006; Mishra et al. 2008).

Outra forma de atender a crescente demanda por uma aquicultura sustentável vem sendo o uso de probióticos. Probiótico na aquicultura é definido como um ou mais microrganismos vivos selecionados para adição ao sistema de produção no intuito de modificar as comunidades microbianas, reduzir ou eliminar patógenos e aumentar o crescimento e a sobrevivência das espécies cultivadas (Jory, 1998), além de melhorar a qualidade da água (Verschuere et al. 2000).

Em condições de cultivo sem troca de água e utilizando altas densidades de estocagem, os efeitos dos probióticos devem ser mais pronunciados, em razão da concentração da água que poderia ajudar numa atuação mais eficiente (McIntosh et al. 2000). A substituição do uso dos antibióticos vem sendo uma alternativa ao problema da alta sobrevivência e do rápido crescimento de patógenos devido à presença de genes de resistência que os tornam livres das ações antibióticas (Moriarty 1998).

Os probióticos tem sido muito utilizados na aquicultura por controlar patógenos por meio de uma série de mecanismos (Balcázar et al. 2006), os quais além de prevenir doenças por meio da produção de substâncias inibitórias, competição por nutrientes e por locais de adesão, podem melhorar a qualidade da água, intensificar a resposta imune, interagir com o fitoplâncton e melhorar a nutrição dos animais cultivados (contribuição com enzimas digestivas e macro e micronutrientes) (Verschuere et al. 2000; Sugita et al. 2011).

O gênero *Bacillus* tem sido largamente estudado devido às suas propriedades probióticas (Wang et al. 2005; Kumar et al. 2006; Wang 2007; Rahiman et al. 2010). Além de serem bactérias Gram positivas, formadoras de esporos, geralmente não patogênicas (LIU et al. 2009) e naturalmente encontradas tanto no sedimento quanto na coluna d'água (Gatesoupe 1999; Decamp et al. 2008), possuem uma série de mecanismos envolvidos no combate contra patógenos tais como a produção de enzimas e antibióticos e a competição por nutrientes e espaço (Moriarty 1998).

Espécies de *Bacillus* tem mostrado melhorar a atividade enzimática (Ochoa-Solano e Olmos-Soto 2006), a sobrevivência e o crescimento (Ziaei-Nejad 2006) de camarões. *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* são muito utilizados por possuírem forte atividade inibitória contra diversas linhagens de *Vibrio* e aumento da imunidade dos animais cultivados (Rengpipat et al. 1998). As principais características dessas espécies de *Bacillus* são o melhoramento da qualidade da água (Farzanfar 2006; Decamp et al. 2008) e a capacidade de tolerar ampla variação de pH, temperatura e salinidade (Liu et al. 2009).

A utilização de probióticos tem apresentado grande êxito na fase de larvicultura (Gomez-Gil et al. 2000; Wang 2007; Zhou et al. 2009; Guo et al. 2009; Luis-Villaseñor et al. 2011). Durante esse período inicial do desenvolvimento, ainda é possível manipular por um dado tempo o estabelecimento da flora microbiana, uma vez que a comunidade do trato gastrointestinal ainda não está totalmente organizada (Kesarcodi-Watson et al. 2008). Sendo assim, a flora pode mudar rapidamente com a entrada de microrganismos oriundos da água e da alimentação (Gatesoupe 1999). Após sua instalação definitiva, apenas altas doses de probiótico podem provocar dominância temporária (Balcázar et al. 2006).

Dessa forma, a eficácia dos probióticos em sistemas de engorda ainda é incerta, como observado em Horowitz e Horowitz (2000), onde não foram encontrados bons resultados tanto para qualidade de água quanto para a produção do camarão *Penaeus setiferus* e do

Litopenaeus vannamei. Efeitos semelhantes também são apresentados por Queiroz e Boyd (1998); Samocha et al. (1998); McIntosh et al. (2000); Devaraja et al. (2002); Patnaik et al. (2007). Contudo, efeitos positivos em relação ao uso de probióticos também podem ser observados em alguns estudos nas fases de vida posteriores à larvicultura (Rengpipat et al. 1998; Wang et al. 2005; Shen et al. 2010; Boonthai 2011), porém sempre com limitações do probiótico na qualidade da água ou em algumas variáveis de desempenho animal.

O principal objetivo deste trabalho foi determinar o desempenho zootécnico do camarão *Litopenaeus vannamei* na fase de berçário cultivado em sistema de biofoco com aplicação de diferentes concentrações de um probiótico comercial. Em adição, a comunidade fitoplanctônica, bacteriana e a qualidade da água também foram investigados nos tratamentos.

Material e métodos

Delineamento experimental

O estudo foi realizado na Estação de Aqüicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O experimento teve a duração de 61 dias e foi conduzido em 20 tanques circulares de fibra de vidro (800L de volume útil). Os tanques estavam localizados em área externa e foram cobertos com telas para evitar o escape dos camarões e ataques de predadores. Todos os tanques foram abastecidos com água salgada oriunda de uma fazenda de camarão em Pernambuco/Brasil. A salinidade foi ajustada para 30 g.L⁻¹ e esterilizada por meio de processo de cloração a 10 ppm de cloro ativo e decloração por meio de aeração durante 48h. Cada tanque recebeu aeração individual através de duas pedras de aeração/tanque, alimentadas por um compressor radial. Durante o experimento não foram realizadas trocas de água, havendo apenas a reposição das perdas por evaporação, utilizando-se água doce para a manutenção do nível e o ajuste da salinidade.

A aplicação do probiótico comercial ocorreu diariamente na água de cultivo. O probiótico foi composto por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na concentração de $5,0 \times 10^{10}$ UFC.g⁻¹, dados do fabricante. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de quatro diferentes concentrações de probiótico e um controle: 1) P0.5 ($0,5 \text{ g.m}^{-3} - 2,5 \times 10^7$ UFC.L⁻¹); 2) P1.0 ($1 \text{ g.m}^{-3} - 5 \times 10^7$ UFC.L⁻¹); 3) P2.0 ($2 \text{ g.m}^{-3} - 10^8$ UFC.L⁻¹); 4) P3.0 ($3 \text{ g.m}^{-3} - 1,5 \times 10^8$ UFC.L⁻¹); e 5) CTL (controle - sem probiótico). Estas concentrações foram escolhidas a partir da concentração fornecida pelo fabricante e a partir de uma revisão da literatura contendo trabalhos semelhantes (Yusoff et al. 2002; Wang 2007; Zhou et al. 2009).

Para propiciar um ambiente heterotrófico, melaço de cana-de-açúcar foi aplicado diariamente na água como fonte de carbono orgânico, mantendo uma relação C/N de 6:1, utilizando 6 gramas de carbono para cada grama de nitrogênio amoniacal total (Ebeling et al. 2006; Samocha et al. 2007).

Fitoplâncton

Em todos os tanques, após o processo de esterilização da água, foi realizada uma fertilização a base de uréia (5 g/tanque), ácido fosfórico (1 ml/tanque) e metassilicato de sódio (6 g/tanque), a fim de obter uma concentração final de $2,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de Nitrogênio, $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de Fósforo e $1,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Silício, respectivamente. Esta fertilização foi feita para dar suporte ao desenvolvimento das microalgas e, dessa forma, aumentar a produtividade natural (Correia et al. 2002) e manter a qualidade da água até o estabelecimento da comunidade heterotrófica (Emerenciano et al. 2011). 24h após a fertilização houve a inoculação de *Chaetoceros calcitrans* a uma concentração de 70.000 cél/mL.

Para a análise do fitoplâncton, amostras de 10 mL da água dos tanques foram coletadas no período da manhã (em torno de 12h), três vezes na semana. As coletas foram

realizadas sobre um ponto de aeração e as amostras acondicionadas em recipientes plásticos com tampa, sendo imediatamente fixadas com formol a 4% (Newell e Newell 1963).

Os recipientes com fitoplâncton foram levados ao Laboratório, onde subamostras do material coletado foram retiradas com auxílio de pipeta, depositadas na câmara de Neubauer (n° células.mL⁻¹) e em lâminas e lamínula para serem analisadas quali-quantitativamente em um microscópio binocular (COLEMAN modelo N-120-T com aumento de 40x) com auxílio de bibliografia especializada, Bicudo e Bicudo (1970); Silva-Cunha e Eskinazi-Leça (1990).

Bactérias

A concentração do probiótico foi confirmada pelo plaqueamento em TSA (Triplic Soy Agar). A amostra foi diluída até 10^{-8} e, em seguida, alíquotas de 1 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} foram transferidas para as placas de Petri e contadas após 24h de incubação a 32 °C. Para a quantificação da população bacteriana autotrófica, heterotrófica e *Vibrio* na água, foram realizadas quatro coletas nas quatro últimas semanas de cultivo. As amostras de água foram diluídas até 10^{-4} e, em seguida, alíquotas de 1 mL das três últimas diluições foram transferidas para placas de Petri contendo meios de cultivo específicos para bactérias quimioautotróficas, heterotróficas (Plate Count Ágar – PCA) e para *Vibrio* (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose - TCBS), sendo incubadas a 30°C por 24-48h.

Pós-larvas

Os tanques foram estocados com pós-larvas com 10 dias após a última metamorfose (PL₁₀), as quais foram aclimatadas gradualmente, contadas e transferidas para os tanques de cultivo, a uma densidade de 2100 PL.m⁻³ e peso médio inicial de 2mg. Durante a estocagem e adaptação dos camarões, a alimentação foi constituída exclusivamente de náuplios de *Artemia* sp na concentração de 40 náuplios/PL/dia (105 náuplios/L). Após esse tempo começou-se

uma transição alimentar, com uma taxa de alimentação inicial de 50%, onde foi fornecida uma combinação de náuplios de *Artemia* sp acrescida de uma ração comercial com 45% de proteína bruta até a primeira semana, seguindo por 29 dias, da substituição gradual da ração com 45% por uma ração com 40%. A partir desse período até o final do cultivo (27 dias), foi ofertada apenas a ração com 40% de proteína bruta. A ração foi fornecida *ad libitum* quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00 h).

A evolução do crescimento dos camarões, bem como o ajuste da quantidade de alimento artificial fornecido foram avaliadas por meio dos resultados das biometrias bissemanais e do consumo diário de alimento. Para avaliar o desempenho do cultivo, foram analisados: Taxa de crescimento específico ($TCE = 100 (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{ tempo de cultivo}$), sobrevivência ($S = 100 (\text{ população final} / \text{ população inicial})$), rendimento ($Rd = \text{ biomassa final} / \text{ volume do tanque}$) e conversão alimentar ($FCA = \text{ Quantidade de alimento fornecido} / \text{ ganho de biomassa}$).

Qualidade da água

A temperatura e o oxigênio dissolvido (OD) foram mensurados através de oxímetro (YSI 550-A, Yellow Springs) e o pH por meio de pHmetro (WTW 315i), ambos registrados diariamente pela manhã (07:00 h) e à tarde (16:00 h) antes da alimentação. A salinidade foi aferida semanalmente utilizando refratômetro (Atago S-10E). Semanalmente foram coletadas amostras de água de cada tanque para análise de nitrito (NO_2), silicato (SiO_2), ortofosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$), alcalinidade e sólidos sedimentáveis. As análises de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$) foram realizadas duas vezes na semana e as de nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$), mensalmente. Nitrito, nitrato, silicato e ortofosfato foram mensurados por meio de espectrofotômetro (Hach DR 2800), utilizando os métodos 8507 (método de Diazotização), 8039 (método de Redução de Cádmio), 8185 (método Silicomolybdate) e 8048 (método PhosVer[®]3), respectivamente e

com absorvâncias lidas a 507nm, 500nm, 452nm e 880nm, respectivamente. A alcalinidade foi mensurada utilizando método titulométrico e expressa em equivalentes de CaCO₃. Os níveis de amônia total foram obtidos por meio do método colorimétrico. Os sólidos sedimentáveis foram mensurados através de cones de sedimentação de Imhoff (mL/L).

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade e normalidade das variâncias. Para a determinação de diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos para as variáveis de desempenho zootécnico, qualidade de água, bactérias e fitoplâncton, foi utilizada a análise de variância (ANOVA – um fator), utilizando o teste de Tukey para a comparação das médias, ao nível de significância de 5%. Para a realização das análises, foi utilizado o programa Statistica version 7.0.

RESULTADOS

Qualidade da água

Os parâmetros de qualidade de água estão representados na Tabela 1 (variáveis diárias) e Tabela 2 (variáveis semanais) e nenhum deles apresentou diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos. A temperatura média foi igual a 25,9 °C pela manhã e 28,9 °C à tarde e a salinidade média foi de 29,1 g.L⁻¹. O pH médio foi de 7,9 no período da manhã e 7,8 à tarde, mantendo-se mais alcalino que ácido ao longo do estudo e superior a 7,0 e inferior a 9,0 na maioria dos dias. A concentração média de oxigênio dissolvido nos tanques atingiu níveis médios iguais a 6,3 mg.L⁻¹ pela manhã e 5,4 mg.L⁻¹ à tarde. Resultados de OD abaixo de 4,0 mg.L⁻¹ (valor mínimo recomendado por Chien, 1992) foram encontrados apenas nos últimos quinze dias de cultivo, no período da tarde, atingindo valores médios mínimos iguais a 3,6 mg.L⁻¹.

Inserir Tabela 1

Inserir Tabela 2

Na Figura 1 pode ser observada uma variação temporal do nitrogênio da amônia total (NAT), nitrogênio do nitrito (N-NO₂), nitrogênio do nitrato (N-NO₃) e sólidos sedimentáveis. NAT apresentou valor máximo igual a 2,4 mg.L⁻¹, com pequena variação dos níveis médios entre os tratamentos. O maior valor de N-NO₂ foi igual a 6,58 mg.L⁻¹ em P2.0, enquanto que nos demais tratamentos oscilou de 1,82 mg.L⁻¹ a 4,68 mg.L⁻¹. N-NO₃ apresentou média máxima igual a 3,74 mg.L⁻¹ entre os tratamentos. Os sólidos sedimentáveis apresentaram valor médio entre os tratamentos igual a 12,23 mL.L⁻¹, com valores máximos no final do cultivo entre 28 mL.L⁻¹ no CTL e 34 mL.L⁻¹ em P2.0. O silicato (2,0 a 78,0 mg.L⁻¹) e a alcalinidade (65 a 260 mg.L⁻¹ CaCO₃) se mantiveram equilibrados durante todo o cultivo, com a alcalinidade apresentando níveis médios acima de 120 mg.L⁻¹ CaCO₃, com aplicação de bicarbonato de sódio quando os níveis apresentavam-se abaixo desse valor. O ortofosfato (0,7 a 17,5 mg.L⁻¹), atingiu valores elevados ao longo de todo o cultivo.

Inserir Figura 1

Crescimento e rendimento

O desempenho zootécnico de *L. vannamei* cultivado na fase berçário com adição de probiótico está registrado na Tabela 3. Nenhuma das variáveis apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P \geq 0,05$). Os pesos finais dos camarões variaram de 0,465 g no CTL e 0,538 g no P0.5 a 0,599 g, 0,621 g e 0,625 g em P1.0, P2.0 e P3.0, respectivamente. Após 61 dias de cultivo, a sobrevivência encontrada foi de 68,8 a 89,9% entre os tratamentos

e a TCE (8,9 a 9,4%/dia) manteve-se praticamente constante em todos os tratamentos. Cada tanque recebeu em média, ao final do experimento, $1226,76 \pm 20,15$ g de ração. O fator de conversão alimentar médio final apresentou resultados semelhantes entre si, com valores de 1,4, 1,3, 1,2, 1,2 e 1,6 em P0.5, P1.0, P2.0, P3.0 e CTL, respectivamente.

Inserir Tabela 3

Comunidade Bacteriana

A concentração de vibrio na água em ambos os tratamentos apresentou-se baixa em quase todas as amostras e sem diferenças significativas ($P \geq 0,05$). Na Tabela 4 é possível observar que os vibrios atingiram médias que variaram de 459 UFC.mL^{-1} (P1.0) a 1562 UFC.mL^{-1} (P2.0) e diminuíram quantitativamente ao longo das semanas de cultivo, com alguns picos de valores mais altos (Figura 2). Apesar da baixa média (743 UFC.mL^{-1}) observada em P0.5, houve um grande número de vibrios na sexta semana de cultivo, chegando a $9.150 \text{ UFC.mL}^{-1}$, mas logo decrescendo e estabilizando ao longo de todo o período.

Inserir Figura 2

Ao contrário do que ocorreu para os vibrios, as bactérias heterotróficas e as autotróficas permaneceram sempre com altos níveis ao longo das semanas de cultivo. Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) para as bactérias heterotróficas (Tabela 4), mas apesar disso, no controle demoraram a se estabilizar, com uma queda na sétima semana, voltando a se restabelecer posteriormente e atingindo concentração maior que os demais tratamentos no fim do cultivo ($4 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$), enquanto que nos tanques tratados com probiótico ocorreu

o inverso (Figura 2). Já as bactérias autotróficas apresentaram diferença significativa entre os três tratamentos com maior adição de probiótico (P1.0, P2.0, P3.0) e o CTL, com $P < 0,05$ (Tabela 4). Os tratamentos com probiótico (P0.5, P1.0, P2.0, P3.0) apresentaram concentrações sempre maiores que o controle com médias iguais a 4×10^5 UFC.mL⁻¹, 1×10^6 UFC.mL⁻¹, 8×10^5 UFC.mL⁻¹ e 1×10^5 UFC.mL⁻¹, respectivamente.

Inserir Tabela 4

Comunidade Fitoplanctônica

O fitoplâncton esteve distribuído entre as divisões Bacillariophyta, Chlorophyta, Cyanophyta, Haptophyta, Pirrophyta e Euglenophyta e não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($P \geq 0,05$). Na Figura 3 pode ser observada uma variação temporal da sucessão dos grupos fitoplanctônicos. A biomassa fitoplanctônica (Tabela 5) foi maior em P3.0 ($1.825.213$ cél.mL⁻¹) e menor em P0.5 ($1.209.272$ cél.mL⁻¹). As cianobactérias e as clorofíceas obtiveram as maiores densidades (483.314 a 935.151 cél.mL⁻¹ e 331.375 a 844.465 cél.mL⁻¹) e frequências de ocorrência (91 a 96% e 83 a 87%, respectivamente) em todos os tratamentos, com os maiores valores de densidade encontrados no CTL (935.151 cél.mL⁻¹) e em P3.0 (844.465 cél.mL⁻¹) respectivamente, enquanto que as euglenofíceas apresentaram as menores densidades (variando de 7.500 a 29.375 cél.mL⁻¹) e frequências de ocorrência (4 a 15%). As divisões que apresentaram as maiores densidades totais em ordem decrescente foram Cyanophyta ($3.704.220$ cél.mL⁻¹), Chlorophyta ($2.864.647$ cél.mL⁻¹), Haptophyta (477.923 cél.mL⁻¹), Bacillariophyta (246.440 cél.mL⁻¹), Pirrophyta (174.166 cél.mL⁻¹) e Euglenophyta (80.030 cél.mL⁻¹).

Inserir Figura 3

Inserir Tabela 5

DISCUSSÃO

A adição de probiótico não influenciou a qualidade da água. Resultados similares foram encontrados em Wang (2007) estudando os efeitos de diferentes quantidades de probióticos (*Rhodobacter sphaeroides* e *Bacillus coagulans*) suplementados na ração sobre o crescimento e a atividade de enzimas digestivas em larvas de *L. vannamei*. Zhou et al. (2009) também não encontraram diferença sobre a atuação de *B. coagulans* na qualidade da água do cultivo de larvas e pós-larvas de *L. vannamei* tratados com diferentes concentrações do probiótico aplicado diariamente na água. Resultados semelhantes podem ser encontrados em Rengpipat et al. (1998) e Wang e He (2009).

Comparando as variáveis de qualidade de água do presente trabalho com os de outros estudos em sistema de bioflocos com zero ou limitada troca de água, mas sem adição de probiótico, se pode perceber valores semelhantes (Handy et al. 2004; Cohen et al. 2005; Mishra et al. 2008; Neal et al. 2010), indicando ser desnecessária a aplicação do probiótico em sistemas equilibrados e intensivamente controlados. McIntosh et al. (2000), comparando os efeitos de um probiótico comercial contendo *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* e *B. polymyxa*; com outro contendo *B. licheniformis* no cultivo intensivo de juvenis de *L. vannamei* sem troca de água, relatam que o fósforo acumulou com o tempo e que os níveis de amônia, nitrito e nitrato foram mantidos pela população microbiana nativa dos tanques e não pelos probióticos adicionados. Os mesmos autores relatam ainda que não encontraram diferenças significativas para a sobrevivência (83 a 98%), peso final (10,93 a 12,79 g) e FCA (1,99 a 2,39) e que os probióticos não foram os responsáveis pelo bom desempenho, mas o próprio sistema de cultivo. Outros estudos com probiótico afirmam semelhantes achados para

a qualidade da água no cultivo de peixes (Queiroz e Boyd 1998), e para qualidade de água e desempenho zootécnico no cultivo de camarões com zero ou limitada troca de água (Samocha et al. 1998; Devaraja et al. 2002; Horowitz e Horowitz 2000 e Patnaik et al. 2007).

Um dos fatores mais importantes para o desempenho de um cultivo é a carga de *Vibrio*. Os valores de vibrio na água apresentaram-se baixos tanto no controle como nos demais tratamentos ao longo do tempo, não havendo influência do probiótico na concentração de vibrio. Estes resultados apresentam níveis semelhantes aos obtidos por Sung et al. (2001), que registraram quantidades de *Vibrio* spp que variaram de $10-10^4$ UFC.mL⁻¹ em amostras da água de viveiros cultivados sem troca de água e sem uso de probiótico. O que corrobora mais uma vez a possibilidade de que as bactérias do biofilme foram as principais responsáveis pelo controle dos vírios e não as do probiótico comercial adicionado neste experimento.

Esta afirmação pode ser sustentada pelo predomínio das bactérias heterotróficas e autotróficas em relação aos vírios que certamente utilizaram de seus antagonismos para controlar o número de vírios nos tanques de cultivo. Das et al. (2006), testando concentrações de *Streptomyces* na ração oferecida a PLs de *Penaeus monodon* cultivadas realizando trocas de água (20%.dia⁻¹), documentaram que, com o tempo, as bactérias heterotróficas reduziram significativamente no controle, enquanto que floresceram nos tanques experimentais e o oposto ocorreu para os vírios. Devaraja et al. (2002), estudando mudanças nas populações microbianas em viveiros tratados com dois tipos de probióticos comerciais (produto 1: *Bacillus* sp. e *Saccharomyces* sp.; produto 2: *Bacillus* sp., *Nitrosomonas* sp. e *Nitrobacter* sp.), concluíram que a aplicação de probiótico não prejudicou a população microbiana natural do viveiro, mas aumentou populações de bactérias heterotróficas nos tratamentos e no controle, afirmando que fatores físico-químicos também podem estar associados com o desempenho dessas populações. No presente estudo, foi encontrado o oposto do observado por Das et al. (2006) nos tratamentos e no controle, pois

como se trata de um cultivo intensivo com biofoco, as bactérias foram induzidas a crescer em todos os tanques, através das aplicações diárias de melão (fonte de carbono). Na análise das bactérias autotróficas, a relação entre o aumento significativo do número dessas bactérias e a concentração de probiótico não está clara. O probiótico pode ter contribuído, visto que as concentrações maiores (P1.0, P2.0 e P3.0) diferiram estatisticamente do controle, mas certamente outras variáveis podem também ter colaborado para isto, assim como relatou Devaraja et al. (2002).

Diatomáceas, cianofíceas, dinoflagelados e algas verdes são grupos fitoplanctônicos comumente encontrados em viveiros de aquicultura (Yusoff et al. 2002). O fitoplâncton apresentou “blooms” de curta duração, nos quais uma espécie era rapidamente sucedida por outra de diferente grupo, assim como relatou Burford et al. (2003). A biomassa fitoplanctônica foi estimada variando de 121×10^4 a 182×10^4 cél mL⁻¹ entre os tratamentos, com dominância em ordem decrescente das cianofíceas e clorofíceas, seguido das haptofíceas, diatomáceas, dinoflagelados e euglenofíceas. Yusoff et al. (2002), ao estudar a sucessão do fitoplâncton em viveiros intensivos de *P. monodon* com mínima troca de água e tratados com probióticos (*Bacillus* sp - 10^8 UFC.mL⁻¹ e *Saccharomyces* sp - $5,6 \cdot 10^5$ UFC.mL⁻¹), observaram números bastante inferiores de microalgas (10^3 a 11×10^3 cél.mL⁻¹). Por outro lado, Samocha et al. (2007), ao avaliar o efeito da suplementação de carbono (melão) sobre a qualidade da água e o desempenho do *Litopenaeus vannamei* no cultivo com limitada troca de água, mas sem adição de probiótico, encontrou valores médios bem semelhantes, que variaram entre 128×10^4 – 258×10^4 cél.mL⁻¹. Mishra et al. (2008), analisando os efeitos da limitada troca de água e de fracionadores de espuma sobre a qualidade da água e o desempenho do *L. vannamei*, também encontrou valores na mesma ordem de grandeza 220×10^4 cél mL⁻¹ – 403×10^4 cél.mL⁻¹.

Paerl e Tucker (1995), realizando uma revisão sobre as cianofíceas em viveiros de aquicultura, afirmam que “blooms” dessas microalgas ocorrem geralmente sob altas temperaturas, elevados níveis de matéria orgânica dissolvida, baixas salinidades, coluna d’água com baixa turbulência e baixa relação nitrogênio:fósforo. Estes autores enfatizam que alguns gêneros formam “blooms” em baixas concentrações de N por serem capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, enquanto outros proliferam em altas concentrações de nitrogênio – acima de 4 mg.L⁻¹ e altas concentrações de fósforo – acima de 0,5 mg.L⁻¹. O fósforo e o nitrogênio são o fator chave para a eutrofização, sendo concentrações de 0,05 a 0,1 mg.L⁻¹ de fósforo total (ortofosfato = 10-15% do fósforo total) já indicativas de ambientes eutrofizados (Boyd 2001; Xia et al. 2004). Em sistemas intensivos é comum se encontrar a eutrofização devido principalmente à grande quantidade de ração e à alta densidade de estocagem (Gross et al. 1998 e Funge-Smith e Briggs 1998). As altas concentrações do fitoplâncton alcançadas neste experimento, em especial as cianofíceas, ocorreram devido aos elevados níveis de ortofosfato (4,36 a 4,87 mg.L⁻¹), atingindo na última semana, nível máximo de 14,9 mg.L⁻¹ nos tratamentos com probiótico e 17,5 mg.L⁻¹ no controle. Mishra et al. (2008) relata alta densidade algal associada a um aumento gradual do ortofosfato, alcançando um nível máximo de 13,4 mg L⁻¹. Segundo Burford et al. (2003), o elevado número de fitoplâncton é esperado, visto que N e P estão em altas concentrações e a aeração fornece oxigênio e mistura da coluna d’água permitindo o acesso não só a esses nutrientes, mas também a luz solar e ao dióxido de carbono, importantes fatores para o seu crescimento.

A elevada presença das microalgas também se deve ao fato do biofloco ainda estar em fase de formação e maturação (apesar do elevado nível de bactérias heterotróficas e autotróficas registrado) e a sucessão ecológica entre fitoplâncton e bactérias em processo de transição. Quando o input de carbono excede a produção primária, o sistema heterotrófico começa a se estabelecer (Burford et al. 2003). As microalgas se tornam mais escassas (o que

aconteceu na última semana de cultivo), mas não ausentes e ajudam a compor o floco. Em resumo, nos sistemas intensivos, a qualidade da água mesmo com elevados níveis de nutrientes, pode não estar alterada e isto se deve à manutenção dos níveis de oxigênio dissolvido por meio da intensa aeração mecânica e à prevenção do acúmulo de compostos nitrogenados tóxicos pela comunidade bacteriana e fitoplanctônica (em menor proporção) que degradam os resíduos orgânicos e ainda servem de suplemento alimentar para o camarão (Boyd 2006; Avnimelech 2009).

Os benefícios dos microrganismos com propriedades probióticas têm sido observados em diversos sistemas de cultivo (Verschuere et al., 2000; Ramirez e Dixon, 2003; Wang, 2007; Sugita et al., 2011). Contudo, a atuação dos probióticos em sistemas sem trocas de água não apresentam a mesma dinâmica observada em outros sistemas de cultivo, como observado em Samocha et al. (1998); McIntosh et al. (2000); Patnaik et al. (2007), por tratar-se de um sistema bastante complexo, que envolve a interação de inúmeras variáveis físico-químicas e biológicas ainda não totalmente claras que podem interferir no desempenho das bactérias probióticas adicionadas ao cultivo (Devaraja et al. 2002).

Conclusão

A adição de probiótico, nas concentrações adotadas, não influenciou a qualidade de água, o desempenho zootécnico do *Litopenaeus vannamei*, a concentração de *Vibrio* e o fitoplâncton durante a fase de berçário em sistema de biofloco. As bactérias probióticas heterotróficas, naturalmente presentes no biofloco, mostraram ser suficientes para manter o equilíbrio do sistema de cultivo.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Produtividade do Professor Dr. Eudes Correia. À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), pelo auxílio financeiro. Ao Laboratório de Sistemas de Produção Aquícola (LAPAq) / UFRPE, pelas análises de fitoplâncton; ao Laboratório de Limnologia (LALIMNO) / UFRPE, pelas análises de água; ao Laboratório de Produção de Alimentos Vivos (LAPAVI) / UFRPE, pelo fornecimento das microalgas; ao Laboratório de Tecnologia em aquicultura (LTA) / UFRPE, pela análise do probiótico e ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) / UFRPE, pela contagem de bactérias autotróficas, heterotróficas e vibrio.

Referências bibliográficas

- Avnimelech Y (1999) Carbon nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176:227–235
- Avnimelech Y (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264:140–147
- Avnimelech Y (2009) *Biofloc Technology – A practical guide book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana

Azim ME, Little DC (2008) The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283:29–35

Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114:173–186

Bicudo CEM, Bicudo RTM (1970) Algas de águas continentais Brasileiras. FUNBEC, II ed., EGRT, São Paulo

Boonthai T, Vuthiphandchai V, Nimrat S (2011) Probiotic Bacteria Effects on Growth and Bacterial Composition on Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture Nutrition* 17:634–644

Boyd CE (2001) Water quality standards: Total phosphorus. *Global Aquaculture Advocate* Junho, 70–71

Boyd CE (2006) Phytoplankton dynamics in aquaculture ponds. *Global Aquaculture Advocate* Nov/dez, 67–68

Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RP, Bauman RH, Pearson DC (2003) Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219:393 – 411

Burford MA, Thompson PJ, Mcintosh RP, Bauman RH, Pearson DC (2004) The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, 232:525–53

Chien Y-H (1992) Water quality requirements and management for marine shrimp culture. In: Wyban J (ed) Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp 144–156

Cohen JM, Samocha TM, Fox JM, Gandy RL, Lawrence AL (2005) Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Engineering* 32:425–442

Correia ES, Pereira JA, Apolinário MO, Horowitz A, Horowitz S (2002) Effect of pond aging on natural food availability and growth of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquacultural Engineering* 26:61–69

Das S, Lyla PS, Khan SA (2006) Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (fabricius). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58(3): 198–204

Decamp O, Moriarty DJW, Lavens P (2008) Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research* 39:334–338

Devaraja TN, Yusoff FM, Shariff M (2002) Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture* 206:245–256

Ebeling JM, Timmons MB, Bisogni JJ (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257:346– 358

Emerenciano M, Ballester ELC, Cavalli RO, Wasielesky W (2011) Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquaculture Research* 1–11

Epp MA, Ziemann DA, Schell DM (2002) Carbon and nitrogen dynamics in zero-water exchange shrimp culture as indicated by stable isotope tracers. *Aquaculture Research* 33:839–846

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations (2008) *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Rome

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations (2010) *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Rome

Farzanfar A (2006) The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 48:149–158

Funge-Smith SJ, Briggs MRP (1998) Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture* 164:117–133

Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147–165

Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF (2000) The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191:259–270

Gross A, Boyd CE, Lovell RT, Eya JC (1998) Phosphorus budgets for channel catfish ponds receiving diets with different phosphorus concentrations. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(1):31–39

Guo JJ, Liu KF, Cheng SH, Chang C, Lay JJ, Hsu Y, Yang JY, Chen TI (2009) Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research* 40:609–618

Handy M, Samocha TM, Patnaik S, Gandy RL, Mckee DA (2004) Nursery Trial Compares Filtration System Performance in Intensive Raceways. *Global Aquaculture Advocate* agosto, 77–79

Horowitz A, Horowitz S (2000) Efficacy of Probiotics in Growout Systems. *Global Aquaculture Advocate* October, 12

Jory DE (1998) Use of probiotics in Penaeid shrimp growout. *Aquaculture Magazine* 24 (1): 62 – 67.

Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274:1–14

Kuhn DD, Drahos DD, Marsh L, Flick Jr GJ (2010) Evaluation of nitrifying bacteria product to improve nitrification efficacy in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 43:78–82

Kumar R, Mukherjee SC, Prasad KP, Pal AK (2006) Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research* 37:1215-1221

Lavilla-Pitogo CR, Leano EM, Paner MG (1998) Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164:337–349

Liu C-H, Chiu C-S, Ho P-L, Wang S-W (2009) Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology* 107:1031–1041

Luis-Villaseñor IE, Macías-Rodríguez M, Gómez-Gil B, Ascencio-Valle F, Campa-Córdova AI (2011) Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321:136–144

Maicá PF, Borba MR, Wasielesky Jr W (2011) Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. *Aquaculture Research* 1-10

McIntosh D, Samocha TM, Jones ER, Lawrence AL, Mckee DA, Horowitz S, Horowitz A (2000) The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of

Litopenaeus vannamei with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering* 21:215–227

Mcneil R (2000) Zero Exchange, Aerobic, Heterotrophic Systems: Key Considerations. *Global Aquaculture Advocate* Junho:72-76

Mishra JK, Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Gandy RL, Ali A-M (2008) Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. *Aquacultural Engineering* 38:2–15

Moriarty DJW (1998) Control of luminous *Vibrio* species in aquaculture ponds. *Aquaculture* 164:351-358

Neal RS, Coyle SD, Tidwell JH (2010) Evaluation of Stocking Density and Light Level on the Growth and Survival of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in Zero-Exchange Systems. *Journal of the world aquaculture society* 41(4):533-544

Newell GE, Newell RC (1963) *Marine Plankton, a practical guide*, Hutchinson Educational, London, 207 p

Ochoa-Solano JL, Olmos-Soto J (2006) The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23:519–525

Paerl HW, Tucker CS (1995) Ecology of blue-green algae in aquaculture ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(2):109-131

Palacios E, Racotta IS (2007) Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquaculture* 268:123–135

Patnaik S, Samocha TM, Kilgen MB (2007) Probiotics Found Ineffective Against *Vibrio harveyi* In Limited-Exchange Shrimp Pond Study. *Global Aquaculture Advocate*, Setembro/Outubro:94-96

Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios CA, Ross LG (1997) The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157:107-115

Queiroz JE, Boyd CE (1998) Effects of a Bacterial Inoculum in Channel Catfish Ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 29(1):67-73

Rahiman KMM, Jesmi Y, Thomas AP, Hatha AAM (2010) Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 41:e120-e134

Ramirez RF, Dixon BA (2003) Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227:417–426

Ray AJ, Seaborn G, Leffler JW, Wilde SB, Lawson A Browdy CL (2010a) Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture* 310:130–138

Ray AJ, Lewis BL, Browdy CL, Leffler JW (2010b) Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299:89–98

Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P (1998) Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167:301–313

Samocha TM, Lawrence AL, Horowitz A, Horowitz S (1998) The Use of Commercial Probiotics in the Production of Marine Shrimp under No Water Exchange In: Proceedings of the second international conference on recirculating aquaculture, Roanoke, Virgínia, pp 373-375. http://nsgd.gso.uri.edu/vsgcp/vsgcpc98001/vsgcpc98001_part6.pdf. Cited 25 Octo 2011

Samocha TM, Patnaik S, Speed M, Ali A-M, Burger JM, Almeida RV, Ayub Z, Harisanto M, Horowitz A, Brock DL (2007) Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering* 36:184–191

Shen WY, Fu LL, Li WF, Zhu YR (2010) Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research* 41:1691-1698

Silva-Cunha MGG, Eskinazi-Leça E (1990) Catálogo das diatomáceas (Baccilariophyceae) da plataforma continental de Pernambuco. SUDENE, Recife, 367p

Sugita H, Mizuki H, Itoi S (2011) Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. *Aquaculture Research*, 2011: 1-8

Sung H-H, Hsu S-F, Chen C-K, Ting Y-Y, Chao W-L (2001) Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture* 192:101–110

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(2):655–671

Wang Y-B, Xu ZR, Xia MS (2005) The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. *Fisheries Science* 71:1034–1039

Wang Y-B (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269:259–264

Wang Y-B, He Z (2009) Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. *Aquaculture* 287:94–97

Wasielesky Jr W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL (2006) Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258:396–403

Wyban J, Walsh WA, Godin DM (1995) Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 138:267-279

Xia LZ, Yang LZ, Yan MC (2004) Nitrogen and phosphorus cycling in shrimp ponds and the measures for sustainable management. *Environmental Geochemistry and Health* 26:245–251

Yusoff FM, Zubaidah MS, Matias HB, Kwan TS (2002) Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. *Aquaculture Research* 33:269-278

Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi AR, Shakouri M (2006) The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252:516– 524

Zhou X-X, Wang Y-B, Li W-F (2009) Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287:349–353

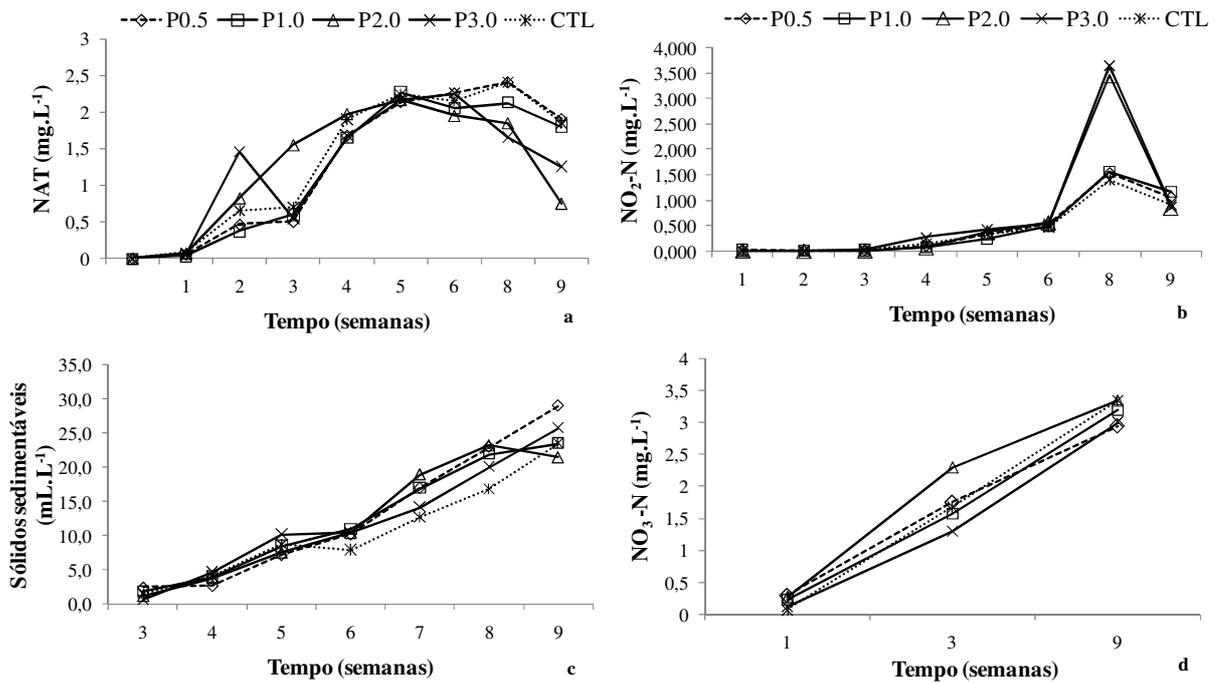


Figura 1. Variação temporal do nitrogênio da amônia total – NAT (a), nitrogênio do nitrito – NO₂-N (b), sólidos sedimentáveis (c) e nitrogênio do nitrato – NO₃-N (d) nos 61 dias de cultivo intensivo de *L. vannamei* com biofoco e probiótico comercial.

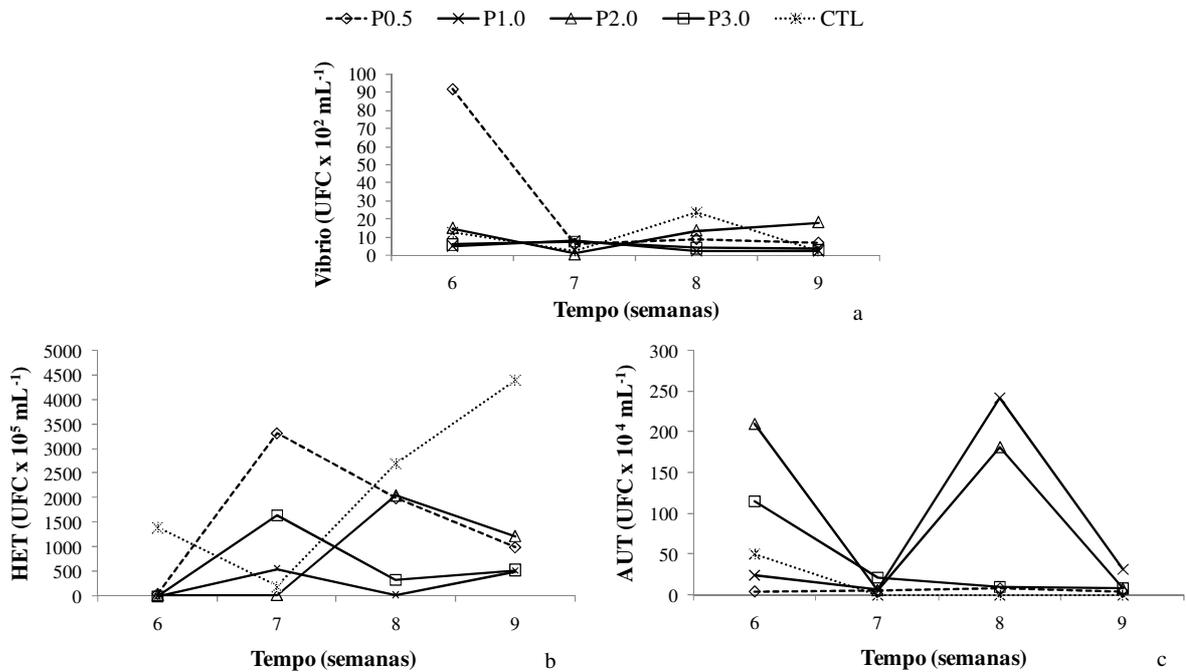


Figura 2. Variação semanal de vibrio (a), bactérias heterotróficas (b) e bactérias autotróficas (c) nos 61 dias de cultivo intensivo de *L. vannamei* com biofoco e probiótico comercial.

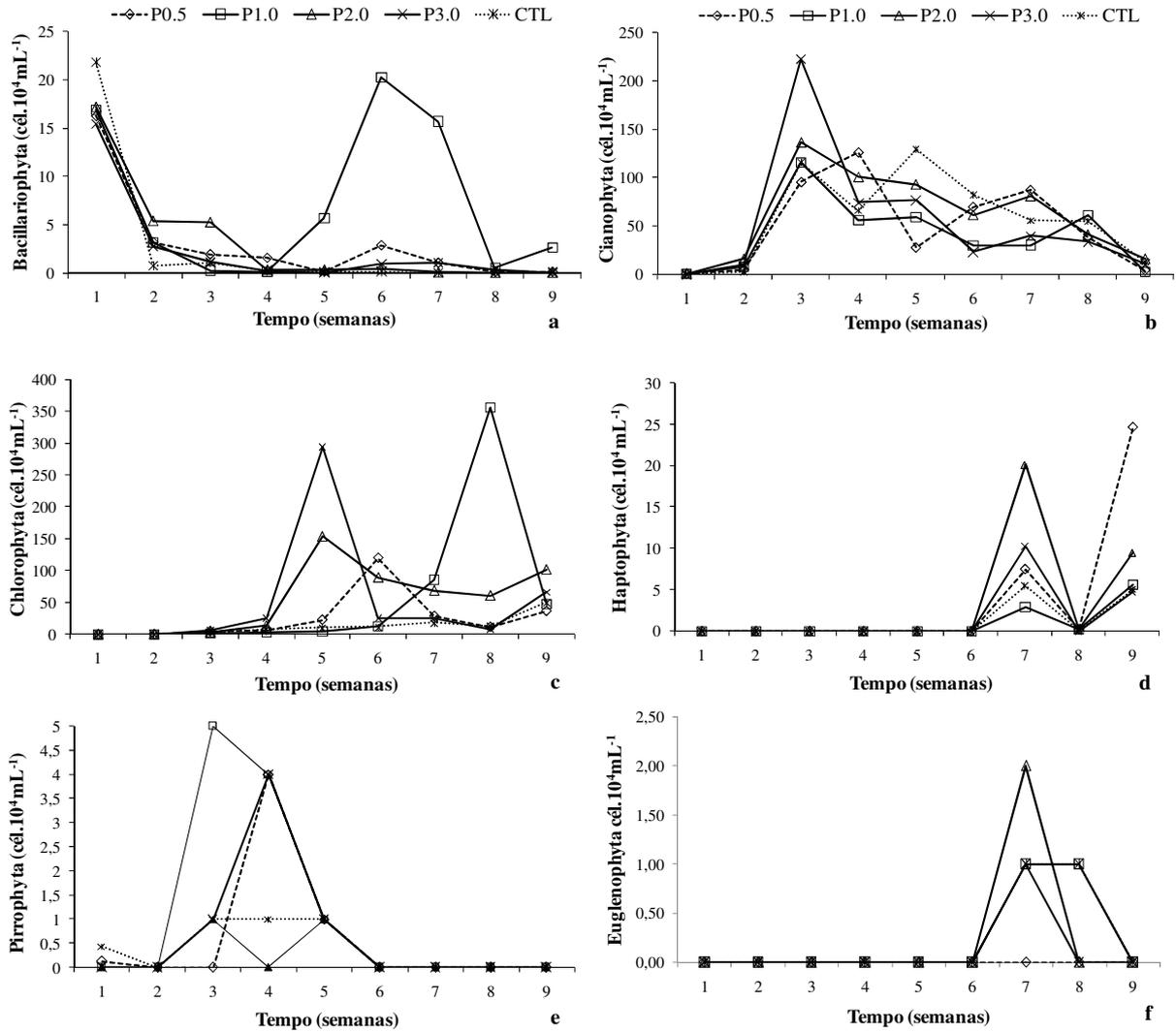


Figura 3. Sucessão dos grupos fitoplânctônicos, (a) Bacillariophyta, (b) Cyanophyta, (c) Chlorophyta, (d) Haptophyta, (e) Pirrophyta e (f) Euglenophyta no cultivo intensivo de *L. vannamei* com bioflocos e probiótico comercial.

Tabela 1: Valores médios (\pm erro padrão) das variáveis semanais de qualidade de água no cultivo intensivo de *L. vannamei* com biofloco e probiótico comercial.

Variáveis	P0.5	P1.0	P2.0	P3.0	CTL
Manhã					
Temp (°C)	25,9 \pm 0,21	25,9 \pm 0,21	25,9 \pm 0,21	26,0 \pm 0,21	25,9 \pm 0,21
	22,9-30,5	22,9-28,3	22,8-28,6	23,2-28,5	23,1-28,5
OD	6,3 \pm 0,16	6,4 \pm 0,16	6,4 \pm 0,14	6,3 \pm 0,15	6,3 \pm 0,15
(mg.L ⁻¹)	3,3-8,3	4,5-8,2	4,7-8,1	4,6-8,1	4,8-8,0
pH	7,9 \pm 0,04	7,9 \pm 0,05	7,9 \pm 0,04	7,9 \pm 0,04	7,9 \pm 0,04
	7,2-8,7	5,6-8,7	7,2-8,6	7,2-8,8	7,3-8,9
Tarde					
Temp (°C)	28,6 \pm 0,25	28,7 \pm 0,25	29,1 \pm 0,24	29,1 \pm 0,25	29,0 \pm 0,23
	23,7-31,7	25,1-31,5	26,0-31,8	25,8-32,0	26,2-31,9
OD	5,4 \pm 0,20	5,4 \pm 0,19	5,5 \pm 0,18	5,3 \pm 0,18	5,4 \pm 0,19
(mg.L ⁻¹)	2,2-8,4	2,9-8,2	3,1-8,0	3,2-7,6	2,8-8,2
pH	7,9 \pm 0,07	7,9 \pm 0,07	7,8 \pm 0,07	7,8 \pm 0,07	7,8 \pm 0,07
	6,4-9,1	7,4-9,2	7,3-9,0	7,4-9,2	7,1-9,4

P0.5, P1.0, P2.0 e P3.0 - Concentrações de probiótico; OD = Oxigênio dissolvido.

Tabela 2: Valores médios (\pm erro padrão) das variáveis semanais de qualidade de água no cultivo intensivo de *L. vannamei* com biofoco e probiótico comercial.

Variáveis	P0.5	P1.0	P2.0	P3.0	CTL
Salinidade (g.L ⁻¹)	29,5 \pm 0,37	29,6 \pm 0,38	28,8 \pm 0,35	28,9 \pm 0,37	28,9 \pm 0,30
	26,5-35,0	26,5-35,0	25,0-34,0	26,0-35,0	26,0-33,0
NAT (mg.L ⁻¹)	1,60 \pm 0,14	1,55 \pm 0,14	1,58 \pm 0,14	1,60 \pm 0,13	1,68 \pm 0,13
	0,00-2,40	0,00-2,40	0,04-2,40	0,00-2,40	0,03-2,40
NO ₂ -N (mg.L ⁻¹)	0,67 \pm 0,11	0,66 \pm 0,11	0,86 \pm 0,20	1,00 \pm 0,20	0,59 \pm 0,09
	0,008-2,33	0,007-2,62	0,008-6,58	0,008-4,68	0,009-1,82
NO ₃ -N (mg.L ⁻¹)	1,66 \pm 0,37	1,67 \pm 0,39	1,97 \pm 0,43	1,48 \pm 0,42	1,69 \pm 0,43
	0,20-3,19	0,10-3,54	0,10-3,83	0,00-4,09	0,00-4,06
SiO ₂ (mg.L ⁻¹)	20,67 \pm 3,21	16,85 \pm 2,40	21,10 \pm 3,06	20,54 \pm 2,64	18,21 \pm 2,43
	3,0-78,0	2,0-58,0	2,0-60,0	2,0-56,0	3,0-55,0
PO ₄ (mg.L ⁻¹)	4,66 \pm 0,57	4,36 \pm 0,55	4,87 \pm 0,57	4,51 \pm 0,52	4,60 \pm 0,60
	0,9-14,5	1,1-13,9	1,0-15,1	1,1-16,2	1,2-17,5
Alcal. (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	155,25 \pm 5,93	150,29 \pm 6,35	144,15 \pm 4,79	147,60 \pm 4,63	153,19 \pm 6,0
	65,0-240,0	65,0-260,0	80,0-225,0	85,0-210,0	80,0-235,0
Sólidos (ml.L ⁻¹)	13,11 \pm 1,86	12,55 \pm 1,62	12,36 \pm 1,80	12,34 \pm 1,60	10,80 \pm 1,41
	1,0-33,0	1,0-30,0	0,5-34,0	0,1-29,0	0,5-28,0

P0.5, P1.0, P2.0 e P3.0 - Concentrações de probiótico; NAT – nitrogênio da amônia total; NO₂-N – nitrogênio do nitrito; NO₃-N – nitrogênio do nitrato; SiO₂ – silicato; PO₄ – ortofosfato; Alcal. – alcalinidade.

Tabela 3: Desempenho de crescimento (média \pm erro padrão) de *L. vannamei* nos 61 dias de cultivo intensivo com bioflocos e probiótico comercial.

Variáveis	P0.5	P1.0	P2.0	P3.0	CTL
Pi (g)	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Pf (g)	0,538 \pm 0,03	0,599 \pm 0,02	0,621 \pm 0,10	0,625 \pm 0,09	0,465 \pm 0,02
TCE (%/dia)	9,2 \pm 0,08	9,3 \pm 0,07	9,3 \pm 0,25	9,4 \pm 0,21	8,9 \pm 0,08
S (%)	81,43 \pm 2,03	77,57 \pm 5,66	74,42 \pm 15,78	68,81 \pm 17,85	89,95 \pm 8,35
Rd (Kg.m ⁻³)	1,15 \pm 71,27	1,21 \pm 59,81	1,08 \pm 127,04	1,01 \pm 213,78	1,09 \pm 114,13
FCA	1,4 \pm 0,08	1,3 \pm 0,08	1,2 \pm 0,04	1,2 \pm 0,01	1,6 \pm 0,20

P0.5, P1.0, P2.0 e P3.0 - concentrações de probiótico; Pi e Pf = pesos inicial e final, respectivamente; TCE = Taxa de Crescimento Específico; FCA = Fator de Conversão Alimentar; S = Sobrevivência; Rd = Rendimento do cultivo.

Tabela 4: Ocorrência de bactérias (média \pm erro padrão e amplitude) nos 61 dias de cultivo intensivo de *L. vannamei* com bioflocos e probiótico comercial.

Variáveis	CTL	P0.5	P1.0	P2.0	P3.0
Vibrio	1016 \pm 498 240-2340	743 \pm 80 635-9150	459 \pm 127 250-795	1562 \pm 132 70-1815	528 \pm 95 330-750
Autot.	10 ⁵ \pm 1x10 ⁵ ^a 5x10 ³ -5x10 ⁵	10 ⁵ \pm 9x10 ⁴ ^{ab} 4x10 ⁴ -4x10 ⁵	4x10 ⁵ \pm 3x10 ⁵ ^b 8x10 ⁴ -1x10 ⁶	10 ⁶ \pm 5x10 ⁵ ^b 6x10 ⁴ -2x10 ⁶	8x10 ⁵ \pm 5x10 ⁵ ^b 7x10 ⁴ -2x10 ⁶
Heterot.	2x10 ⁸ \pm 9x10 ⁷ 2x10 ⁷ -4x10 ⁸	2x10 ⁸ \pm 7x10 ⁷ 5x10 ⁶ -3x10 ⁸	6x10 ⁷ \pm 4x10 ⁷ 4x10 ⁵ -2x10 ⁸	8x10 ⁷ \pm 5x10 ⁷ 3x10 ⁶ -2x10 ⁸	3x10 ⁷ \pm 1x10 ⁷ 10 ⁵ -6x10 ⁷

P0.5, P1.0, P2.0 e P3.0 - concentrações de probiótico. Valores medidos em UFC.mL⁻¹. Autot. = Autotróficas; Heterot. = Heterotróficas. Médias com letras diferentes sugerem diferenças significativas com P<0,05.

Tabela 5: Densidade média (cél/mL) e Frequência de ocorrência (%) do fitoplâncton nos 61 dias de cultivo intensivo de *L. vannamei* com biofloco e probiótico comercial.

Divisão	P0.5	F	P1.0	F	P2.0	F	P3.0	F	CTL	F
Bacillariophyta	$3,4.10^4 \pm 7052$	70	$1,1.10^5 \pm 3569$	57	$3,5.10^4 \pm 8555$	52	$2,5.10^4 \pm 6275$	48	$3,3.10^4 \pm 10451$	54
Cyanophyta	$6,7.10^5 \pm 1,3.10^5$	96	$4,8.10^5 \pm 6,3.10^4$	93	$7,9.10^5 \pm 1,3.10^5$	91	$8,2.10^5 \pm 1,8.10^5$	96	$9,3.10^5 \pm 2,5.10^5$	96
Chlorophyta	$3,3.10^5 \pm 8,6.10^4$	87	$5,4.10^5 \pm 2,4.10^5$	87	$6,0.10^5 \pm 1,3.10^5$	83	$8,4.10^5 \pm 2,8.10^5$	87	$5,4.10^5 \pm 1,7.10^5$	85
Haptophyta	$1,3.10^5 \pm 2,4.10^4$	26	$3,9.10^4 \pm 7185$	22	$1,7.10^5 \pm 4013$	28	$8,8.10^4 \pm 1,8.10^4$	17	$4,6.10^4 \pm 9578$	22
Pirrophyta	$3,4.10^4 \pm 7215$	28	$4,9.10^4 \pm 9625$	22	9361 ± 1995	22	$2,4.10^4 \pm 6677$	30	$5,7.10^4 \pm 1413$	33
Euglenophyta	7500 ± 1313	11	$2,9.10^4 \pm 4598$	9	$1,6.10^4 \pm 2985$	15	$1,9.10^4 \pm 3029$	4	8333 ± 1549	7
Total	1.209.272		1.266.523		1.628.286		1.825.213		1.618.133	

P0.5; P1.0; P2.0 e P3.0 – concentrações de probiótico. Dados expressos em média \pm erro padrão. F= Frequência de ocorrência.

5 ANEXO

Revista Aquaculture International

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of Aquaculture International the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted

to: <http://aqui.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for Aquaculture International offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Colour figures

Springer offers two options for reproducing colour illustrations in your article. Please let us know what you prefer: 1) Free online colour. The colour figure will only appear in

colour on www.springer.com and not in the printed version of the journal. 2) Online and printed colour. The colour figures will appear in colour on our website and in the printed version of the journal. The charges are EUR 950/USD 1150 per article.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Reviewing Procedure

Aquaculture International is sent to 2 specialist reviewers who remain anonymous unless they specifically choose to confer with the author.

Manuscript Presentation

Manuscripts should all be presented in the accepted scientific format e.a. Introduction, Materials and Methods etc. There is no separate format for short communication. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Manuscripts should be printed or typewritten on A4 or US Letter bond paper, one side only, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- running head (shortened title)
- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Abstract

- Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Key Words

- Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

- Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Section Headings

- First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

- Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections.

Notes

○ Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the References. A source reference note should be indicated by an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-Referencing

○ In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

○ Examples:

Winograd (1986, p. 204)

(Winograd 1986; Flores et al. 1988)

(Bullen and Bennett 1990)

Acknowledgements

○ Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

7. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) The demise of modern genomics. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) Handbook of environmental chemistry, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) Neuromuscular junction. Handbook of experimental pharmacology, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) PRICAI'96: topics in artificial intelligence. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence), vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) Proceedings of the genomic researchers, Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation:

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica. Excerpta Medica*, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press

Wilson M et al (2006) *References*. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

20. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) *US Pharmacopeia*, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000

University site

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999
FTP site

Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site

ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author. One corrected proof, together with the original, edited manuscript, should be returned to the Publisher within three days of receipt by mail (airmail overseas).

○ Offprints

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures are published at the author's expense only.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To

publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription–model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- www.springer.com/openchoice

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Aquaculture International

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Fax: +31–78–6576377

Internet:

- www.springer.com