



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
LABORATÓRIO DE CAMARÕES MARINHOS

EFEITO DA ADIÇÃO DO PROBIÓTICO SOBRE A DIGESTIBILIDADE APARENTE
DA PROTEÍNA, ENERGIA E MATÉRIA SECA EM RAÇÃO COMERCIAL PARA
LITOPENAEUS VANNAMEI

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Orientador: Dr. Edegar Roberto Andreatta

CELSO CARLOS BUGLIONE NETO

FLORIANÓPOLIS
2009

Buglione Neto, Celso Carlos,

Efeito da adição do probiótico sobre a digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca em ração comercial para *Litopenaeus vannamei* / Celso Carlos Buglione Neto. – 2009.

42 f : 2 figs, 4 tabs.

Orientador: Edeimar Roberto Andreatta

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1.Carcnicultura; 2.Probiótico; 3.Nutrição; 4.*Litopenaeus vannamei*; 5.Digestibilidade; 6.Crustáceos.

**Efeito da adição do probiótico sobre a digestibilidade aparente da
proteína, energia e matéria seca em ração comercial para
*Litopenaeus vannamei***

Por

CELSO CARLOS BUGLIONE NETO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

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

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Edemar Roberto Andreatta - Orientador

Dr. Walter Quadros Sieffert

Dr. Francisco Olbrich

AGRADECIMENTOS

Ao professor Elpídio Beltrame, pelos ensinamentos, paciência e atenção durante o processo de definição e orientação;

Ao meu orientador professor Edegar Roberto Andreatta e minha co-orientadora Débora Machado Fracalossi, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho;

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), especialmente a Renato Kitagima pelo auxílio prestado durante a realização das análises nutricionais;

A todos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), principalmente aos amigos do setor de microbiologia, Felipe do Nascimento Viera, Bruno Correia, Adolfo Jatoba e Aldenice Pereira pelo apoio e amizade;

A José Luis Mourino pela orientação técnica, companheirismo e amizade desde o início dos meus trabalhos no LCM;

A toda minha família, a minha Mãe e Carlos, ao meu pai, e especialmente meus avós que me deram todo apoio e incentivo na minha vinda para Florianópolis, e por sempre acreditarem na minha capacidade;

A minha esposa Andrezza Melo Costa, pelo amor, dedicação, paciência, e ajuda constante;

A Deus, por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

SUMARIO

INTRODUÇÃO	11
Nutrição na carcinicultura	12
Digestibilidade de nutrientes	13
Uso de Probióticos como ingrediente funcional.....	14
Objetivos	17
Objetivos Específicos:.....	17
Avaliação de diferentes métodos de coleta de fezes para ensaios de digestibilidade com <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
Resumo:.....	18
Abstract:.....	18
Introdução	19
Material e Métodos.....	20
Determinação do tempo de passagem e esvaziamento gástrico	20
Avaliação de métodos de coleta de fezes.....	20
Sistema de Coleta por Decantação (SCD).....	21
Sistema de Coleta por Sifonamento (SCS).....	21
Coleta de fezes por dissecação (DISS).....	21
Determinação do Coeficiente de Digestibilidade da Proteína (CDA PB) e Matéria Seca (CDA MS)	22
Resultados e Discussão:	23
Referencias:	24
Avaliação do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca de dieta suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> para <i>Litopennaeus vannamei</i>	26
Resumo:.....	27
Introdução:	28
Material e Métodos:.....	29
Cepa bacteriana:	29
Preparo da dieta com a cepa de <i>Lactobacillus plantarum</i> :	29
Avaliação da colonização da cepa de bactéria probiótica no trato digestivo dos animais e nas fezes produzidas:.....	30
Sistema de coleta de fezes para a determinação do Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína energia e matéria seca das dietas	30
Determinação do coeficiente de digestibilidade aparente de proteína e energia nas dietas:.....	31
Análise estatística:.....	31
Resultados:	31
Discussão:.....	33
Referências:.....	35
REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO:	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistemas de coletas avaliados; A: Sistema de Coleta por Decantação (SCD); B: Sistema de Coleta por Sifonamento (SCS).....	22
Figura 2: Quantificação de bactérias ácido-láticas na ração, trato digestivo e fezes em camarões alimentados com a dieta suplementada com probiótico	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e desvio padrão do CDA PB e CDA MS obtida após 15 dias de coleta nos sistemas SCD, SCS e DISS. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os sistemas pelo teste- <i>t</i> ($p < 0,05$).	23
Tabela 2: Composição centesimal da dieta utilizada nos experimentos anunciada pelo fabricante: ..	30
Tabela 3: Análise dos parâmetros nutricionais das rações utilizadas no experimento após o processo de preparo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os sistemas pelo teste- <i>t</i> ($p < 0,05$):	32
Tabela 4: Resultados dos parâmetros nutricionais avaliados nas dietas. : Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDAPB), da matéria seca (CDAMS), da energia (CDAE), quantidade de fezes produzida e consumo diário ao longo do experimento.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

CDAPB – Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta

CDAE – Coeficiente de digestibilidade aparente da anergia

SCD – Sistema de coleta de fezes por decantação

Cr₂O₃ – Óxido de cromo

SCS – Sistema de coleta de fezes por sifonamento

DISS – Coleta de fezes por dissecação

WSSV – White spot syndrome virus

PB – Proteína Bruta

CDA MS – Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca

CDA – Coeficiente de digestibilidade aparente

UFC – Unidades formadoras de colônias

MRS – meio de cultura Man, Rogosa e. Sharpe

NaCl – Cloreto de Sódio

TSA – meio de cultura Trypic Soy Agar

RESUMO

O cultivo de camarão requer o fornecimento de nutrientes através da suplementação de dietas balanceadas. A otimização nutricional é importante por razões biológicas, ambientais, sanitárias e econômicas, sendo necessária para o desenvolvimento de uma aquicultura sustentável. Este projeto pretendeu avaliar se, o uso de uma ração comercial, suplementada com uma bactéria ácido láctica *L. plantarum* isoladas de camarões, melhorou o coeficiente de digestibilidade aparente de proteína (CDAPB) e energia (CDAE) aumentando seu valor nutricional. Para avaliação do CDAPB e CDAE, foi utilizado um marcador inerte (0,5% Cr₂O₃), sendo quantificados os teores de proteína e energia na ração e nas fezes dos animais alimentados com as rações suplementadas com BAL. Para a determinação do CDAPB e CDAE foram inicialmente testados dois sistemas de coletas de fezes: sistema de coleta por decantação (SCD) e sistema de coleta por sifonamento (SCS) e comparados com a coleta de fezes por dissecação (DISS). Para a determinação *in vivo* do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta e energia de dietas e nutrientes para camarões marinhos foi utilizado o sistema de coleta por decantação, pois apresentou baixo grau de lixiviação da proteína e matéria seca das fezes e foi de fácil manipulação. Nas dietas contendo *L. plantarum* foi observado um ganho de 2% no CDAPB que foi de $84,18 \pm 0,35$ % e $82,73 \pm 1,012$ para dieta controle ($p < 0,05$), para o CDAE o ganho foi de 2,63% sendo $81,28 \pm 0,16$ % para dieta contendo *L. plantarum* e $78,63 \pm 0,93$ % para dieta controle ($p < 0,05$). A suplementação com *L. plantarum* aumentou o CDAPB e o CDAE na dieta testada demonstrando efeitos nutricionais positivos para o uso na nutrição de camarões marinhos.

Palavras-chave: Probióticos, nutrição de camarões, aquicultura.

ABSTRACT

The shrimp culture requires the supply of nutrients through supplementation of balanced diets. The nutritional optimization is important for biological, ambient, sanitary and economic reasons, being necessary for the development of a sustainable aquaculture. This project intended to evaluate the improvement of a supplemented commercial diet with a lactic acid bacterium *L. plantarum* isolated of shrimps on the coefficient of apparent digestibility of protein (CDAPB) and energy (CDAE), increasing its nutritional value. For evaluation of CDAPB and CDAE an inert marker was used (0,5% Cr₂O₃), being quantified protein and energy content in the diet and feces of the animals fed with the diet supplemented with *L. plantarum*. For the determination of CDAPB and CDAE initially two systems of feces collections had been tested: system of feces collection for decantation (SCD) and system of feces collection for siphoning (SCS), and compared with the feces collection for stripping (DISS). The system that better adjusts to the experimental conditions for *in vivo* determination of the apparent digestibility coefficient of crude protein and dry matter from diets and nutrients for marine shrimps was the system of feces collection for decantation, therefore it presents low leaching degree of the protein and dry matter of feces and presents easy manipulation. The diet contend *L. plantarum* were observed a profit of 2% in the CDAPB ($84,18 \pm 0,35$ %) compared control diet ($82,73 \pm 1,012$) ($p < 0,05$). The CDAE increased 2,63% ($81,28 \pm 0.16\%$) on diet with *L. plantarum* in relation to the control diet ($78,63 \pm 0.93\%$) ($p < 0,05$). The supplementation with *L. plantarum* increased the CDAPB and the CDAE in tested diet demonstrating positive nutritional effects for the use in marine shrimps nutrition.

Key-words: Probiotics, shrimp nutrition, aquaculture.

INTRODUÇÃO

O rápido crescimento mundial no cultivo de camarões marinhos nas últimas décadas, notadamente em países tropicais emergentes da Ásia e das Américas, sempre teve como base de sustentação a crescente demanda do produto no mercado internacional, a elevada rentabilidade do agronegócio e sua capacidade de gerar renda e emprego para o desenvolvimento regional. O declínio da pesca extrativa de camarões marinhos, registrado pela FAO (2006), também vem contribuindo para manter em ascensão o produto cultivado, cujo crescimento representa um importante fator de estabilização na oferta global do camarão frente ao aumento da demanda.

Os primeiros experimentos com o camarão cultivado no Brasil surgiram na década de 70 quando o Governo do Rio Grande do Norte criou o "Projeto Camarão" para estudar a viabilidade do cultivo desse crustáceo em substituição à extração do sal, atividade tradicional do Estado que na época confrontava séria crise de preço e mercado e com o conseqüente desemprego nas áreas salineiras do Estado. Nesse período inicial, o Estado de Santa Catarina também desenvolveu pesquisas de reprodução, larvicultura e engorda de camarão cultivado e conseguiu produzir as primeiras pós-larvas em laboratório da América Latina. Entretanto, a realização do primeiro esforço organizado e orientado para produção comercial do camarão confinado ocorreu no período 1978 a 1984, por iniciativa do Governo do RN, que importou a espécie *Penaeus japonicus*, reforçou o "Projeto Camarão" e envolveu a EMPARN (Empresa de Pesquisas Agropecuárias do Rio Grande do Norte) para sistematizar e desenvolver os trabalhos de adaptação da espécie exótica às condições locais (MAPA, 2001).

A partir de 1995, teve início uma nova fase para a carcinicultura brasileira, motivada pela participação e consolidação do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), oriundo do Oceano Pacífico, o qual começou a ser produzido comercialmente nos laboratórios de reprodução. Com a oferta de larvas para os produtores, a atividade tomou um novo impulso, passando a crescer a taxas superiores a 60% ao ano, até 2003, quando a produção atingiu a marca de 90.190 toneladas (RODRIGUES, 2005). No entanto, em 2004, com o advento da ação anti-dumping, imposta pelos Estados Unidos contra o camarão brasileiro, associado a alguns fatores adversos como a forte desvalorização do dólar americano, esse setor, cuja base comercial era o mercado internacional, perdeu competitividade nas exportações, tendo como resultado uma redução significativa na produção (ROCHA, 2007).

A história catarinense da carcinicultura começou em 1983, quando a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou suas pesquisas de reprodução e cultivo do camarão-rosa *Penaeus paulensis* (espécie nativa). Os resultados obtidos nos cultivos foram insatisfatórios e os empreendimentos foram se enfraquecendo, até que, finalmente, deixaram de existir. Em 1998, após o fechamento de várias empresas, a UFSC e a Epagri introduziram no estado a espécie *Litopenaeus vannamei*, que havia apresentado nos cultivos do Nordeste taxas de sobrevivência, conversão alimentar e crescimento competitivos. O alto desempenho do *L.vannamei* viabilizou a reativação dos antigos empreendimentos e possibilitou novas instalações de cultivo (COSTA *et. al.*, 2003).

Os dados do setor de camarão cultivado no Estado de Santa Catarina mostraram um crescimento vigoroso da produção, com um volume triplicado a cada ano no período de 1999 e 2002, sendo verificado, no último ano, um incremento de 97%. A produtividade cresceu de forma bastante acentuada, como resultado da melhora no desempenho dos recursos tecnológicos em uso nos cultivos, e também do desenvolvimento da indústria de alimento animal no país, corroborando para o incremento do segmento de camarão cultivado. Evidencia-se a contribuição importante do setor de larvicultura nacional e, particularmente no estado de Santa Catarina, a produção de larvas do LCM (UFSC), de grande importância no suprimento estadual (COSTA *et al.*, 2003).

No ano de 2004 foi detectado nas fazendas do estado de Santa Catarina, o vírus da mancha branca, conhecido internacionalmente como *white spot syndrome virus* (WSSV). Este vírus levou a queda vertiginosa da produção de camarão em cativeiro, o que contribuiu significativamente para a quebra da atividade no estado. Outro vírus a causar um impacto considerável na carcinicultura brasileira a partir de 2004 foi o IMNV (do inglês *infectious myonecrosis virus*). Após seu surgimento este vírus causou uma queda expressiva da produção de camarões no Nordeste do Brasil que, juntamente com fatores, como a queda do preço do camarão no mercado internacional e a baixa do dólar no Brasil, provocou graves perdas econômicas a grande maioria dos produtores brasileiros (RODRIGUES, 2005).

Com o objetivo de minimizar as perdas na produção do estado, a UFSC, através do LCM iniciou um projeto de combate a enfermidades virais e também bacterianas, que dentre as ações propostas estava o monitoramento microbiológico da produção de pós-larvas e o desenvolvimento de bactérias probióticas para as fazendas de cultivo de camarões.

Nutrição na carcinicultura

Em sistemas intensivos de cultivo os camarões são tipicamente alimentados com dietas baseadas em farinha de peixe com alta proteína. O uso de rações com esta formulação é fundamentada por resultados de estudos de laboratório que demonstram que o conteúdo de proteína na dieta ideal está entre 35 e 46 % (GUILLAUME, 1997). Entretanto, estes estudos não levam em consideração a contribuição do alimento natural para a nutrição dos animais (TACON, 1996). Os camarões peneídeos possuem hábitos alimentares onívoros apresentando preferência pelo consumo de plantas e detritos (BOMBEO-TUBURAN *et al.*, 1993; FOCKEN *et al.*, 1998). No sistema de cultivo intensivo o material detrital é abundante e pode prover uma fonte adicional de alimento para o camarão. Segundo Parker *et al.* (1989, 1991), em cultivos semi-intensivos de *Litopenaeus vannamei* e *L. setiferus* 52% do nitrogênio da dieta foi suprido pela produtividade natural do viveiro. Com isso, a produção natural dos viveiros tem mostrado contribuir substancialmente para a nutrição dos camarões. Outros estudos realizados em viveiros com *L. vannamei* estocados na densidade de 50 cam/m², demonstraram que 31 % do requerimento do nitrogênio derivou da biota do viveiro (EPP *et al.*, 2002). Em tanques de sistema intensivo, a presença de estruturas com crescimento epifítico aumentou a produção de *L. vannamei* e reduziu os níveis de requerimento de proteínas de 40 para 20 %, não ocasionando redução na produção (HOPKINS *et al.*, 1995; TEICHERT-CODDINGTON & RODRIGUEZ, 1995).

Essas evidências apontam para uma contribuição substancial da biota para a nutrição de camarões nos sistemas de cultivo. Ocorre também uma considerável perda nos viveiros intensivos, porque os níveis de proteína na ração não tem se ajustado para permitir uma contribuição natural da biota. Isto resulta em uma baixa assimilação de nitrogênio onde apenas 15-30% do nitrogênio adicionado na ração fica retido na biomassa de camarão na despesca (FUNGE-SMITH & BRIGGS, 1998; MARTIN *et al.*, 1998; JACKSON *et al.*, 2003). Isto pode ser causado por formulações sub-ótimas de ração, pela falta de estabilidade na água, e pelas estratégias de alimentação utilizadas. O desperdício de ração é custoso para os aquicultores que gastam mais de 50% dos custos variáveis na ração (LAWRENCE & LEE, 1997). Adicionalmente, o desperdício de nutrientes pode ter efeitos na qualidade de água, na saúde e crescimento do camarão. Além disso, quando a água do viveiro é descartada, os nutrientes e os sólidos em suspensão podem impactar de forma negativa o ecossistema (NAYLOR *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1999; MCKINNON *et al.*, 2002).

Digestibilidade de nutrientes

A ração é uma das maiores preocupações para os produtores de camarão (AKIYAMA *et al.*, 1992; SARAC *et al.*, 1993). Esta deve conter diversas características específicas, incluindo propriedades organolépticas como odor, textura, e sabor, e também propriedades físicas como o tamanho da partícula. Em acréscimo, a ração deve conter todos os nutrientes para o organismo cultivado, ser altamente digestível, com nutrientes disponíveis para assimilação, e estar livre de fatores antinutricionais (SUDARYONO *et al.*, 1995).

A identificação de novas alternativas para substituição da utilização de ingredientes protéicos como a farinha de peixe em dietas para aqüicultura tem sido de grande interesse nos últimos anos (TACON *et al.*, 1998; FAO, 2002; NEW & WIJKSTROM, 2002). O interesse de substituir a farinha de peixe surge porque seu preço aumenta conforme a disponibilidade no mercado (NAYLOR *et al.*, 2000).

Dentre os ingredientes pesquisados como alternativa à farinha de peixe, estão os derivados de soja (STOREBAKKEN *et al.*, 2000; SWICK, 2002), devido à segurança na oferta, preço e composição (CAIN & GARLING, 1995). No entanto, o uso de uma maior quantidade de proteínas de origem vegetal na dieta é capaz de reduzir a digestibilidade e diminuir a eficiência alimentar. Por estas razões, o uso de aditivos alimentares pode se tornar necessário para aumentar a digestibilidade dos ingredientes na dieta, tornando-os uma alternativa para sua utilização na aqüicultura (LEONEL *et al.*, 2006). Estes aditivos representam hoje uma das áreas mais investigadas e promissoras na alimentação e nutrição (HASLER, 2002).

Em estudos de nutrição, os coeficientes de digestibilidade aparente são geralmente utilizados com o objetivo de determinar o valor nutricional de um alimento. De acordo com Choubert *et al.* (1979) e Mcgoogan e Reigh (1996), a digestibilidade do ingrediente de um alimento depende, primeiramente, da composição química e também da capacidade digestiva do animal para o alimento. Ela é de extrema importância para o atendimento das exigências nutricionais de uma espécie, uma vez que o conhecimento dos hábitos alimentares e o fornecimento de uma dieta equilibrada não são suficientes para assegurar uma resposta positiva no desempenho do animal.

A digestibilidade de uma dieta significa a porção de nutrientes do alimento que é absorvida pelo animal menos a porção perdida nos processos de ingestão e digestão. Estas perdas são classificadas como perdas metabólicas de nitrogênio fecal, a qual se refere à digestibilidade da proteína, e perdas da energia metabólica, referente à digestibilidade da energia (BAYNE & NEWELL, 1983). Por outro lado, a digestibilidade aparente se refere à porção dos nutrientes do alimento que foi absorvida e é calculada como a diferença do total ingerido e o total excretado como fezes (LEE & LAWRENCE, 1997).

LEAVIT (1985) recomendou o uso de métodos gravimétricos para a mensuração da digestibilidade aparente em lagostas, contudo a mensuração precisa da quantidade de alimento ingerida e as quantidades de fezes produzidas em animais aquáticos oferecem muitas dificuldades, particularmente para camarões marinhos, que são animais que possuem uma velocidade de alimentação lenta. Como consequência disso o uso da técnica de marcadores inertes se tornou o método mais aplicado (SMITH *et al.*, 1985; SHIAU *et al.*, 1992; LEE & LAWRENCE, 1997; JONES & SILVA, 1998).

A determinação da digestibilidade *in vivo* em animais aquáticos é baseada na determinação da quantidade do marcador inerte (óxido de cromo, Cr₂O₃) nas fezes, o qual é incorporado na ração. Para o uso deste método é essencial que se tenha um sistema eficiente de coleta de fezes no meio aquático (MARTINEZ-PALACIOS *et al.*, 2001).

O sistema mais simples de coleta fecal é o sifonamento do material do fundo do tanque ou aquário, porém esta técnica pode levar a numerosos erros, dentre eles a lixiviação dos nutrientes e da matéria seca e a contaminação com os restos de ração.

Um sistema eficiente foi desenvolvido para peixes por CHO *et al.* (1985). Este sistema chamado de "Guelph" usa um fluxo de água com baixa velocidade em sentido vertical para baixo, de forma que as fezes decantam no centro do tanque, sendo recolhidas em um tubo coletor. Este sistema funciona bem para peixes e tem sido amplamente utilizado (HAJEN *et al.*, 1993), mas para camarões algumas dificuldades foram observadas, pois estes são animais bentônicos e isto faz com que exista a necessidade de um substrato para se apoiarem. Além disso, estes animais possuem hábitos coprofágicos, gerando a necessidade de impedir que eles entrem em contato com as próprias fezes (FAIR *et al.*, 1980). Em decorrência disso, muitos trabalhos com digestibilidade para camarões foram realizados com sistemas de sifonamento (CLAWSON e LOVELL, 1992; LIM, 1993).

Entretanto, a determinação dos coeficientes de digestibilidade para as diferentes espécies de organismos aquáticos e entre diferentes laboratórios de nutrição são difíceis de comparar devido à falta de padronização de metodologias, tanto para os sistemas de alimentação como para o sistema de coleta de fezes (LEE & LAWRENCE, 1997).

Uso de Probióticos como ingrediente funcional

Historicamente a contrariedade pelas bactérias deve ter sido originada pelo medo de infecções que tem alarmado a humanidade através dos tempos. Na idade média, com a baixa qualidade do tratamento de água, tornava-se mais seguro a opção de beber vinho à água. Enfim, no início do século 20, o cientista russo Elie Metchnikoff articulou o conceito de bactérias benéficas em termos científicos no livro "The Prolongation of Life" (METCHNIKOFF, 1907).

Hoje em dia, tipos especiais de bactérias, associadas com a fermentação saudável no intestino humano, têm sido classificadas como bactérias probióticas. Pela definição do Joint Food and Agriculture Organization and World Health Organization Working Group (2002), um probiótico precisa estar vivo e fornecer um benefício fisiológico mensurável, que usualmente é característica de uma linhagem bacteriana específica. A aplicação de culturas vivas incide sobre uma mistura entre alimentação e medicina (HIKEY, 2005). No futuro, provavelmente, esta diferenciação poderá ser reduzida ainda mais com os avanços na modificação genética de espécies probióticas e produção *in vivo* de drogas e nutrientes no intestino.

Tipicamente, probióticos para qualidade alimentar BAL (Bactérias ácido lácticas), são usadas extensivamente em preparações terapêuticas e adicionadas nos alimentos. Além do efeito estimulante do sistema imune, os benefícios de um consumo regular de probióticos incluem a redução do risco de câncer de cólon, colesterol alto, incidentes com diarreia e outros. Um grama de matéria seca de cultura de *Lactobacillus fermentum* KC4b, por exemplo, pode remover 14,8 mg de colesterol do meio de cultura (PEREIRA & GIBSON, 2002). A chamada bacterioterapia com BAL é usada até para controlar caries dentárias (TAGG & DIERKSEN, 2003).

Na aqüicultura a suplementação de uma ou mais cepas de microorganismos capazes de melhorar a saúde do animal enquadram os probióticos como um aditivo funcional (FULLER, 1992). O probiótico de acordo com VERSCHUERE *et al.*, (2000), é definido como “microorganismos vivos”, que ao serem administrados em tanques de cultivo atuam benéficamente no organismo aquático de interesse, melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, o balanço de bactérias no trato digestório ou o ambiente de cultivo (viveiro).

Os lactobacilos constituem um grupo de bactérias em formato de bastonetes, gram-positivos, caracterizados por sua habilidade de produzir diversos metabólitos secundários como antibióticos, bioinseticidas, biocinas, ácidos orgânicos e enzimas (FERRARI *et al.*, 1993; GODFREY & WEST, 1996; OLMOS *et al.*, 1996, 1997, 1998; OLMOS, 2003). As enzimas produzidas são muito eficientes em romper uma larga variedade de carboidratos, lipídios e proteínas (SONNENSCHNEIN *et al.*, 1993). Diversas espécies de *Bacillus* também degradam material orgânico acumulado em fundos de viveiros de cultivo (LIN, 1995; RENGPIPAT *et al.*, 1998; VERSCHUERE *et al.*, 2000).

A fermentação de peixes ou de resíduos de peixes com ácidos orgânicos, com ou sem a adição de bactérias ácido lácticas ou de fungos filamentosos, é um método tradicional de preservar ou melhorar seu valor nutricional como ingrediente da ração animal (LAINING, 2003 *apud* JONES, 1975; HASSAN E HEATH, 1986). Entretanto, a fermentação é mais usualmente aplicada para os resíduos de peixes, sendo usada com sucesso para aumentar a digestibilidade aparente da proteína e o valor nutritivo total nas dietas para alevinos de peixe (LAINING, 2003 *apud* MUKHOPADHYAY e RAY, 1999). Observando as possíveis vantagens que as bactérias ácido lácticas podem trazer, estas têm um grande potencial para serem utilizadas para a melhoria do sistema imune e também para uma possível melhoria da nutrição de camarões peneídeos.

O artigo “Avaliação de diferentes métodos de coleta de fezes para ensaios de digestibilidade com *Litopenaeus vannamei*” será submetido a revista Ciencia Rural

O artigo "Avaliação do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca de dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* para *Litopennaeus vannamei*" será submetido a revista *aquaculture nutrition*.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca de uma ração comercial suplementada ou não com *Lactobacillus plantarum* para *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos Específicos:

1. Determinar o tempo de passagem e de esvaziamento gástrico da ração comercial utilizada nos ensaios de digestibilidade.
2. Comparar três métodos de coleta de fezes para uma adequada mensuração do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca da ração comercial para o camarão *Litopenaeus vannamei*.
3. Determinar coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca da ração comercial suplementada com *Lactobacillus plantarum* para *Litopenaeus vannamei*.

**Avaliação de diferentes métodos de coleta de fezes para ensaios de digestibilidade com
Litopenaeus vannamei.**

**Evaluation of different methods of feces collection for digestibility assays with *Litopenaeus
vannamei***

Resumo:

Este estudo teve como objetivo avaliar o Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Proteína Bruta (CDA PB) e da Matéria Seca (CDA MS) de ração comercial em três diferentes sistemas de coletas de fezes para ensaios de nutrição com camarões marinhos. Os sistemas testados foram: Sistema de Coleta de fezes por Decantação (SCD); Sistema de Coleta de fezes por Sifonamento (SCS) e Coleta de fezes por Dissecação (DISS). O CDA PB da dieta comercial foi de $81,8 \pm 0,5\%$ para o SCD e $82,7 \pm 0,6\%$ para o SCS. Ambos os sistemas não apresentaram diferenças para o CDA PB. No DISS o CDA PB foi de $55,7 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$), indicando uma possível contaminação da amostra com proteína proveniente tanto da hemolinfa como a do epitélio intestinal. Para o CDA MS todos os sistemas apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre eles, resultando em $59,5 \pm 0,6\%$, $61,5 \pm 0,8\%$ e $54,2 \pm 1,18\%$ para SCD, SCS e SDIS respectivamente. Este resultado indica que as fezes coletadas no SCS sofrem perda de matéria seca, provavelmente devido à ação hidráulica da água, o que gerou um maior CDA MS. Dentre os sistemas avaliados, a coleta por dissecação torna-se inviável pelo número de animais utilizados e pelos possíveis erros no procedimento de coleta quanto à contaminação do material coletado. O sistema que se adequa melhor às condições experimentais para a determinação *in vivo* do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta e matéria seca de dietas e nutrientes para camarões marinhos é o sistema de coleta por decantação, pois apresenta baixo grau de lixiviação da proteína e matéria seca das fezes e é de fácil manipulação.

Palavras chave: nutrição, digestibilidade, métodos de coleta, camarão

Abstract:

This study had as objective to evaluate the Coefficient of Apparent digestibility of the Crude Protein (CDA PB) and of the Dry Matter (CDA MS) of commercial diet in three different methods of feces collections for nutrition assay with marine shrimps. The tested systems had been: System of feces Collection for Sedimentation (SCD); System of feces Collection for Siphoning (SCS) and feces Collection for Striping (DISS). The commercial diet CDA PB was $81,8 \pm 0,5\%$ for SCD and $82,7 \pm 0,6\%$ for the SCS. Both systems had not presented differences for CDA PB. In the DISS, CDA PB was $55,7 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$), indicating a possible sample contamination with protein from hemolymph or intestinal epithelium. For CDA MS all the systems presented statistical differences ($p < 0,05$) resulting in $59,5 \pm 0,6\%$, $61,5 \pm 0,8\%$ e $54,2 \pm 1,18\%$ for SCD, SCS and SDIS respectively. This result indicates that the feces collected in the SCS suffered dry matter loss, probably due to hydraulical action of the water, what generated a bigger CDA MS. Amongst the evaluated systems, the collection for stripping becomes impracticable because the number of used animals and the possible errors in the collection procedure due to the contamination of the collected material. The system wich had the better adjustments to the experimental conditions for *in vivo* determination for coefficient of apparent digestibility of the crude protein and dry matter of diets and nutrients for marine shrimps was the collection system for decantation, therefore presented low leaching degree of protein and dry matter of feces and easy manipulation.

Key words: nutrition, digestibility, system collect

Introdução

Em estudos de nutrição, o coeficiente de digestibilidade aparente é geralmente utilizado com o objetivo de determinar o valor nutricional dos alimentos. De acordo com CHOUBERT *et al.*, (1979) e MCGOOGAN e REIGH (1996), a digestibilidade de um alimento depende primeiramente da composição química e também da capacidade digestiva do animal para o alimento. Ela é de extrema importância para o atendimento das exigências nutricionais de uma espécie, uma vez que o conhecimento dos hábitos alimentares e o fornecimento de uma dieta equilibrada não são suficientes para assegurar uma resposta positiva no desempenho do animal.

A digestibilidade da dieta é a porção de nutrientes do alimento que é absorvida pelo animal menos a porção perdida nos processos de ingestão e digestão. Estas perdas são classificadas como perdas metabólicas de nitrogênio fecal, a qual se refere a digestibilidade da proteína, e perdas da energia metabólica, referente a digestibilidade da energia (BAYNE E NEWELL, 1983). Por outro lado, a digestibilidade aparente se refere à porção dos nutrientes do alimento que foi absorvida e é calculada como a diferença do total ingerido e o total excretado como fezes (LEE E LAWRENCE, 1997).

LEAVIT (1985) recomendou o uso de métodos gravimétricos para a mensuração da digestibilidade aparente em lagostas. Entretanto, a mensuração precisa da quantidade de alimento ingerida e as quantidades de fezes produzidas em animais aquáticos oferecem muitas dificuldades, particularmente para camarões marinhos, que são animais que possuem uma velocidade de alimentação lenta. Como consequência o uso da técnica de marcadores inertes se tornou o método mais aplicado (SMITH *et al.*, 1985; SHIAU *et al.*, 1992; LEE E LAWRENCE, 1997; JONES E DE SILVA, 1998).

A determinação da digestibilidade *in vivo* em animais aquáticos é baseada na determinação da quantidade do marcador inerte (óxido de cromo, Cr_2O_3) nas fezes, o qual é incorporado na ração. Para o uso deste método é essencial que se tenha um sistema eficiente de coleta de fezes no meio aquático (MARTINEZ-PALACIOS *et al.*, 2001)

O sistema mais simples de coleta fecal é o sifonamento do material do fundo do tanque ou aquário. Porém esta técnica pode levar a numerosos erros, dentre eles a lixiviação dos nutrientes e da matéria seca e a contaminação com os restos de ração (MOURINO e STEFANI, 2006).

Um sistema eficiente foi desenvolvido para peixes por CHO *et al.* (1985). Este sistema chamado de "Guelph" usa um fluxo de água com baixa velocidade em sentido vertical para baixo, de forma que as fezes decantem no centro do tanque, sendo recolhidas em um tubo coletor. Este sistema funciona bem para peixes e tem sido amplamente utilizado (HAJEN *et al.*, 1993). Contudo, para camarões algumas dificuldades foram observadas, pois estes são animais bentônicos e isto faz com que exista um substrato para se apoiarem. Além disso, estes animais possuem hábitos coprofágicos, gerando a necessidade de impedir que eles entrem em contato com as próprias fezes (FAIR *et al.*, 1980). Como consequência, muitos trabalhos com digestibilidade para camarões foram realizados com sistemas de sifonamento (CLAWSON e LOVELL, 1992; LIM, 1993).

A determinação dos coeficientes de digestibilidade para as diferentes espécies de organismos aquáticos em diferentes laboratórios de nutrição são difíceis de serem comparados, devido à falta de padronização de metodologias, tanto para os sistemas de alimentação como para o sistema de coleta de fezes (LEE E LAWRENCE, 1997). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de trabalhos que busquem examinar as diferenças entre os diferentes sistemas de coleta de fezes para camarões marinhos.

Este estudo teve como objetivo avaliar o Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Proteína Bruta (CDA PB) e da Matéria Seca (CDA MS) de ração comercial em três diferentes sistemas de coletas de fezes (decantação, sifonamento e dissecação) para ensaios de nutrição com camarões marinhos.

Material e Métodos

Determinação do tempo de passagem e esvaziamento gástrico

Foram utilizados 30 camarões com peso médio de $8,0 \pm 0,5$ g para avaliar o número de animais necessários, o tempo de passagem e de esvaziamento gástrico dos animais antes da avaliação dos sistemas de coleta de fezes.

Para a determinação do tempo de passagem e esvaziamento gástrico da dieta para camarões, os animais foram alimentados com ração comercial (35% PB), e após o 10º dia foi iniciada a alimentação contendo óxido de cromo (0,5% Cr_2O_3). As fezes foram coletadas em intervalos de tempo de 30 minutos e quando observado a presença da coloração verde nas fezes foi determinando o tempo de passagem. Para a determinação do tempo de esvaziamento gástrico foi suspenso o fornecimento da dieta e a cada hora foi observada a produção de fezes até não ser mais observada fezes no tanque de coleta.

Avaliação de métodos de coleta de fezes.

Para a avaliação dos métodos de coletas de fezes foram utilizados 120 camarões com peso médio de $8,0 \pm 0,5$ g. Foram testados dois sistemas de coleta das fezes: tanque cilindro-cônico com tela e coleta por sedimentação (SCD); tanque circular com fundo parabólico e coleta por sifonamento (SCS) e comparados com a coleta de fezes por dissecação dos animais (DISS). Foram utilizadas 3 réplicas para cada tipo de sistema testado com a densidade de 20 animais/tanque obtida em ensaios anteriores e foram avaliados o Coeficiente de Digestibilidade Aparente da Proteína Bruta (CDA PB) e da Matéria Seca (CDA MS) da dieta comercial (Figura-1) .

Antes de começar as coletas de fezes os camarões passaram por 10 dias de aclimação com ração comercial (35 % PB), a qual foi adicionada um marcador inerte (0,5% Cr_2O_3). Foram distribuídas 3 alimentações por dia em bandejas de alimentação, de forma a totalizar 3% da biomassa.

Durante o período de coleta nos diferentes sistemas, a ração foi fornecida 3 vezes ao dia (8:00, 14:00 e 20:00h). O tempo de alimentação foi de 40 min. Após este período, retirava-se a bandeja de alimentação e era feita a higienização dos tanques, a fim de eliminar a sujeira e restos de ração acumulados no fundo do tanque durante o período de alimentação. O período de coleta foi 15 dias.

Sistema de Coleta por Decantação (SCD)

Foram utilizados 3 tanques (tipo incubadora) com capacidade de 100 litros (Figura: 1A), contendo gaiolas povoadas com 20 camarões cada (n=60). As fezes foram capturadas na extremidade inferior do tanque onde ficavam depositadas em um tubo falcon acoplado a um registro de esfera, os tubos contendo as fezes eram retirados em intervalos de 30 minutos contados a partir da retirada da bandeja de alimentação e descarte da água do fundo dos tanques que continham restos de ração não ingeridos. As fezes coletadas foram então depositadas em potes plásticos para o armazenamento a -20°C.

Sistema de Coleta por Sifonamento (SCS)

Foram utilizados 3 tanques circulares (100L de capacidade), onde foi instalado um cano central e um dreno com tela de 500 µm. Nestes tanques a renovação de água foi constante (1L. min.⁻¹). O tanque possui um fundo no qual as fezes precipitavam levemente, tendendo a se acumular próximo ao dreno central. O fluxo de abastecimento de água foi usado de forma a criar uma corrente circular dentro do tanque para que houvesse uma concentração das fezes no centro (Figura 1B). Cada tanque foi estocado com uma gaiola contendo 20 camarões (n=60). As fezes foram coletadas através da sifonagem do fundo do tanque com o auxílio de uma mangueira de silicone (5 mm de diâmetro) e uma tela de 40 µm assim que começaram a aparecer, e após intervalos de 30 minutos, para evitar lixiviação de nutrientes. As fezes foram retiradas da tela com o auxílio de uma pinça e armazenadas em potes de plástico a uma temperatura de -20°C.

Coleta de fezes por dissecação (DISS)

Foram utilizados 3 tanques circulares de 8000 litros, contendo 200 camarões por tanque (n=600), com renovação constante e fluxo de água a 1L. min.⁻¹ e temperatura de 29 °C. Após 7 dias de aclimação, estes camarões foram alimentados durante 10 dias com a mesma ração utilizada anteriormente contendo óxido de crômio. Após este período os camarões foram retirados e sacrificados por choque térmico em gelo. Foi realizado um corte no último segmento de cada camarão para facilitar a coleta, em seguida era realizada uma leve pressão seguida de um deslizamento no sentido da parte médio posterior do intestino para o último segmento, de modo a forçar as fezes contidas no intestino a saírem pelo corte. O material foi coletado com auxílio de uma pinça, colocado em um recipiente e congelado a -20 °C.

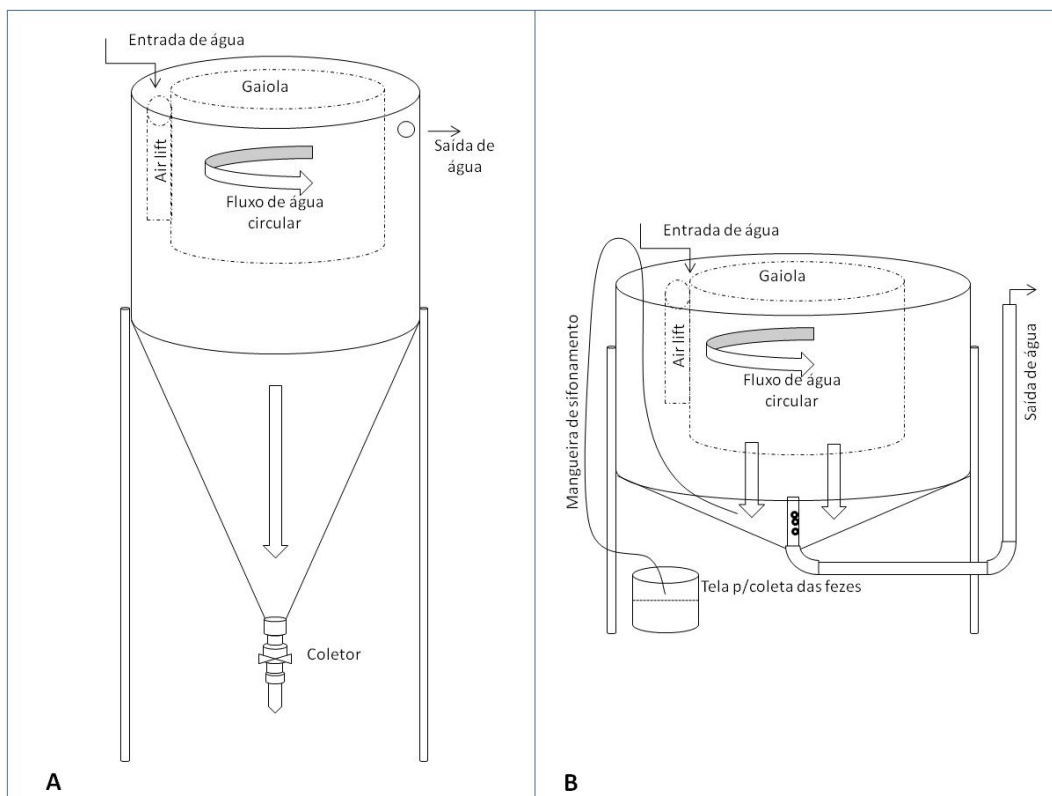


Figura 1: Sistemas de coletas avaliados; **A**: Sistema de Coleta por Decantação (SCD); **B**: Sistema de Coleta por Sifonamento (SCS).

Determinação do Coeficiente de Digestibilidade da Proteína (CDA PB) e Matéria Seca (CDA MS)

As análises das dietas e das fezes seguiram a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1999). A análise de óxido de crômio seguiu a metodologia descrita por BREMER NETO *et al.* (2003). A dieta foi submetida às análises de matéria seca (secagem a 105 °C, até peso constante), proteína (Kjeldahl, N x 6,25), e óxido de crômio (método colorimétrico). Nas fezes, foram analisados os teores de proteína bruta, matéria seca e óxido de crômio, sendo que a quantidade de fezes foi obtida por meio da coleta em dias sucessivos até atingir 3 g de matéria seca. Antes das análises, as fezes foram moídas e homogêneas em gral e pistilo. Para a quantificação do teor de óxido de crômio, as amostras das dietas e das fezes (0,1g) foram digeridas com 3 mL de ácido nítrico e 2 mL de ácido perclórico em balões Kjeldahl a 400 °C por 40 min, até obtenção de uma coloração amarelada. Após diluição de 1 L de água destilada, a absorbância foi lida (550 nm) e a concentração de óxido de crômio determinada através da comparação com a dosagem de uma curva padrão.

Para a determinação do CDA para matéria seca foi utilizada a equação (BELAL, 2005):

$$CDA\% = 100 - \frac{100 \times \% \text{ indicador na ração}}{\% \text{ indicador nas fezes}}$$

Para a determinação do CDA para proteína bruta foi utilizada a equação (NOSE, 1960):

$$CDA\% = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ marcador na dieta}}{\% \text{ marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{ proteína nas fezes}}{\% \text{ proteína da dieta}} \right) \right]$$

Resultados e Discussão:

O tempo de passagem médio foi de 42 ± 4 min. e o tempo de esvaziamento gástrico foi de 376 ± 15 min. Foi observado que 60 min após o início da defecação ocorreu a maior produção de fezes terminando após seis horas. Em *Penaeus setiferus*, Hentschel e Feller (1990) observaram que o proventrículo do camarão está completamente cheio com no mínimo 2 a 3 horas após a ingestão do alimento. Segundo Cockcroft e McLachlan (1986), juvenis e adultos de *Macropetasma africanus* esvaziam o intestino entre 2 e 4 horas após a captura. Para *Penaeus subtilis* a taxa média de esvaziamento gástrico é de 28% por hora, o esvaziamento total do estômago é esperado entre 4 a 5 horas após o início da alimentação (NUNES e PARSONS, 2000).

O CDA PB para o SCD foi $81,80 \pm 0,58\%$, e no SCS foi $82,7 \pm 0,63\%$, ambos os sistemas não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1). Este resultado evidencia que os dois sistemas são adequados para a estimativa do CDA PB, corroborando com os resultados de MARTÍNEZ-PALACIOS *et al* (2001) onde ambos os sistemas de coleta não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, a coleta de fezes por dissecação (Tabela 1) apresentou um menor CDA PB ($55,70 \pm 0,78\%$) quando comparado com os dois sistemas, em média essa diferença foi de 26 % ($p < 0,05$). Neste método foi observada dificuldade em se obter a quantidade mínima de fezes para análises de óxido de crômio e proteína bruta, devido à pequena quantidade de material encontrada nos segmentos finais do trato digestivo. Os resultados obtidos com esta metodologia podem ter sido subestimados uma vez que a quantidade de nutrientes varia conforme a distancia percorrida pelo alimento no intestino, desta forma os nutrientes da amostra podem não ter sido absorvidos completamente. Outro fator é a contaminação das fezes com hemolinfa ou a mucosa do intestino, visto que as fezes foram retiradas espremendo-se as partes do trato digestório. Resultado semelhante foi observado por MOURINO e STEFANI (2006) que avaliou métodos de coleta de fezes para determinação da digestibilidade protéica em rã-touro (*Rana catesbeiana*). De acordo com estes autores *apud* AUSTRENG (1978), a pressão durante a dissecação pode provocar ocasionalmente injúrias nas vísceras e, desta forma, a adição de nitrogênio endógeno às fezes, como muco e células epiteliais, diminuindo assim os valores da digestibilidade.

Tabela 1: Média e desvio padrão do CDA PB e CDA MS obtida após 15 dias de coleta nos sistemas SCD, SCS e DISS. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os sistemas pelo teste-*t* ($p < 0,05$).

	CDA PB	CDA MS
SCD	$81,83 \pm 0,586$ a	$59,53 \pm 0,685$ a
SCS	$82,74 \pm 0,634$ a	$61,53 \pm 0,835$ b
DISS	$55,65 \pm 0,781$ b	$54,21 \pm 1,188$ c

O sistema que apresentou o maior CDA MS foi o SCS ($61,5 \pm 0,83$ %) sendo 2 % superior ao SCD ($59,5 \pm 0,68$ %) (Tabela 1), e ambos os sistemas foram superiores a DISS ($54,5 \pm 1,18$ %) ($p > 0,05$). Este resultado indica que o sifonamento apresenta maior grau de desintegração das fezes,

pois quando estas são retidas na tela de coleta acabam sofrendo um desgaste gerado pelo fluxo de água corrente, resultando em um maior CDA MS para este sistema de coleta

O sistema que se adéqua melhor nas condições experimentais deste estudo para a determinação *in vivo* do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta e matéria seca de dietas e nutrientes para camarões marinhos é o sistema de coleta por decantação.

Referencias:

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC**, Washington DC, 1999. 16 ed., 1141pp.

AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of from different segments of the gastrointestinal tract. **Aquaculture**, v.13, p.265-272, 1978.

BAYNE, B.C. & R.C. NEWELL. Physiological energetics of marine mollusks, p. 407-515. In: SALEUDDIN, S.S.M.; WILBUR, K.M.; **The mollusca physiology**, New York, Academic Press, 550p, 1983.

BELAL, I. E. H. A review of some fish nutrition methodologies. **Biosource Technology**. v.96, p.395-402, 2005.

BREMER NETO, et al. Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.249-255, 2003.

CHO, C.Y. SLINGER S.J. Apparent digestibility measurement feedstuffs for rainbow trout. In: HALVER, J.E.; TIEWS, K. **Fish Nutrition and Fishfeed Technology**, Germany, 1979, v.2, p. 239-247.

CHOUBERT, G.; et al, Continuous quantitative automatic collector for fish feces. **Progressive Fish Culturist.**, v.29, p.64-67, 1979.

CLAWSON, J.A.; LOVELL, T.; Improvement of nutritional value of *Artemia* for hybrid striped bass/white bass (*Morone saxatilis* x *M.chrysops*) larvae by *n-3* HUFA enrichment of nauplii with menhaden oil. **Aquaculture**, v.108, p.125-134, 1992.

COCKCROFT, A.; MCLACHLAN, A.; Food and feeding habits of the surf zone penaeid prawn *Macropetasma africanus* (Balss). **Mar. Ecol.** v. 7, p. 345-357, 1986.

FAIR, P.H. et al. Effects of dietary fiber on growth, assimilation and cellulase activity of the prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Proceedings of the World Aquaculture Society**, v2, p. 369-381. 1980

HAJEN, W.; et al. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile and chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) in sea water, **Validation of technique. Aquaculture** v.112, p.321-332, 1993.

HENTSCHEL, B.T.; FELLER, R.J.; Quantitative immunoassay of the proventricular contents of white shrimp *Penaeus setiferus* Linnaeus: a laboratory study, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.139, p. 85-99, 1990.

JONES, P. L.; DE SILVA, S. S; Comparison of internal and external markers in digestibility studies involving the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). **Aquac. Res.**, v.29, p.487-493, 1998.

LEAVITT, D.F.; An evaluation of gravimetric and inert marker techniques to measure digestibility in the American lobster. **Aquaculture** v.47, p.131- 142, 1985

- LEE, G. P.; LAWRENCE, L.A.; Digestibility, in: L. R. D'ABRAMO, **Crustacean Nutrition**. Advances in World Aquaculture. World Aquaculture Society. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana. v.6, p.194-260, 1997.
- LIM, C. Effect of dietary pH on amino acid utilisation by shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture** v. 114, p.293-303, 1993.
- MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; et al. A modified chamber designed for estimation of digestibility in shrimp. **North American Journal of Aquaculture**. v.63, p.252-255, 2001
- MCGOOGAN, B. B.; REIGH, R. C.; Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. **Aquaculture**, v.141, p. 233-244, 1996.
- MOURINO, J. L. P.; STEFANI, M. V., Avaliação de métodos de coleta de fezes para determinação da digestibilidade protéica em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Cienc. Rural**, v.36, p.954-958, 2006.
- NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J.; Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the southern Brown shrimp *Penaeus subtilis*. **Aquaculture**, v.187, p.133-151, 2000.
- SHIAU, S. Y.; et al, Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and seawater. **J. Appl. Aquac.** v.1, p.47-53, 1992.
- SMITH, L.L.; et al. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* effects of dietary protein level and protein source, **Aquaculture**, v6, p85-96. 1985.

Avaliação do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca de dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* para *Litopennaeus vannamei*.

Celso Carlos Buglione Neto¹, José Luiz Mourino¹, Felipe do Nascimento Vieira¹, Bruno Correia¹ Adolfo Jatobá¹, Aldenice de Nazaré Silva Pereira¹, Renato Kitagima², Débora Machado Fracalossi², Roberto Edemar Andreatta¹

¹ – Laboratório de Camarões Marinho, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Endereço: Beco dos Coroas, (fundos) - Cep: 88062-601. Caixa Postal: 10.136, Barra da Lagoa, Florianópolis SC, Brasil, Fone: +55 (48) 3231-3400, Fax: 3231 -3434

² – Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Endereço: Rodovia SC 406-Km 3, nº 3532 – Cep: 88066-000 Lagoa do Perí, Florianópolis SC, Brasil, Fone: + 55 (48) 3389-5216

Key-words: Digestibility, probiotic, shrimp, protein, energy, microbiology.

Resumo:

O cultivo de camarão requer o fornecimento de nutrientes através da suplementação de dietas balanceadas. A otimização nutricional é importante por razões biológicas, ambientais, sanitárias e econômicas, sendo necessária para o desenvolvimento de uma aquicultura sustentável. Este estudo avaliou o uso de ração comercial suplementada com *L. plantarum* isolada do trato digestivo de camarões em relação ao coeficiente de digestibilidade aparente de proteína (CDA PB) e energia (CDA E) da dieta. Foi utilizado o método de avaliação da digestibilidade *in vivo* onde os camarões foram estocados em gaiolas, dentro de tanques cilindro cônicos. As fezes foram coletadas através de armadilhas colocadas no fundo do cone. Para avaliação do CDA PB e CDA E, foi utilizado um marcador inerte (0,5% Cr₂O₃), sendo quantificados os teores de proteína e energia na ração e nas fezes dos animais alimentados com as rações suplementadas com *L. plantarum*. Nas dietas contendo *L. plantarum* foi observado um ganho de 2% no CDAPB que foi de 84,18 ± 0,35 % e 82,73 ± 1,012 para dieta controle (p<0,05), para o CDAE o ganho foi de 2,63% sendo 81,28 ± 0,16% para dieta contendo *L. plantarum* e 78,63 ± 0,93% para dieta controle (p<0,05). A suplementação com *L. plantarum* aumentou o CDAPB e o CDAE na dieta testada demonstrando efeitos nutricionais positivos para o uso na nutrição de camarões marinhos.

Introdução:

A aquicultura é o setor de produção de alimento de mais rápido crescimento no mundo (MORIARTY, 1999). O incremento da produção ocorreu pelo aumento da área e intensificação dos cultivos, gerando uma necessidade de se aumentar a quantidade de insumos como ração, fertilizantes e quimioterápicos. Esta intensificação tornou a aquicultura um potencial contaminador do ambiente aquático e umas das responsáveis pela degradação dos corpos hídricos (PILLAY, 1992).

Com a expansão do número de fazendas de criação de camarão e com o aumento da intensificação dos sistemas de cultivo, existe uma demanda cada vez maior por uma dieta balanceada nutricionalmente e com valor acessível (LIÑÁN-CABELLO *et al.*, 2002; BAUTISTA-TERUEL *et al.*, 2003).

A ração chega a representar 60% dos custos variáveis da carcinicultura marinha (AKIYAMA *et al.*, 1992; SARAC *et al.*, 1993). Esta deve conter todos os nutrientes para o organismo cultivado, ser altamente digestível com nutrientes disponíveis para assimilação e estar livre de fatores antinutricionais. Em acréscimo, A ração deve conter diversas características incluindo propriedades organolépticas como odor, textura, e sabor, e também propriedades físicas como o tamanho da partícula. (SUDARYONO *et al.*, 1995).

Um alimento funcional deve possuir um componente que gera um benefício para o sistema imune ou fisiológico, valendo-se dos componentes já existentes na dieta (CLYDESDALE, 1997). Probióticos têm sido relatados por sua atividade biológica ativa (HASLER, 2002). A suplementação de uma ou mais cepas de microorganismos capazes de melhorar a saúde do animal enquadram os probióticos como um aditivo funcional (FULLER, 1992). O probiótico de acordo com VERSCHUERE *et al.*, (2000), é definido como “microorganismo vivo, que ao ser ministrado a tanques de cultivo atua beneficemente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, o balanço de bactérias no trato digestório ou o ambiente de cultivo (viveiro). Gatesoupe (1999) definiu probiótico como: “microorganismo vivo que ao ser ministrado ao cultivo coloniza o trato digestório dos animais com o objetivo de melhorar a saúde destes animais”.

Os lactobacilos constituem um grupo de bactérias em formato de bastonetes, gram-positivos, caracterizados por sua habilidade de produzir diversos metabólitos secundários como antibióticos, bioinseticidas, biocinas, ácidos orgânicos e enzimas (FERRARI *et al.*, 1993; GODFREY e WEST, 1996; OLMOS *et al.*, 1996, 1997, 1998; OLMOS, 2003). As enzimas de lactobacilos são muito eficientes em romper uma larga variedade de carboidratos, lipídios e proteínas (SONNENSCHNEIN *et al.*, 1993). A fermentação de peixe ou de resíduo de peixe com ácidos orgânicos, com ou sem a adição de bactérias ácido-láticas ou de fungos filamentosos, é um método tradicional de preservar e melhorar seu valor nutricional como ingrediente da ração animal (LAINING, 2003 *apud* JONES, 1975; HASSAN e HEATH, 1986). Entretanto, a fermentação é mais usualmente aplicada para o resíduo de peixe, sendo usada com sucesso para aumentar a digestibilidade aparente da proteína e o valor nutritivo total nas dietas para alevinos de peixe (LAINING, 2003 *apud* MUKHOPADHYAY e RAY, 1999). Observando as possíveis vantagens que as bactérias ácido-láticas podem trazer, estas são ótimas candidatas para serem utilizadas como uma possível ferramenta na melhoria da digestibilidade da ração para camarões peneídeos.

Em estudos de nutrição, os coeficientes de digestibilidade aparente são geralmente utilizados com o objetivo de determinar o valor nutricional de um alimento. De acordo com CHOUBERT *et al* (1979) e MCGOOGAN e REIGH (1996), a digestibilidade do ingrediente de um alimento depende, primeiramente, da composição química e também da capacidade digestiva do animal para o alimento. Ela é de extrema importância para o atendimento das exigências nutricionais de uma espécie, uma vez que o conhecimento dos hábitos alimentares e o fornecimento de uma dieta equilibrada não são suficientes para assegurar resposta positiva no desempenho do animal.

Este projeto avaliou o uso de ração suplementada ou não com uma cepa de bactéria nativa ácido láctica isolada de camarões, quanto ao coeficiente de digestibilidade aparente da proteína e energia de dieta comercial para camarões peneídeos.

Material e Métodos:

Cepa bacteriana:

A cepa de probiótico utilizada foi o *Lactobacillus plantarum*, isolada de camarões adultos de *L. vannamei* (Vieira et al., 2007) e mantida na coleção de microorganismos da Universidade Estadual de Campinas sobre o número de acesso de CPQBA 007 07 DRM01.

Preparo da dieta com a cepa de *Lactobacillus plantarum*:

Para o preparo das dietas, uma ração comercial (tabela 2) foi moída em um moinho com peneira de 0,01 mm até apresentar o aspecto de farinha, em seguida foi adicionado óxido de cromo (0,5%), amido (5%) e água até a massa apresentar uma consistência adequada para passar na peletizadora. Após a massa passar na peletizadora os pellets foram colocados em uma estufa com circulação de ar a uma temperatura de 50 °C por 24hs para secagem. A ração preparada foi então aspergida com 200 mL. Kg⁻¹ de inóculo de 1x10⁹ UFC. mL⁻¹ de bactérias lácticas (Ração + *L.plantarum*). A ração aspergida foi hermeticamente fechada em sacos plásticos e incubada a 35°C por 24h. Após este período, a ração foi transferida para uma segunda estufa com circulação de ar para secagem a 35°C por 24h. Três amostras de 1g da ração seca foram maceradas em 1mL de solução salina (1,5% NaCl) estéril e diluídas em série (1:10). As diluições 10⁻⁵ até 10⁻⁹ foram semeadas em placas com meio de cultura MRS e incubadas a 35°C por 48h para estimar a contagem de unidades formadoras de colônia viáveis (UFC) de bactérias probióticas na ração oferecida aos animais. A ração do tratamento controle passou pelo mesmo processo da ração suplementada com probióticos, porém foi aspergida somente com meio de cultura estéril (Ração + meio de cultura).

Para os ensaios de digestibilidade das dietas, tanto na dieta contendo bactérias, como na dieta referência (Ração + meio de cultura), foi realizada a análise de proteína bruta, matéria seca, energia e a quantificação do número de unidades formadoras de colônias de bactérias probióticas através do método de contagem direta em placas com Agar MRS para avaliar o efeito do processo de preparo da ração para o experimento.

Tabela 2: Composição centesimal anunciada pelo fabricante da dieta utilizada nos experimentos:

Nutrientes	Quantidade
Proteína Bruta	35 %
Extrato Etéreo (min)	7,5 %
Matéria Fibrosa (Max)	5%
Material Mineral (Max.)	13%
Cálcio (Max)	3%
Fósforo	1,45%
Vitamina A (U.I)	4000
Vitamina D3 (U.I)	2000
Vitamina E (U.I)	150
Vitamina C (mg)	139

Avaliação da colonização da cepa de bactéria probiótica no trato digestivo dos animais e nas fezes produzidas:

Com o objetivo de determinar a eficiência da colonização do probiótico no animal foram retiradas amostras de trato digestivo e de fezes, as amostras foram então macerada e diluídas na proporção 1:1 em solução salina estéril (1,5%) e diluídas em série 1:10 e as diluições 10^{-5} a 10^{-9} foram semeadas em placas com meio de cultura Agar MRS e incubadas a 35°C por 48hs para estimar a contagem de unidades formadoras de colônias viáveis (UFC) de bactérias probióticas no trato digestivo e nas fezes

Sistema de coleta de fezes para a determinação do Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína energia e matéria seca das dietas

Para cada dieta (dieta com probiótico e dieta controle) foram utilizados 4 tanques de formato cilindro cônico com capacidade para 100 litros contendo 20 camarões cada com peso médio de 10gr. Os tanques possuíam grades protetoras para que os camarões não entrassem em contato com as fezes no fundo do cilindro. O abastecimento de água era feito pela superfície. Um fluxo de abastecimento contínuo ($1L \cdot min^{-1}$) foi usado de forma a criar uma corrente circular dentro do tanque para que houvesse a concentração das fezes no centro. As fezes foram capturadas na extremidade inferior do tanque onde ficavam depositadas em um tubo falcon acoplado a um registro de esfera.

A ração foi fornecida 4 vezes ao dia (8:00, 12:00, 16:00 e 20:00) em uma quantidade equivalente a 3% de biomassa. O tempo de alimentação foi de 40min. Após este período, para evitar a lixiviação, as fezes foram coletadas nos tubos falcon assim que começaram a aparecer, decorridos intervalos de 30 minutos. No tubo de vidro contendo as fezes já depositadas, foi desprezada a água e

as fezes foram pesadas e depositadas em frasco plásticos para armazenagem a -20°C. A coleta de fezes foi finalizada quando se obteve um total de 6 g de fezes (peso seco).

Determinação do coeficiente de digestibilidade aparente de proteína e energia nas dietas:

As análises das dietas e das fezes seguiram a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (1999), a análise de óxido de crômio seguiu metodologia descrita por BREMER NETO *et al.* (2003). As dietas foram submetidas às análises de matéria seca (secagem a 105°C), cinzas (queima a 550 °C), proteína (Kjeldahl, N x 6,25), extrato etéreo (Soxhlet após hidrólise ácida), fibra (detergente ácido), energia bruta (EB) (bomba calorimétrica adiabática) e óxido de crômio (método colorimétrico). Nas fezes, foram analisados os teores de proteína bruta, energia bruta e óxido de crômio. Antes das análises, as fezes foram moídas e homogeneizadas em gral e pistilo. Para a quantificação do óxido de crômio, as amostras das dietas e das fezes (0,1g) foram digeridas com 3 mL de ácido nítrico e 2 mL de ácido perclórico em balões Kjeldahl a 400 °C por 40 min, até obtenção de uma coloração amarelada. Após diluição de 1 L de água destilada, a absorbância foi lida (550 nm) e a concentração de óxido de crômio determinada através da comparação com a dosagem de uma curva padrão.

Para a determinação do CDA para matéria seca foi utilizada a equação (BELAL, 2005):

$$CDA\% = 100 - \frac{100 \times \% \text{ indicador na ração}}{\% \text{ indicador nas fezes}}$$

Para a determinação do CDA para proteína bruta foi utilizada a equação (NOSE, 1960):

$$CDA\% = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ marcador na dieta}}{\% \text{ marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{ proteína nas fezes}}{\% \text{ proteína da dieta}} \right) \right]$$

Análise estatística:

Os resultados foram analisados pelo teste-t, sendo admitidas diferenças significativas se as medias apresentarem diferenças ao nível de significância de 5%.

Resultados:

A temperatura durante o experimento foi de 29,5 ± 0,51°C, o pH de 7,8±0,31 e a amônia 0,01 ppm, não havendo diferença significativa entre os tratamentos em nenhum parâmetro de qualidade de água analisado.

Após a ração ser reprocessada (Tabela-3) o nível de proteína bruta foi de 34,67 ± 0,046%, apresentando valores próximos ao anunciado pelo fabricante, o nível de energia foi de 3259,33 ± 55,89 kcal/kg e de matéria seca em 95,48 ± 0,345%. A adição do meio de cultura e da bactéria *L. plantarum* aumentaram os níveis de proteína da dieta para 36,03 ± 0,470% e 36,22 ± 0,248% respectivamente (P>0,05). O mesmo resultado foi observado para os níveis de energia, 3775,87 ±

109,50 kcal/kg para a ração + meio de cultura e $4080,14 \pm 222,36$ kcal para ração + *L. plantarum* ($p > 0,05$).

Tabela 3: Análise dos parâmetros nutricionais das rações utilizadas no experimento após o processo de preparo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as rações pelo teste-*t* ($p < 0,05$):

	Proteína (%)	Energia (kcal/kg)	Matéria Seca (%)
	Media ± DP	Media ± DP	Media ± DP
Ração	$34,67 \pm 0,056^a$	$3259,33 \pm 55,89^a$	$95,48 \pm 0,345^a$
Ração + Meio de cultura	$36,03 \pm 0,470^b$	$3775,87 \pm 109,50^b$	$93,59 \pm 0,54^b$
Ração + <i>L.plantarum</i>	$36,22 \pm 0,248^b$	$4080,14 \pm 222,36^b$	$93,64 \pm 1,098^{ab}$

Após o processo de incorporação da bactéria na dieta a contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias ácido lácticas (UFC) em agar MRS foi de $1,5 \cdot 10^6$ UFC.g⁻¹ na ração. Já a análise realizada com amostras do trato digestivo dos animais demonstrou que esta concentração é similar ao encontrado na ração. Nas fezes a concentração de bactérias ácido-lácticas caiu para $8,6 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ (Figura-2).

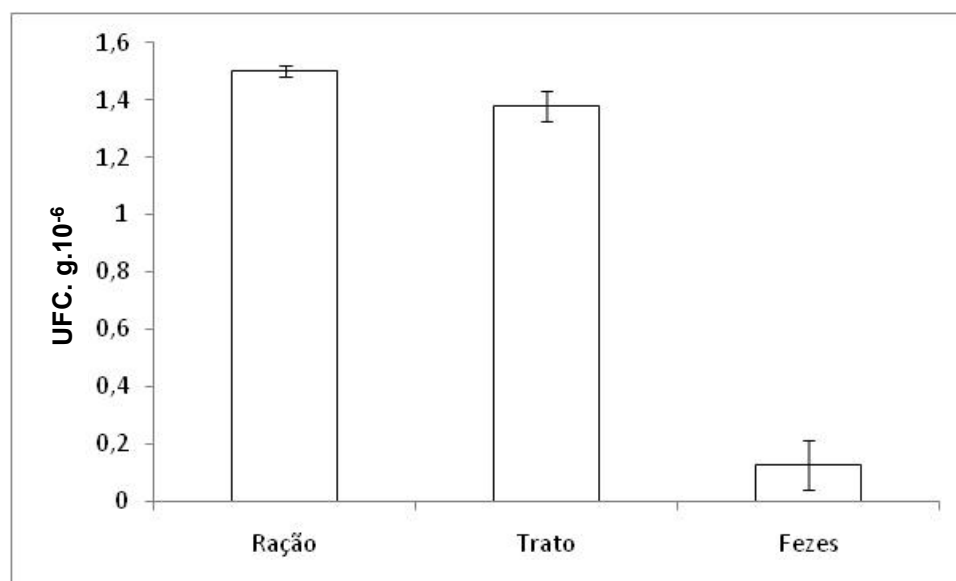


Figura 2: Quantificação de bactérias ácido-lácticas na ração, trato digestivo e fezes em camarões alimentados com a dieta suplementada com probiótico

A dieta com *L.plantarum* apresentou o maior coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA PB), em média $84,185 \pm 0,351\%$ (Tabela-4) em relação a dieta controle que apresentou um CDA PB de $82,73 \pm 1,012\%$. Também foi observado um aumento ($p < 0,05$) para o CDA E na dieta contendo *L.plantarum* ($81,28 \pm 0,16\%$) em relação à dieta controle ($78,63 \pm 0,93\%$). Não foram observadas diferenças significativas nos demais parâmetros avaliados.

Tabela 4: Resultados dos parâmetros nutricionais avaliados nas dietas. : Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA PB), da matéria seca (CDA MS), da energia (CDA E), quantidade de fezes produzida e consumo diário ao longo do experimento.

Parâmetros	<i>L.plantarum</i> Media±Dp	Controle Media±Dp
CDAMS (%)	63,30 ± 0,23	62,50 ± 1,23
CDAPB (%)	84,18 ± 0,35*	82,73 ± 1,012
CDAE (%)	81,28 ± 0,16*	78,63 ± 0,93

* indica diferença estatística pelo teste-t (p>0,05)

Discussão:

O estudo demonstrou que a cepa bacteriana *L. plantarum* possui adesão ao epitélio intestinal de camarões, uma vez que a contagem de bactérias em MRS foi maior no intestino do que nas fezes. A adesão é o primeiro passo de um microorganismo no processo de colonização intestinal, por tanto é essencial que a bactéria a ser escolhida para a preparação probiótica deva aderir bem ao epitélio gastrointestinal.

A adesão de bactérias ácido lácticas, em animais endotérmicos, é complicada pelo fato que elas tem demonstrado uma especificidade hospedeiro-bacteria. (FULLER, 1986). Bactérias ácido lácticas isoladas de roedores não aderem nas células epiteliais de galinhas e vice versa. Tannock (1990) sugeriu que esta especificidade pode ser resultado da interação de lectinas com outras glicoproteínas e glicolipídeos. As lectinas podem derivar de bactérias ou de células epiteliais ou alternativamente da dieta do hospedeiro, e podem revestir a superfície epitelial. Elas poderiam então se ligar a carboidratos específicos na superfície das células epiteliais ou dos lactobacilos.

Outro fator que pode influenciar a colonização do trato digestório por bactérias é a utilização do óxido de crômio. Este marcador é um dos mais utilizados para a determinação da digestibilidade dos nutrientes em mamíferos e em peixes, e até recentemente tem sido considerado como um composto inerte. Entretanto, em estudos microbiológicos (RINGO, 1993 b,c,1994), salmões do ártico alimentados com dieta contendo oxido crômico apresentaram um declínio no gênero de bactérias gram-negativas nas amostras de intestino e fezes, enquanto que a contagem de lactobacilos se manteve estável. Observações similares foram feitas quando bactérias gram negativas isoladas do intestino, e *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.* cresceram em placas de TSA (Tryptic Soy Agar) com glicose e adicionado ou não oxido crômico . A razão pelo declínio de microorganismo no trato digestório não esta elucidado, mas Ringo (1993c) formulou duas hipóteses:, a) o óxido de crômio afeta os sítios de ligação na parede do instestino ou b: microorganismos oxidase-positivo podem ser mais sensíveis a presença ao oxido crômico. Sabe-se que qualquer alteração no tipo de nutriente e outros fatores adversos da dieta ou das condições ambientais podem alterar o ecossistema no intestino de camarões. Isto pode causar uma situação estressante como uma baixa taxa de ingestão, levando a uma menor quantidade de fezes (TANNOCK, 1983).

Durante o estresse, pode haver um desequilíbrio do balanço da microbiota bacteriana. Estudos baseados em animais endotérmicos têm demonstrado um estresse crônico e a formação da hierarquia social também alteram a microbiota, diminuindo a quantidade de lactobacilos (TANNOCK e

SAVAGE, 1974; TANNOCK, 1983; LENCNER et al., 1984; LIZKO et al., 1984; KLAASEN et al., 1990). No contrário, o estresse aumenta a quantidade de coliformes onde o nível de esteróides corticóides endógenos aumenta a secreção de muco. Os probióticos têm potencial para restabelecer o balanço da microbiota intestinal nestas situações. Em estudos anteriores, Viera et al. 2008 demonstrou que camarões alimentados com ração suplementada com *L. palantarum* apresentaram uma menor quantidade de vibrios no intestino e maior de bactérias ácido lácticas. Esta melhora no equilíbrio da microbiota intestinal pode permitir que os processos digestivos aconteçam de forma mais eficiente, melhorando a digestão.

Algumas pesquisas têm sugerido que certos microorganismos causam um efeito benéfico nos processos digestivos de animais aquáticos. Em peixes, tem sido observado que *Bacteroides* e *Clostridium sp.* tem contribuído para a nutrição do hospedeiro, especialmente fornecendo ácidos graxos e vitaminas (SAKATA, 1990). Alguns microorganismos como *Agrobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Microbacterium sp.*, e *Staphylococcus sp.* podem contribuir ao processo nutricional do salmão (*Salvelinus aplanus*) (RINGO et al., 1995). Além disso, algumas bactérias podem participar de processos digestivos de bivalves produzindo enzimas extracelulares como proteases, lipases assim como o fornecimento de fatores necessários ao crescimento (PRIEUR et al., 1990).

Os resultados obtidos demonstram que houve um aumento significativo no CDAPB e no CDA E para os camarões alimentados com a dieta contendo probiótico. Este aumento pode estar relacionado com uma melhora no equilíbrio da microbiota no intestino ou com uma maior disponibilidade dos nutrientes da dieta gerada pela degradação enzimática pela cepa microbiana. Os aumentos nos componentes não protéicos de energia das dietas (em uma concentração específica da proteína) foram relatados por melhorar o crescimento e reduzir a exigência da proteína através de um menor desperdício proteína em *Fennerpenaeus chinensis* e *Penaeus monodon* (BAUTISTA 1986; XUE et al. 1998). Observações similares foram descritas para a microbiota bacteriana de camarões adultos (*Penaeus chinensis*), onde um complemento de enzimas para a digestão produziu compostos que são assimilados pelo animal (WANG et al., 2000). A microbiota pode servir com uma fonte suplementar de alimento e a atividade microbiana no trato digestivo pode ser uma fonte de vitaminas e aminoácidos essenciais (DALL e MORIARTY, 1983).

As bactérias, particularmente membros do gênero *Bacillus* secretam uma ampla variedade de exoenzimas (MORIARTY, 1996, 1998) e a presença de probióticos pode ainda estimular a produção de enzimas endógenas pelo camarão. Wang 2007 observou uma maior atividade enzimática em camarões alimentados com dieta contendo probióticos o que melhorou a digestão de proteínas, carboidratos, lipídios e celulose, o que poderia explicar a melhora no coeficiente de digestibilidade aparente da proteína e da energia observada neste estudo (Tabela-3). Efeitos similares foram descritos em peixes e camarões, no qual a digestão mostrou-se aumentada consideravelmente em resposta aos probióticos na dieta (LARA-FLORES et al., 2003; TOVAR RAMIREZ et al., 2004; ZIEAEI-NEJAD et al., 2006).

Conclusão:

A adição da bactéria *L.plantarum* na dieta para camarões *L.vannamei*, aumentou o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína e energia, demonstrando efeitos nutricionais positivos para o uso na nutrição.

Referências:

- AKIYAMA, D.M., DOMINY, W.G., LAWRENCE, A.L., 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: Fast, A.W., Lester, L.J. . Eds. , Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam, pp. 535–568.
- BAUTISTA-TERUEL, M.N., EUSEBIO, P., WELSH, T., 2003. Utilization of feed pea *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 225, 121–131.
- BELAL, I. E. H. A review of some fish nutrition methodologies. *Biosource Technology* 96, 395-402, 2005.
- CAIN, K.D., GARLING, D.L. 1995. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery. *Prog. Fish Cult.* 57, 114–119.
- CHOUBERT, G., DE LA NOUE, J., LUQUET, P. Continuous quantitative automatic collector for fish feces. *Progressive Fish Culturist.*, v.29, p.64-67,1979.
- CLYDESDALE, F., 1997. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutrition. Reviews.* 55, 413–422.
- DALL, W., MORIARTY, D.J.W., 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. In: MANTEL, L.H. (Ed.), *The Biology of Crustacea*, vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press.
- FAO, 2002. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Fisheries Department, Rome, 159pp.
- FERRARI, E., JARNAGIN, A.S., SCHMIDT, B.F., 1993. Commercial production of extracellular enzymes. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (Eds.), *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 917–937.
- FULLER, R., 1986. Probiotics. *J. Appl. Bacteriol. Suppl.*, 1S–7S.
- FULLER, R., 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics. The Scientific Basis*. Chapman & Hall, New York, NY, pp. 1–8.
- GODFREY, T., WEST, S., 1996. *Industrial Enzymology*. Macmillan Publishers Inc. , New York, NY, pp. 3–10.
- HASLER, C.M., 2002. Functional foods: benefits, concerns and challenges— A position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition.* 132, 3772–3781.
- HASSAN, T.E., HEATH, J.L., 1986. Biological fermentation of fish waste for potential use in animal and poultry feeds. *Agric. Wastes* 15, 1 –15.
- JONES, I.D., 1975. Effect of processing by fermentation of nutrients. In: Harris, R.S., Karmas, E. (Eds.), *Nutritional Evaluation of Food Processing*. Avi Publication Coy, Westport, CN, USA, pp. 324–354.
- KAMARUDIN, M.S., JONES, D.A., VAY, L., ABIDIN, A.Z., 1994. Ontogenetic changes in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 123, 323–333.
- KLAASEN, H.L.B.M., KOOPMAN, J.P., BEYNEN, A.C., 1990. Effects of age, strain and social hierarchy on colonization of autochthonous, segmented, filamentous bacteria in the ileum of mice. In:

Heidt, P.J., Vossen, J.M., Rusch, V.C._Eds., Microecology and Therapy. Inst. für Microbiologie, Herborn, pp. 17–20.

LAINING A., RACHMANSYAH, AHMAD T., WILLIAMS K., Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*, *Aquaculture* 218 (2003) 529–538

LARA-FLORES, M., OLVERA-NOVOA, M.A., GUZMÁN-MÉNDEZ, B.E., LÓPEZ- MADRID, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216, 193–201

LENCNER, A.A., LENCNER, CH.P., MIKELSAAR, M.E., 1984. The quantitative composition of the gut lactoflora before and after cosmic flights of different duration. *Die Nahrung* 28, 607–613.

LEONEL J., OCHOA-SOLANO, JORGE, OLMOS-SOTO. 2006, The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology* 23 519–525

LIN, C.K., 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), *Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*. World Aquaculture, Baton Rouge, LA, pp. 13–23.

LIÑÁN-CABELLO, M.A., PANIAGUA-MICHEL, J.J., HOPKINS, P.M., 2002. Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquacult.Nutr.* 8, 299–309.

LIZKO, N.N., SILOV, V.M., SYRYCH, G.D., 1984. Particularities in the formation of an intestinal dysbacteriosis in man under extreme conditions. *Die Nahrung* 28, 599–605.

LOVETT, D.L., FELDER, D.L., 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* 178, 144–159.

MCGOOGAN B.B., REIGH R.C., Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture, Volume 141, Issues 3-4, 31 May 1996, Pages 233-244.*

MORIARTY, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R.B., M. Brylinsk, and P. Johnson-Green (eds.) *Microbial bioassays: New frontiers. Proceedings of the Eighth International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

MORIARTY, D.J.W., 1996. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. *Info. Fish Int.* 4, 29–33.

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

MUKHOPADHYAY, N., RAY, A.K., 1999. Effect of fermentation on the nutritive value of sesame seed meal in the diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. *Aquac. Nutr.* 5, 229– 236.

NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., PRIMAVERA, J.H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE, M.C.M., CLAY, J., FOLKE, C., LUBCHENCO, J., MOONEY, H., TROELL, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.

NEW, M.B., WIJKSTROM, U.N., 2002. Use of fish meal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fish meal trap. *FAO Fish. Circ.* 975, 61.

OLMOS, S.J., 2003. Molecular characterization and phylogenetic identification of marine microorganisms. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.

OLMOS, S.J., BOLANOS, V., CAUSEY, S., FERRARI, E., BOLIVAR, F., VALLE, F., 1996. A functional *SpoOA* is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 381, 29–31.

- OLMOS, S.J., DE ANDA, R., FERRARI, E., BOLIVAR, F., VALLE, F., 1997. Effects of the *sinR* and *degU32* (*Hy*) mutations on the regulation of the *aprE* in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 562–567.
- OLMOS, S.J., SANCHEZ, G.A., DEANDA, R., 1998. Regulations of the *aprE* (subtilisin) gene in *abrB* mutants of *Bacillus subtilis*. *Asia Pac. Journal Molecular Biology and Biotechnology.* 6, 97–103.
- PILLAY, T.V.R. 1992. *Aquaculture and the environment*. Fishing News Books. England.
- PRIEUR, G., NICOLAS, J.L., PLUSQUELLEC, A., VIGNEULLE, M., 1990. Interactions between bivalves molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28, 227–352.
- 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.
- RINGØ, E., 1993b. Does chromic oxide (Cr₂O₃) affect faecal lipid and intestinal bacterial flora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)?. *Aquacult. Fish. Manage.* 24, 767–776.
- RINGØ, E., 1993c. The effect of chromic oxide (Cr₂O₃) on aerobic bacterial populations associated with the epithelial mucosa of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Can. J. Microbiol.* 39, 1169–1173.
- RINGØ, E., 1994. The effect of chromic oxide (Cr₂O₃) on faecal lipid and intestinal microflora of sea water reared Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 341–344.
- RINGØ, E., STRØM, E., TABACHECK, J., 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquacult. Res.* 26, 773–789.
- SAKATA, T., 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. In: LESEL, R. (Ed.), *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam, pp. 171–176.
- SARAC, Z., THAGGARD, H., SAUNDERS, J., GRAVEL, M., NEILL, A., COWAN, R.T., 1993. Observations on the chemical composition of some commercial prawn feeds and associated growth responses in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 115, 97–110.
- SONNENSCHNEIN, A.L., LOSICK, R., HOCH, J.A., 1993. *Bacillus subtilis* and Others Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC, 987pp.
- STOREBAKKEN, T., REFSTIE, S., RUYTER, B., 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Ed.), *Soy in Animal Nutrition*. Federation of Animal Science Society, Savoy, IL, USA, pp. 127–170.
- SUDARYONO, A., HOXEY, M.J., KAILIS, S.G., EVANS, L.H., 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 134, 313–323.
- SWICK, R.A., 2002. Soybean meal quality: assessing the characteristics of a major aquatic feed ingredient. *Global Aquaculture Advocate* 5, 46–49.
- TACON, A.G.J., DOMINY, W.G., PRUDER, G.D., 1998. Global trends and challenges in aquafeeds for marine shrimp. *AquaFeed Int.* 4, 28–35.
- TANNOCK, G.W., 1983. Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. In: Hentgens, D.J. Ed., *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, New York, pp. 517–539.
- TANNOCK, G.W., 1990. The microecology of lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract. In: Marshall, K.C. Ed., *Advances in Microbial Ecology*, Chap. 4, Vol. II, Plenum, New York, pp. 147–171
- TANNOCK, G.W., SAVAGE, D.C., 1974. Influence of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 9, 591–598.

TOVAR-RAMÍREZ, D., ZAMBONINO, I.J., CAHU, C., GATESOUPE, F.J., VÁZQUEZ-JUÁREZ, R., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture* 234, 415–427.

VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 64, 655–671.

VIEIRA, F. N. ; BUGLIONE, C.C., MOURIÑO, J. L., JATOBÁ, A., TORO, C. R., MARTINS, M., L., ; BARRACCO, M. ; VINATEA, L. A., 2007 . Time related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p. 796-769,

WANG, X., LI, H., ZHANG, X., LI, Y., JI, W., XU, H., 2000. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *J. Ocean. Univ. Qingdao* 30, 493–498.

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

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

BAUTISTA, M.N. (1986) The response of *Penaeus monodon* juveniles to varying protein/energy ratios in test diets. *Aquaculture*, 53, 229–242.

XUE, M., LI, A.J., DONG, S.L. & ZHAN, X.J. (1998) Studies on the optimum DP/DE for different sizes of *Penaeus chinensis*. *J. Ocean Univ. Qingdao*, 28, 245–252.

REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO:

- AKIYAMA, D.M., DOMINY, W.G., LAWRENCE, A.L., 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: Fast, A.W., Lester, L.J. . Eds. , Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam, pp. 535–568.
- BAYNE, B.C. & R.C. NEWELL. Physiological energetics of marine mollusks, p. 407-515. In: SALEUDDIN, S.S.M.; WILBUR, K.M.; The mollusca physiology, New York, Academic Press, 550p, 1983.
- BOMBEO-TUBURAN, I., GUANZON, H.G. & SCHROEDER, G.L. (1993) Production of *Penaeus monodon* (Fabricius) using four natural food types in an extensive system. *Aquaculture*, 112, 57–65.
- CAIN, K.D., GARLING, D.L. 1995. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery. *Prog. Fish Cult.* 57, 114–119.
- CHO C.Y. & SLINGER S.J. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: Fish Nutrition and Fishfeed Technology, Vol.2 (ed. By J.E.Halver & K.Tiews), pp. 239-247. Heinemann, Berlin, Germany, 1979.
- CHOUBERT, G., DE LA NOUE, J., LUQUET, P. Continuous quantitative automatic collector for fish feces. *Progressive Fish Culturist.*, v.29, p.64-67, 1979.
- CLAWSON, J.A., AND T. LOVELL. 1992. Improvement of nutritional value of *Artemia* for hybrid striped bass/white bass (*Morone saxatilis* x *M.chrysops*) larvae by *n*-3 HUFA enrichment of nauplii with menhaden oil. *Aquaculture* 108:125-134.
- COSTA, S. W., Custo de produção do camarão marinho. Florianópolis: ICEPA/SC/EPAGRI, 2003. 24 p.
- EPP, M.A., ZIEMANN, D.A. & SCHELL, D.M. (2002) Carbon and nitrogen dynamics in zero-exchange shrimp culture as indicated by stable isotopes. *Aquac. Res.*, 33, 839–846.
- FAIR, P.H., A.R. FORTNER., M.R MILLIKIN, L.V. SICK. 1980. Effects of dietary fiber on growth, assimilation and cellulase activity of the prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Proceedings of the World Aquaculture Society* II:369-381.
- FAO, 2002. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Fisheries Department, Rome, 159pp.
- FERRARI, E., JARNAGIN, A.S., SCHMIDT, B.F., 1993. Commercial production of extracellular enzymes. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (Eds.), *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 917–937.
- FOCKEN, U., GROTH, A., COLOSO, R.M. & BECKER, K. (1998) Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture*, 164, 105–116.
- FULLER, R., 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics. The Scientific Basis*. Chapman & Hall, New York, NY, pp. 1–8.
- FUNGE-SMITH, S.J. & BRIGGS, M.R.P. (1998) Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. *Aquaculture*, 164, 117–133.
- GODFREY, T., WEST, S., 1996. *Industrial Enzymology*. Macmillan Publishers Inc. , New York, NY, pp. 3–10.
- GUARNER, F., BOURDET-SICARD, R., BRANDTZAEG, P., HARSHARNJIT, S., MCGUIRK, P., VAN EDEN, W., ET AL. (2006). Mechanism of disease: the hygiene hypothesis revised. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3(5), 275 e 284

- GUILLAUME, J. (1997) Protein and amino acids. In: Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture, Vol. 6 (D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M. eds), pp. 26–50. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- HAJEN, W., R. BEAMES, D. HIGGS, B. DOSAN JH. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile and chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) in sea water. 1. Validation of technique. Aquaculture 112:321-332.
- HASLER, C.M., 2002. Functional foods: benefits, concerns and challenges— A position paper from the American Council on Science and Health. Journal of Nutrition. 132, 3772–3781.
- HASSAN, T.E., HEATH, J.L., 1986. Biological fermentation of fish waste for potential use in animal and poultry feeds. Agric. Wastes 15, 1 –15.
- HIKEY, M. (2005). Current legislation of probiotic products. In A. Tamime (Ed.), Probiotic dairy products (pp. 73- 97). Oxford: Blackwell Publishing.
- HOPKINS, J.S., SANDIFER, P.A. & BROWDY, C.L. (1995) Effect of two protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. J. World Aquac. Soc., 26, 93–97.
- JACKSON, C., PRESTON, N., THOMPSON, P. & BURFORD, M. (2003) Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. Aquaculture, 218, 397–411.
- Joint Food and Agriculture Organization, & World Health Organization Working Group (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: Joint Food and Agriculture Organization and World Health Organization Working Group. April 30 and May 1, 2002.
- JONES, I.D., 1975. Effect of processing by fermentation of nutrients. In: Harris, R.S., Karmas, E. (Eds.), Nutritional Evaluation of Food Processing. Avi Publication Coy, Westport, CN, USA, pp. 324–354.
- JONES, P.L., DE SILVA, S.S., 1998. Comparison of internal and external markers in digestibility studies involving the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). Aquac. Res. 29, 487–493.
- LAINING A., RACHMANSYAH, AHMAD T., WILLIAMS K., Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*, Aquaculture 218 (2003) 529–538
- LAWRENCE, A.L. & LEE, P.G. (1997) Research in the Americas. In: Crustacean Nutrition (D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. & Akiyama, D.M. eds), pp. 566–587. World Aquaculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA.
- LEAVITT, D.F., 1985. An evaluation of gravimetric and inert marker techniques to measure digestibility in the American lobster. Aquaculture 47, 131– 142.
- LEONEL J., OCHOA-SOLANO, JORGE, OLMOS-SOTO. 2006, The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. Food Microbiology 23 519–525
- LIM, C. 1993. Effect of dietary pH on amino acid utilisation by shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 114:293-303.
- LIN, C.K., 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (Eds.), Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture, Baton Rouge, LA, pp. 13–23.
- MARTIN, J.-L.M., VERAN, Y., GUERLORGET, O. & PHAM, D. (1998) Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. Aquaculture, 164, 135–149.

- MARTINEZ-PALACIOS, C.A., CABANILLAS BELTRÁN, H. PONCE-PALAFOX, J., CHÁVEZ SÁNCHEZ, MA.C. AND ROSS, L.G. 2001. A modified chamber designed for estimation of digestibility in shrimp. *North American Journal of Aquaculture*. 63: 252-255
- MCGOOGAN B.B., REIGH R.C., Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture, Volume 141, Issues 3-4, 31 May 1996, Pages 233-244.*
- MCKINNON, A.D., TROTT, L.A., ALONGI, D.M. & DAVIDSON, A. (2002) Water column production and nutrient characteristics in mangrove creeks receiving shrimp farm effluent. *Aquac. Res.*, 33, 55–73.
- METCHNIKOFF, E. (1907). *The prolongation of life*. New York: Arna Press.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado. Brasília, DF: ABCC, 2001.
- MUKHOPADHYAY, N., RAY, A.K., 1999. Effect of fermentation on the nutritive value of sesame seed meal in the diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. *Aquac. Nutr.* 5, 229– 236.
- NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., MOONEY, H., BEVERIDGE, M., CLAY, J., FOLKE, C., KAUTSKY, N., LUBCHENCO, J., PRIMAVERA, J. & WILLIAMS, M. (1998) Nature's subsidies to shrimp and salmon farming. *Science*, 282, 883–884
- NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., PRIMAVERA, J.H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE, M.C.M., CLAY, J., FOLKE, C., LUBCHENCO, J., MOONEY, H., TROELL, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.
- NEW, M.B., WIJKSTROM, U.N., 2002. Use of fish meal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fish meal trap. *FAO Fish. Circ.* 975, 61.
- OLMOS, S.J., 2003. Molecular characterization and phylogenetic identification of marine microorganisms. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.
- OLMOS, S.J., BOLANOS, V., CAUSEY, S., FERRARI, E., BOLIVAR, F., VALLE, F., 1996. A functional SpoOA is required for maximal aprE expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 381, 29–31.
- OLMOS, S.J., DE ANDA, R., FERRARI, E., BOLIVAR, F., VALLE, F., 1997. Effects of the sinR and degU32 (Hy) mutations on the regulation of the aprE in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 562–567.
- OLMOS, S.J., SANCHEZ, G.A., DEANDA, R., 1998. Regulations of the aprE (subtilisin) gene in abrB mutants of *Bacillus subtilis*. *Asia Pac. Journal Molecular Biology and Biotechnology.* 6, 97–103.
- PARKER, P.L. & ANDERSON, R.K. (1989) A d13C and d15N tracer study of nutrition in aquaculture: *Penaeus vannamei* in a pond growout system. In: *Stable Isotopes in Ecological Research* (Rundel, P.W., Ehleringer, J.R. & Nagy, K.A. eds), pp. 288–303, Springer-Verlag, New York, NY.
- PARKER, P.L., ANDERSON, R.K. & LAWRENCE, A.L. (1991) Stable isotope methodology for evaluation of nutritional requirements of shrimp. In: *Frontiers of Shrimp Research* (De Loach, P.F., Dougherty, W.J. & Davidson, M.A. eds), pp. 157–171. Elsevier, Amsterdam.
- PEREIRA, D., & GIBSON, G. (2002). Effects of consumption of probiotics on serum lipid levels in humans. *Clinical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), 259-281.
- 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.
- ROCHA, I. P., *Carcinicultura Brasileira: Desenvolvimento Tecnológico, Sustentabilidade Ambiental e Compromisso Social*; Associação Brasileira dos Criadores de Camarão; setembro de 2007; disponível em: <http://www.abccam.com.br/download/Carcinicultura%20Brasileira%20dia%2023de%20agosto.pdf>; acesso em: 9 de fevereiro de 2009

- RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. Revista ABCC, v. 2, p. 38-44, 2005.
- SARAC, Z., THAGGARD, H., SAUNDERS, J., GRAVEL, M., NEILL, A., COWAN, R.T., 1993. Observations on the chemical composition of some commercial prawn feeds and associated growth responses in *Penaeus monodon*. Aquaculture 115, 97–110.
- SHIAU, S.-Y., LIN, K.-P., CHIOU, C.-L., 1992. Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and seawater. J. Appl. Aquac. 1, 47– 53.
- SMITH, L.L., LEE, P.G., LAWRENCE, A.L., STRAWN, K., 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. Aquaculture 6, 85– 96.
- SMITH, V.H., TILMAN, G.D. & NEKOLA, J.C. (1999) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial ecosystems. Environ. Pollut., 100, 179–196.
- SONNENSCHNEIN, A.L., LOSICK, R., HOCH, J.A., 1993. Bacillus subtilis and Others Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC, 987pp.
- STOREBAKKEN, T., REFSTIE, S., RUYTER, B., 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Ed.), Soy in Animal Nutrition. Federation of Animal Science Society, Savoy, IL, USA, pp. 127–170.
- SUDARYONO, A., HOXEY, M.J., KAILIS, S.G., EVANS, L.H., 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture 134, 313–323.
- SWICK, R.A., 2002. Soybean meal quality: assessing the characteristics of a major aquatic feed ingredient. *Global Aquaculture Advocate* 5, 46–49.
- TACON, A.G.J. (1996) Nutritional studies in crustaceans and the problems of applying research findings to practical farming systems. Aquac. Nutr., 1, 165–174.
- TACON, A.G.J., DOMINY, W.G., PRUDER, G.D., 1998. Global trends and challenges in aquafeeds for marine shrimp. AquaFeed Int. 4, 28–35.
- TAGG, J. R., & DIERKSEN, K. P. (2003). Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. Trends in Biotechnology, 21(5), 217-223.
- TEICHERT-CODDINGTON, D.R. & RODRIGUEZ, R. (1995) Semi-intensive commercial grow-out of *Penaeus vannamei* fed diets containing differing levels of CP during wet and dry seasons in Honduras. J. World. Aquac. Soc., 26, 72–79.
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology Molecular Biology Reviews. 64, 655–671.
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology Molecular Biology Reviews. 64, 655–671.