



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura
marinha**

Tese apresentada como requisito parcial a
obtenção do título de doutor e Aquicultura,
Centro de Ciências Agrárias, Universidade
Federal de Santa Catarina

Orientador: Luis Alejandro Vinatea, Dr.

Co-orientador: Maurício Laterça Martins, Dr.

Felipe do Nascimento Vieira

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

V658s Vieira, Felipe do Nascimento

Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha [tese] / Felipe do Nascimento Vieira ; orientador, Luis Alejandro Vinatea Arana. – Florianópolis, SC, 2010.

133 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. Lactobacillus plantarum. 4. Camarão marinho. 5. Larvicultura. 6. Engorda. 7. Microbiologia. I. Vinatea Arana, Luis. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha.

Por

FELIPE DO NASCIMENTO VIEIRA

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR 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. Luis Alejandro Vinatea Arana – *Orientador*

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco

Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Dr. Walter Quadros Seiffert

Dr. Wilson Francisco Britto Wasielesky Junior

Ao inestimável mestre e amigo
Elpídio Beltrame (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rogério e Eloisa, e minha Irmã Leila, pelo amor e carinho incondicional;

A minha amada, Eloysa, pelo amor e paciência nas muitas horas em que estive ausente durante a realização do doutorado;

Ao professor e amigo Elpídio Beltrame, por todo apoio e incentivo;

Ao professor e amigo Walter Quadros Seiffert pelo inestimável apoio dado para a realização deste trabalho;

Aos grandes amigos feitos no setor de microbiologia do LCM José Luiz, Jatobá, Celso e Bruno;

Ao Jairo, grande pessoa e amigo, pela ajuda no experimento realizado na Fazenda Yakult;

Ao João Santana, técnico administrativo do LCM e amigo, por toda a prestatividade na resolução de inúmeros problemas durante a realização desta tese;

Ao meu orientador, Luis Vinatea, pela oportunidade oferecida,

Ao meu co-orientador Maurício Laterça, pelos ensinamentos e apoio;

A professora Margherita Barracco, pelos inestimáveis ensinamentos na cativante arte de imunologia de crustáceos;

A professora e amiga Cristina Ramirez, pelos ensinamentos nas técnicas de microbiologia;

Aos recentes pupilos e amigos do setor de microbiologia, Gabriel, Gabriella, Katiane, Mariana, Norha e Robert;

A todos os funcionários e professores do LCM e da Fazenda Yakult-UFSC pela prestatividade;

Ao amigo Delano Dias Scheleder, pelo auxílio nas análises imunológicas;

Ao Carlitos, pela paciência e prestatividade na secretaria da PGAQI;

A FINEP, MPA e FAPESC pelo apoio financeiro para realização dos estudos;

A todos os companheiros de futebol e churrasco, que me ajudaram a manter a sanidade nas horas difíceis,

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um probiótico com bactérias oriundas do trato digestório de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) avaliando seu uso na larvicultura e engorda. Foram isoladas 10 cepas do trato digestório de camarões, e a cepa que apresentou os melhores resultados na seleção *in vitro* foi identificada como *Lactobacillus plantarum*. A adição desta cepa na dieta modificou a microbiota bacteriana intestinal de larvas e adultos de *L. vannamei*, diminuindo a população de *Vibrio* spp. Na larvicultura, a suplementação da dieta com *L. plantarum* resultou no aumento da sobrevivência e maior resistência das larvas ao desafio por *Vibrio harveyi*. Na engorda em água clara, camarões alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* apresentaram maior sobrevivência após o desafio com *V. harveyi* e maior contagem total de hemócitos e atividade aglutinante do soro. No cultivo comercial, houve aumento na sobrevivência e diminuição da conversão alimentar nos viveiros alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* após 75 dias de cultivo. O *L. plantarum* isolado pode ser utilizado como probiótico para *L. vannamei*, pois altera benéficamente a microbiota intestinal de larvas e adultos, aumenta a resistência dos animais ao desafio com *V. harveyi* e melhora a sobrevivência da larvicultura e engorda comercial.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, *Lactobacillus plantarum*, camarões marinhos, larvicultura, engorda, microbiologia.

ABSTRACT

The aim of this work was to isolate acid-lactic bacteria from the intestines of *Litopenaeus vannamei* and evaluate its use as probiotic on marine shrimp hatchery and growing performance. Ten 10 bacterial strains were isolated from the intestines of shrimp and the strain with the best results *in vitro* was identified as *Lactobacillus plantarum*. The addition of this bacterium in the diet did alter the intestinal bacterial microbiota on marine shrimp larvae and adults, by reducing *Vibrio* spp. population. In hatchery, the diet supplemented with *L. plantarum* increased shrimp larvae survival and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. Shrimps feed with diet supplemented with *L. plantarum* had higher survival to challenge with *V. harveyi* and higher total hemocytes count and serum agglutinating activity after challenge. The use of *L. plantarum* supplemented diet resulted in increased survival and feed efficiency on shrimp ponds. The *L. plantarum* isolated has modified the intestinal microbiota of larvae and adults, and increased the resistance of animals when challenged against *V. harveyi*. Moreover, it improved the survival in hatchery and commercial ponds, showing the potential to be used as a probiotic for *L. vannamei*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Lactobacillus plantarum*, marine shrimp, hatchery, growing performance, microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da definição de probiótico (adaptado de Gatesoupe, 1999).....	25
Figura 2: Fluxograma referente ao isolamento, caracterização e seleção de bactérias probióticas a ser realizado neste projeto.	37
Figura 4: Microbiota bacteriana do trato digestório de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> durante 60 dias de alimentação com dieta suplementada ou não com <i>Lactobacillus plantarum</i> . A: contagem de bactérias viáveis totais; B: contagem de <i>Vibrio</i> spp.; C: contagem de bactéria ácido lácticas.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bactérias utilizadas como probióticos na carcinicultura e seu modo de ação	26
Tabela 2: Identificação fenotípica das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato digestório de camarões marinhos pela fermentação de 49 carboidratos pelo kit api 50 CHL (Biomerieux).....	52
Tabela 3: Halo de inibição (em mm) contra <i>Vibrio harveyi</i> (VH), <i>V. alginolyticus</i> (Val), <i>V. anguillarum</i> (Van), <i>Enterococcus durans</i> (ED), <i>Micrococcus luteus</i> (ML), <i>Escherichia coli</i> (EC), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA), <i>Aeromonas hydrophila</i> (AH) e <i>Yersenia enterocolitica</i> (YE) das 10 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato digestório de <i>Litopenaeus vannamei</i>	56
Tabela 4: Avaliação <i>in vitro</i> da contagem final de bactérias (CFB), velocidade máxima de crescimento (VM), tempo de duplicação (TD), tolerância a 1,5% de NaCl (NaCl15), 3,0% de NaCl (NaCl30), pH6, pH8, pH9 e 5% de sais biliares (SB) das 10 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato digestório de <i>Litopenaeus vannamei</i>	57
Tabela 5: Índice de seleção da distância ao ideótipo (IDI) das 10 cepas de bactérias ácido lácticas avaliadas.....	58
Tabela 6: Sobrevivência de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com dieta suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> e sem suplementação após a metamorfose de protozoeca 3 para misis 1 e misis 3 para pós-larva 1.	71
Tabela 7: Contagens microbiológicas da água e das larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentadas com dieta suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> e sem suplementação nos estágios de misis 1 (M1) e pós-larva 1 (PL1).....	72
Tabela 8: Sobrevivência de misis 2 de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentada com dieta suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> e sem suplementação 48h após o desafio experimental com <i>Vibrio harveyi</i>	73

Tabela 9: Porcentagem de sobrevivência, contagem de <i>Vibrio</i> spp. na hemolinfa e no hepatopâncreas, contagem total de hemócitos (THC), atividade da enzima fenoloxidase (PO) e título hemaglutinante do soro dos camarões alimentado com dieta suplementada ou não com <i>Lactobacillus plantarum</i> inoculados com solução salina (SSE- controles) ou <i>Vibrio harveyi</i>	90
Tabela 10: Composição da ração utilizada.....	104
Tabela 11: Microbiota bacteriana do trato digestório de camarões cultivados na fazenda experimental Yakult-UFSC provenientes de viveiros alimentados com dieta suplementada com <i>Lactobacillus plantarum</i> e controle após 30 e 60 dias de cultivo.	109
Tabela 12: Sobrevivência, eficiência alimentar, peso final e dias de cultivo de viveiros de camarões alimentados com ração suplementada ou não com <i>Lactobacillus plantarum</i>	110
Tabela 13: Atividade da enzima fenoloxidase (PO), contagem total de hemócitos (THC) e concentração mínima inibitória (CMI) contra <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> da hemolinfa de camarões cultivados na fazenda experimental Yakult-UFSC provenientes de viveiros alimentados com dieta suplementada com <i>L Lactobacillus plantarum</i> e controle após 30 e 60 dias de cultivo.	112

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	21
INTRODUÇÃO GERAL: USO DE PROBIÓTICOS NA CARCINICULTURA	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA AQUICULTURA	24
3 BACTÉRIAS PROBIÓTICAS UTILIZADAS NA CARCINICULTURA	25
3.1 <i>Bacillus</i>	28
3.2 <i>Vibrio</i>	29
3.3 Bactérias ácido lácticas	29
4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS	30
4.1 Balanço da microbiota bacteriana intestinal	30
4.2 Estímulo e/ou produção de enzimas digestivas	32
4.3 Imunoestimulação e resistência à infecção por patógenos	33
4.4 Sensor de quorum (<i>quorum sensing</i>)	34
4.5 Melhora nos índices zootécnicos	35
5 SELEÇÃO DE PROBIÓTICOS	36
5.1 Isolamento e seleção <i>in vitro</i>	38
5.2 Ensaios em escala piloto	40
5.3 Ensaios em escala comercial	40
6 JUSTIFICATIVA	41
7 OBJETIVO	41
7.1 Objetivo geral	41
7.2 Objetivos específicos	41
8 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS	42
CAPÍTULO 2	43
ISOLAMENTO E SELEÇÃO <i>IN VITRO</i> POR MÚLTIPLAS CARACTERÍSTICAS DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA USO COMO PROBIÓTICOS NA CARCINICULTURA MARINHA	43
9 RESUMO	44
10 ABSTRACT	45
11 INTRODUÇÃO	46
12 MATERIAL E MÉTODOS	47

12.1	Isolamento bacteriano	47
12.2	Cinética de crescimento	47
12.3	Estudo de tolerância frente a sais biliares	48
12.4	Estudo de tolerância a NaCl.....	48
12.5	Estudo de tolerância ao pH.....	49
12.6	Inibição de patógenos <i>in vitro</i> :	49
12.7	Identificação das espécies:	49
12.8	Análise estatística.....	50
13	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
14	CONCLUSÃO.....	58
15	REFERENCIAS.....	58
CAPÍTULO 3.....		65
AVALIAÇÃO DO USO DE DIETA SUPLEMENTADA COM BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NA LARVICULTURA DE CAMARÕES MARINHOS		65
16	RESUMO.....	66
17	ABSTRACT.....	67
18	INTRODUÇÃO.....	68
19	MATERIAL E MÉTODOS	69
19.1	Material biológico	69
19.2	Condições experimentais.....	69
19.3	Avaliação da sobrevivência e qualidade larval	70
19.4	Avaliação microbiológica	70
19.5	Desafio com <i>Vibrio harveyi</i>	70
19.6	Análise estatística.....	70
20	RESULTADOS	71
20.1	Taxa de sobrevivência e qualidade larval.....	71
20.2	Análises microbiológicas	71
20.3	Desafio com <i>Vibrio harveyi</i>	73
21	DISCUSSÃO	73
22	CONCLUSÃO	75
23	REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 4:.....		79
EFEITO DO USO DE DIETA SUPLEMENTADA COM O PROBIÓTICO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE CAMARÕES MARINHOS APÓS O DESAFIO COM <i>Vibrio</i> <i>harveyi</i>		79

24	RESUMO	80
25	ABSTRACT	81
26	INTRODUÇÃO	82
27	MATERIAL E MÉTODOS	83
27.1	Material biológico	83
27.2	Preparo do inóculo bacteriano	83
27.3	Dieta experimental.....	84
27.4	Protocolo experimental.....	84
27.5	Infecção experimental	84
27.6	Coleta da hemolinfa e do hepatopâncreas	85
27.7	Análise microbiológica da hemolinfa e do hepatopâncreas.....	85
27.8	Análises imunológicas.....	85
27.9	Análises estatísticas	86
28	RESULTADOS.....	87
28.1	Sobrevivência e crescimento dos camarões.....	87
28.2	Microbiota bacteriana do trato digestório.....	87
28.3	Infecção experimental com <i>Vibrio harveyi</i>	89
29	DISCUSSÃO	91
30	CONCLUSÃO	93
31	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	CAPÍTULO 5.....	99
	USO DE DIETA SUPLEMENTADA COM <i>Lactobacillus plantarum</i> NA ENGORDA COMERCIAL DE CAMARÕES MARINHOS	99
32	RESUMO	100
33	ABSTRACT	101
34	INTRODUÇÃO	102
35	MATERIAL E MÉTODOS	102
35.1	Material Biológico.....	103
35.2	Suplementação na dieta	103
35.3	Condições experimentais.....	104
35.4	Avaliação da microbiota bacteriana na água	105
35.5	Coleta da hemolinfa, hepatopâncreas e trato digestório	105
35.6	Análises microbiológicas da hemolinfa, hepatopâncreas e trato digestório	106

35.7	Análises imunológicas.....	106
35.8	Análise da presença do vírus da mancha branca	107
35.9	Análises estatísticas.....	107
36	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
37	CONCLUSÃO.....	111
38	REFERENCIAS.....	113
39	CONCLUSÕES GERAIS.....	117
40	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
41	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	119
ANEXO I:		129
ANEXO II:.....		131
ANEXO III:		133

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL: USO DE PROBIÓTICOS NA CARCINICULTURA

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura marinha é hoje uma das maiores indústrias da aquicultura brasileira e mundial. O volume comercializado mundialmente ultrapassa 3 milhões de toneladas e 14 bilhões de dólares (FAO, 2008). O maior entrave para a manutenção dos índices de produtividade da carcinicultura são as enfermidades, principalmente as de origem virais como o vírus da mancha branca (WSSV), vírus de Taura (TSV), vírus da cabeça amarela (YHV) e vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (LIGHTNER, 2005). Contudo, as enfermidades bacterianas também podem causar perdas importantes no cultivo de camarões, além serem possíveis gatilhos para o desenvolvimento das doenças virais (AUSTIN, AUSTIN, 2007).

O ambiente aquático é normalmente dotado de uma microbiota em equilíbrio, composta por bactérias benéficas e neutras para o animal de cultivo, bem como de bactérias patogênicas obrigatórias e oportunistas (SCHULZE et al., 2006). Em tanques de cultivo de camarões marinhos, este equilíbrio microbiológico pode ser quebrado por práticas inadequadas de manejo, levando a proliferação de bactérias patogênicas (KARUNASAGAR et al., 1994). Dentre as doenças bacterianas que afetam camarões marinhos, destacam-se as causadas por *Vibrio* spp. Diversas espécies de *Vibrio* já foram reportadas como patogênicas para camarões como *Vibrio damsela* (SONG et al., 1993), *V. harveyi* (PASHARAWIPAS et al., 2005), *V. nigripulchritudo* (GOARANT et al., 2006), *V. orientalis* (ABRAHAM, PALANIAPPAN, 2004), *V. alginolyticus* (VANDENBERGHE, 1998, BUGLIONE-NETO et al., 2010), *V. parva* (Costa et al., 1998), *V. furnissii* e *V. parahaemolyticus* (SUNG et al., 1999).

Na carcinicultura marinha, o controle de enfermidades de origem bacteriana é feito principalmente pelo uso de antibióticos (KARUNASAGAR et al., 1994). Porém, o uso indiscriminado destes antibióticos levou ao aparecimento de cepas de bactérias resistentes (SKJERMO, VADSTEIN, 1999; VERSCHUERER et al., 2000; HOLMSTRÖM et al., 2003). No ano de 1991, o Equador foi assolado por uma epidemia de cólera causada por cepas de *Vibrio cholerae* multi-resistente a antibióticos. Smith (2007) correlacionou a resistência das cepas de *V. cholerae* com o uso indiscriminado de antibióticos em fazendas de camarões marinhos. Aliando este problema aos resíduos deixados na carne do camarão, diversos países baniram o uso de antibióticos na carcinicultura (VINE et al., 2006).

Como alternativa ao uso de antibióticos, a utilização de cepas de bactérias “probióticas” ganhou espaço para o controle de bactérias patogênicas. Em organismos aquáticos, a microbiota bacteriana intestinal é composta principalmente por bactérias Gram negativas, sendo predominantes os gêneros *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* (YASUDA, KITAO, 1980; LEAÑO et al., 1998; GOMEZ-GIL et al., 2000; VINE et al., 2006). Contudo, trabalhos têm demonstrado que esta microbiota bacteriana pode ser modificada pela inclusão de bactérias Gram positivas na dieta (ZIAEI-NEJAD et al., 2006) ou na água de cultivo (RENGPIPAT et al. 1998, 2000). Esta modificação na microbiota intestinal pode ser uma importante ferramenta preventiva ao aparecimento de enfermidades, uma vez que, este nicho ecológico ocupado por bactérias benéficas, pode impedir a fixação de possíveis bactérias patogênicas no trato digestório dos camarões (GÓMEZ-GIL et al., 2000).

Diversos são os relatos positivos do uso de probióticos na carcinicultura incluindo melhora no equilíbrio da microbiota intestinal (RENGPIPAT et al., 1998; LI et al., 2009; ZHANG et al., 2009), produção/estimulação da produção de enzimas digestivas (LIU et al., 2009; ZHOU et al., 2009), melhora na taxa de crescimento (LIU et al., 2009; FAR et al., 2009), na eficiência alimentar (LIN et al., 2004; WANG et al., 2005), imunoestimulação (GULLIAN et al., 2004; CHIU et al., 2007; ZHANG et al. 2009), resistência a infecção por patógenos bacterianos (RENGPIPAT et al., 2000) e virais (ZHANG et al., 2009). Contudo os resultados do uso de probióticos ainda são controversos, com alguns relatos negativos (sem o efeito esperado) de sua utilização (MCINTOSH et al., 2000; MEUNPOL et al., 2003; ALAVANDI et al., 2004). Estes relatos estão normalmente associados a produtos comerciais (MCINTOSH et al., 2000, MEUNPOL et al., 2003), que muitas vezes tem em sua formulação bactérias que não são oriundas do animal de estudo, muitas vezes até de ambiente terrestre, reduzindo a especificidade entre os probiótico (bactéria) e hospedeiro (camarão).

Nesta revisão serão abordados temas que vão desde a definição de probióticos, modo de ação, principais grupos de bactérias utilizadas, isolamento, seleção *in vitro*, ensaios *in vivo* até relatos do seu uso em larga escala.

2 DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA AQUICULTURA

Originalmente, a definição de probióticos foi lançada por Lilly, Stillwell (1965): “Substância produzida por protozoário que estimula o crescimento de outro protozoário”. Posteriormente, Fuller (1989), expandiu a definição de probiótico para “micro-organismo vivo utilizado na alimentação que afeta benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de micro-organismos da microbiota intestinal.” Esta é a definição mais utilizada para probióticos atualmente.

Contudo, esta definição foi pensada levando-se em conta apenas animais terrestres. Na aquicultura esta definição é insuficiente, pois a microbiota intestinal do organismo cultivado está intimamente relacionada com a do ambiente externo. Assim, Gatesoupe (1999) definiu probiótico como: “micro-organismo vivo que ao ser ministrado coloniza o trato digestório dos animais de cultivo com o objetivo de melhorar a saúde destes animais”. Nesta definição são incluídas como probióticos as bactérias que são adicionadas na água com o objetivo de colonizar o trato digestório dos animais de cultivo. Contudo, é importante salientar, que Gatesoupe (1999), ao contrário de outros autores (VERSCHUERE et al., 2000 por exemplo) exclui do conceito de probióticos as bactérias que são adicionadas à água do cultivo com o intuito de melhorar a qualidade de água e decompor matéria orgânica (enquadrado no conceito de biorremediação de MAEDA et al., 1997) e com o objetivo de inibir o crescimento de bactérias patogênicas na água de cultivo (enquadrado no conceito de biocontrole de MORIARTY, 1998) (Figura 1).

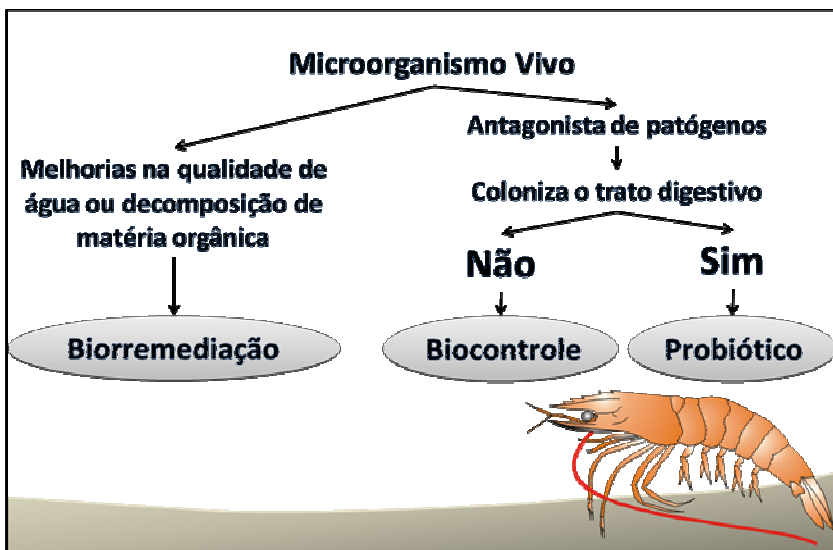


Figura 1: Desenho esquemático da definição de probiótico (adaptado de Gatesoupe, 1999)

3 BACTÉRIAS PROBIÓTICAS UTILIZADAS NA CARCINICULTURA

Os microorganismos são em número, diversidade genética e biomassa os maiores habitantes do planeta Terra (MADIGAN et al., 2004). Sendo assim, o número de microorganismos benéficos que podem ser utilizados como probióticos são infinitos. Atualmente, os principais grupos de bactérias utilizadas como probiótico na carcinicultura marinha são os *Bacillus*, *Vibrio* e bactérias ácido lácticas. Contudo, estudos diversos relatam o benefício do uso dos mais diversos grupos de bactérias para camarões (Tabela 1).

Tabela 1: Bactérias utilizadas como probióticos na carcinicultura e seu modo de ação

Espécie	Ação	Camarão	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Inibição <i>in vitro</i> de patógenos	<i>M. rosenbergii</i>	VASEEHARAN, RAMASAMY, 2003; BALCAZAR et al., 2007; SANSAWAT et al., 2009
	Aumento no crescimento	<i>L. vannamei</i>	FAR et al., 2009; LIU et al., 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al., 2007a, 2007b; TSENG et al., 2009
	Aumento na digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	LIU et al., 2009
	Aumento na sobrevivência	<i>L. vannamei</i>	FAR et al., 2009
	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	TSENG et al., 2009
<i>Bacillus sp.</i>	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	RENGPIPAT et al., 2000; GULLIAN et al., 2004; LI et al., 2009
	Aumento da resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	LI et al., 2009
	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>P. monodon</i>	RENGPIPAT et al., 1998, 2000
	Melhora da microbiota intestinal	<i>L. vannamei</i>	GULLIAN et al., 2004; LI et al., 2009
	Aumento na sobrevivência	<i>L. vannamei</i> <i>F. indicus</i>	WANG, et al., 2005; ZIAEI-NEJAD et al., 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>L. vannamei</i>	WANG, et al., 2005
	Aumento na digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	LIN et al., 2004
	Aumento na sobrevivência da larvicultura	<i>F. indicus</i>	ZIAEI-NEJAD et al., 2006
	Aumento na atividade de enzimas digestivas	<i>F. indicus</i>	ZIAEI-NEJAD et al., 2006
<i>B. fusiformis</i>	Aumento na sobrevivência da larvicultura	<i>L. vannamei</i> <i>P. monodon</i>	GUO et al., 2009

Tabela 1: Continuação.

<i>Bacillus coagulans</i>	Aumento na sobrevivência	<i>L. vannamei</i>	ZHOU et al., 2009
	Aumento da atividade de enzimas digestivas	<i>L. vannamei</i>	ZHOU et al., 2009
<i>Bacillus licheniformis</i>	Melhora da microbiota intestinal	<i>L. vannamei</i>	LI et al., 2007
	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	LI et al., 2007
<i>Bacillus pumilus</i>	Aumento na sobrevivência	<i>P. japonicus</i>	EL-SERSY et al., 2006
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al., 2008
	Aumento na sobrevivência	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al., 2008
	Aumento das defesas antioxidantes	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al., 2009
<i>Lactobacillus</i> sp.	Aumento da resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	PERAZA-GOMEZ, et al., 2009
	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>P. monodon</i>	PHIANPHAK, et al., 1999
	Aumento no crescimento	<i>P. monodon</i>	PHIANPHAK, et al., 1999
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	CHIU et al., 2007
	Aumento da digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	BUGLIONE-NETO 2009
	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	CHIU et al., 2007
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aumento do crescimento	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al., 2004
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Diminuição da conversão alimentar	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al., 2004
<i>Lactobacillus sporogenes</i>	Aumento do Crescimento	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al., 2004
<i>Lactobacillus sporogenes</i>	Diminuição da conversão alimentar	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al., 2004
<i>Halomonas</i> sp.	Aumento na sobrevivência, infecção viral, microbiota bacteriana intestinal, resposta imune	<i>F. chinensis</i>	ZHANG et al., 2009

Tabela 1: Continuação.

<i>Arthrobacter</i> sp.	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	LI et al., 2008
	Inibição in vitro de patógenos	<i>F. chinensis</i>	LI et al., 2006
	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>F. chinensis</i>	LI et al., 2006
<i>Streptomyces</i> sp.	Aumento no crescimento	<i>P. monodon</i>	DAS et al., 2006
<i>Micrococcus</i> sp.	Inibição in vitro de patógenos	<i>M. rosenbergii</i>	JAYAPRAKASH et al., 2005
<i>Vibrio fluvialis</i>	Aumento na sobrevivência	<i>M. japonicus</i>	EL-SERSY et al., 2006
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Aumento da resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	RODRÍGUEZ et al., 2007
	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	GULLIAN et al., 2004
	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCÁZAR et al., 2007a
<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCÁZAR et al., 2007b
<i>Pseudomonas aestumarina</i>	Aumento da resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCÁZAR et al., 2007b
<i>Streptococcus phocae</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>P. monodon</i>	SWAIN et al., 2009
<i>Enterococcus faecium</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>P. monodon</i>	SWAIN et al., 2009

3.1 *Bacillus*

As bactéria do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas como probiótico na carcinicultura (Tabela 1) e em formulações comerciais. Os *Bacillus* são bactérias Gram positivas, com baixo conteúdo de guanina/citosina e esporuladas (MADIGAN et al., 2004). Durante o processo de esporulação, algumas espécies de *Bacillus* produzem metabólitos secundários (antibióticos, bacteriocinas, inseticidas e enzimas) que são utilizadas comercialmente. Entre os antibióticos destacam-se a

bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (MADIGAN et al., 2004).

A maior vantagem na utilização deste grupo de bactérias como probióticos está relacionada com a facilidade de ser produzida em massa e incorporada em produtos comerciais. A produção em escala dos *Bacillus* é simples e sua capacidade de esporulação facilita a sua inclusão em dietas e produtos comerciais (OCHOA-SOLANO et al., 2006).

Como desvantagem, já foi descrito que algumas cepas de *Bacillus* podem se tornar patogênicas para camarões marinhos. Wang et al., (2000) relatam que o uso contínuo de um probiótico a base de *Bacillus subtilis* foi responsável pelo aparecimento da “doença bacteriana da mancha branca”, que causou mortalidades em cultivos comerciais de *Penaeus monodon* na Malásia no final dos anos 90.

3.2 *Vibrio*

Bactérias do gênero *Vibrio* são Gram negativas, móveis, não esporuladas, aeróbias facultativas e com alta taxa de multiplicação (MADIGAN et al., 2004). O uso de *Vibrio* spp. não patogênicos como probióticos é muito utilizado na carcinicultura equatoriana (RODRIGUEZ et al., 2007). A principal vantagem do uso deste gênero de bactérias como probióticos reside na sua alta taxa de multiplicação. Esta característica facilita tanto os processos de sua multiplicação em laboratório quanto a torna uma bactérias muito competitiva, que ao ser fornecida aos animais ocupa rapidamente os nichos ecológicos competindo com as bactérias patogênicas (GULLIAN et al., 2004). Contudo, os *Vibrio* spp. têm a característica de trocar facilmente material genético por transformação, conjugação ou transdução (MADIGAN et al., 2004). O *V. alginolyticus* é tanto relatado como probiótico (GULLIAN et al., 2004) quanto importante patógeno (BUGLIONE-NETO et al., 2010). Segundo George et al., (2005), a diferença entre cepas patogênicas ou não de *V. alginolyticus* reside em apenas uma pequena variação genética. Assim, uma bactéria utilizada inicialmente como probiótico, pode se tornar patogênica muito facilmente, pela aquisição de uma nova sequência de DNA.

3.3 Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas são Gram positivas, com formato de bacilos e cocos, não esporuladas, imóveis, anaeróbias obrigatórias ou

aerotolerantes, sem citocromos (que reflete na ausência de mecanismo respiratório como gerador de energia) e que produzem ácido láctico como principal carboidrato durante a fermentação (MADIGAN et al., 2004).

Entre as características positivas das bactérias ácido lácticas estão à facilidade de sua multiplicação, produção de compostos antimicrobianos e estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (RINGO, GATESOUBE, 1998). Este grupo de bactérias é encontrado na microbiota natural de espécies aquáticas (HAGI et al., 2004) e é muito utilizado como probiótico principalmente na piscicultura marinha e continental (ROBERTSON et al., 2000; GATESOUBE, 2002; PANIGRAHI et al., 2005; SALINAS et al., 2006, RINGO et al., 2009).

A principal desvantagem da utilização de bactérias probióticas reside na ausência de esporos, que dificulta sua inclusão e durabilidade em dietas comerciais. Adicionalmente, algumas espécies de bactérias ácido lácticas como *Lactococcus garvieae*, podem ser patogênicas para camarões (CHEN et al., 2001).

4 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

Os probióticos, dependendo da bactéria utilizada, podem atuar de forma benéfica no hospedeiro de diferentes maneiras, que vão desde a alteração no balanço da microbiota intestinal até melhoria na resposta imune (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

4.1 Balanço da microbiota bacteriana intestinal

A microbiota bacteriana intestinal de organismos aquáticos é constituída predominantemente por bactérias Gram negativas como as dos gêneros *Vibrio* e *Pseudomonas* (LEAÑO et al., 1998; GOMEZ-GIL et al., 2000; VINE et al., 2006). Diversos trabalhos demonstraram que esta microbiota pode ser modificada pelo fornecimento de bactérias probióticas aos animais de cultivo (WANG et al., 2005), com consequente diminuição da população de bactérias com potencial patogênico (RINGO et al., 2009). Esta modificação na microbiota normalmente está relacionada à produção de compostos inibitórios (VASEEHARAN, RAMASAMY, 2003, RAMIREZ, 2006) ou a exclusão por competição (GOMEZ-GIL et al., 2000).

Diversos estudos demonstraram a capacidade de cepas de bactérias probióticas em inibir o crescimento de bactérias patogênicas *in*

vitro (GULLIAN et al., 2004; BALCÁZAR et al., 2007b, 2008; ALY et al., 2008; EL-RHMAN et al., 2009). As bactérias ácido lácticas, por exemplo, produzem uma gama muito grande de compostos antimicrobianos como bacteriocinas (GILLOR et al., 2008), reuterim (TALARICO et al., 1988), ácidos orgânicos (VÁZQUES et al., 2005) e peróxido de hidrogênio (SUGITA et al., 2007). Balcázar et al., (2008) relataram a capacidade do *Lactococcus lactis* em inibir o crescimento *in vitro* de cepas de *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum* e *Yersenia ruckeri*.

As bactérias do gênero *Bacillus* produzem grande quantidade de compostos antimicrobianos como biossurfactantes (MUKHERJEE, et al., 2009), bacteriocinas (KAYALVIZHI; GUNASEKARAN, 2008) e sideróforos (PATEL et al., 2009). A inibição *in vitro* de bactérias patogênicas por *Bacillus* já foi reportada para diversas espécies de *Vibrio* sp. (GULLIAN et al., 2004; GUO et al., 2009; HILL et al., 2009).

Outros gêneros de bactérias também têm sido estudados por sua capacidade de produção de compostos antimicrobianos. Li et al., (2006) reportaram que o uso da bactéria probiótica Gram positiva *Arthrobacter* XE-7 teve um efeito inibitório contra *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* e *V. nereis* semelhante ao do antibiótico cloranfenicol. Também compostos sobrenadantes de *Pseudomonas* sp. inibiram o crescimento de *V. harveyi* *in vitro*, causando lise celular (RATTANACHUAY et al., 2010).

Na exclusão competitiva, as bactérias fornecidas como probióticos competem por espaço e nutrientes que poderiam ser utilizados pelos potenciais patógenos (KESARCODI-WATSON et al., 2008). Para que a exclusão competitiva seja eficiente, é importante que a cepa usada como probiótico tenha alta taxa de crescimento e grande capacidade de competir por nutrientes (VINE et al., 2006).

Como exemplo sobre a competição por nutrientes, pode ser citado o ferro. O ferro é importante para crescimento da maioria das bactérias, contudo normalmente é encontrado em baixas quantidades nos fluidos dos animais e na forma insolúvel $F3^{3+}$ (VERSCHUERE et al., 2000). Probióticos produtores de sideróforos (quelantes de ferro) poderiam deprimir o crescimento de patógenos em condições de limitação de ferro (KESARCODI-WATSON et al., 2008). Gram et al., (1999) demonstraram que o crescimento de *V. anguillarum* foi inibido pela presença do sobrenadante de uma cultura de *P. fluorescens*, crescida em condições limitantes de ferro, enquanto que o sobrenadante de cultura da mesma bactéria crescida sem limitação de ferro não inibiu.

Vine et al., (2004) mostraram a exclusão competitiva de cinco candidatos a probióticos contra duas cepas de bactérias patogênicas no muco de peixes *in vitro*. Eles observaram que na presença dos probióticos, a taxa de adesão ao muco dos patógenos era reduzida.

Em ensaios *in vivo*, diversos autores relataram que a adição de bactérias probióticas na água de cultivo (RENGPIPAT et al., 1998, 2000; GULLIAN et al., 2004; LI et al., 2007) ou na dieta (PHIANPHAK et al., 1999; VENKAT et al., 2004; CASTEX et al., 2008) pode modificar a microbiota bacteriana dos animais.

Rengpipat et al., (1998, 2000), demonstraram que a adição de *Bacillus* sp. na água de cultivo diminuiu a população de *Vibrio* spp. na água de cultivo e no trato digestório de *P. monodon*. Em *L. vannamei*, a microbiota intestinal também foi modificada pela adição na água de cultivo de *Bacillus* P64 e *Vibrio* P62 (GULLIAN et al., 2004). A adição na dieta de *P. acidilactici* e *Lactobacillus* sp. na dieta modificou a microbiota bacteriana intestinal de *L. stylirostris* (CASTEX et al., 2008) e *P. monodon* (PHIANPHAK et al., 1999), com diminuição na população de *Vibrio* spp.

4.2 Estímulo e/ou produção de enzimas digestivas

O uso de probióticos na dieta pode fornecer ou estimular a produção de enzimas digestivas pelo hospedeiro (VINE et al., 2006). Bactérias isoladas de animais aquáticos já demonstraram *in vitro* a capacidade de digerir quitina (HAMID et al., 1979; MACDONALD et al., 1986), amido (HAMID et al., 1979; MACDONALD et al., 1986; GATESOUE et al., 1997), proteínas (HAMID et al., 1979; GATESOUE et al., 1997), celulose (ERASMUS et al., 1997; BAIRAGI et al., 2002) e lipídeos (GATESOUE et al., 1997; VINE, 2004).

Das enzimas digestivas presentes no trato digestório de camarões, somente uma pequena parte é proveniente da microbiota (ZIAEI-NEJAD et al., 2006). Contudo, de algum modo, o fornecimento de probióticos pode estimular a produção de enzimas pelo hospedeiro (ZHOU et al., 2009).

A proteína é considerada o nutriente limitante do crescimento mais importante para camarões peneídeos (KURESHY, DAVIS 2002), sendo também o nutriente mais caro na composição de rações (LIU et al., 2009). Assim, a utilização de micro-organismos que facilitem a digestão e absorção de proteínas, pode ser uma importante ferramenta

para diminuição dos custos de produção da carcinicultura (LIU et al., 2009).

Em *F. indicus*, foi observado que o fornecimento *Bacillus* sp. na dieta aumentou a atividade específica das proteases, lipases e amilases de protozoóreas, misis e pós-larvas (ZIAEI-NEJAD et al., 2006). Resultado semelhante foi observado em larvas de *L. vannamei* com a adição de *B. coagulans* na água (ZHOU et al., 2009). Assim como em juvenis de *L. vannamei*, a adição de *B. subtilis* na água de cultivo (LIU et al., 2009) ou de *Bacillus* sp. na dieta (WANG, 2007) também aumentou a atividade da protease no trato digestório de camarões juvenis.

4.3 Imunoestimulação e resistência à infecção por patógenos

Nos camarões, a primeira linha de defesa contra patógenos é formada por uma rígida carapaça externa, que funciona como uma barreira físico-química. Quando esta barreira é transposta, é desencadeado no hospedeiro uma série de reações imunológicas (humorais e celulares) que objetivam eliminar os invasores (BARRACCO, 2004). Os camarões, assim como outros invertebrados, carecem de um sistema imune adaptativo, diferentemente dos vertebrados (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006). Esta carência de um sistema imune adaptativo inviabiliza o desenvolvimento de vacinas, no conceito clássico, para o combate de enfermidades para camarões (BARRACCO, 2004). Assim, o uso de ferramentas que fortaleçam o sistema imune inato dos camarões é uma importante estratégia para melhorar sua resistência a infecção por patógenos.

Em humanos, o efeito do uso de probióticos no sistema imunológico é conhecido (GILL, 2003) e seu efeito na estimulação da produção de citocinas, que regula a produção de células T, já foi documentado (MAASSEN et al., 2000; PERDIGON et al., 2002). Contudo, esta forma de ação não se estende aos invertebrados. Diversos trabalhos relatam a imunoestimulação de camarões pelo uso de probióticos (RENGPIPAT et al., 2000; GULLIAN et al., 2004; CHIU et al., 2007; LI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007; LI et al., 2009; TSENG et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Contudo, os mecanismos pelos quais os probióticos agem no sistema imunológico dos camarões ainda permanecem desconhecidos.

O uso de *Bacillus* sp. adicionado na água de cultivo de *P. monodon* aumentou o número total de hemócitos dos camarões (THC), a taxa de fagocitose e a atividade da enzima fenoloxidase (PO) dos

camarões. Esta imunoestimulação resultou em maior sobrevivência dos animais ao desafio com *V. harveyi* (RENGPIPAT et al., 2000).

Em *L. vannamei*, a adição de *Bacillus* P64 na água de cultivo aumentou a PO dos animais (GULLIAN et al., 2004). A suplementação na dieta com *B. licheniformis* também aumentou a THC e a atividade da PO e da enzima superóxido dismutase (SOD) de *L. vannamei* (LI et al., 2007). Tseng et al., (2009) relata que a dieta suplementada com 10^8 UFC/kg de *B. subtilis* aumentou a atividade da PO e a taxa de fagocitose de *L. vannamei*, aumentando a sobrevivência dos animais ao *V. alginolyticus*.

Chiu et al., 2007, demonstraram que a expressão do gene que codifica a fenoloxidase e da peroxinectina é estimulado em *L. vannamei* em resposta a alimentação dos animais com dieta suplementada com *L. plantarum*. Adicionalmente, a atividade da PO e SOD dos animais também foi aumentada pelo fornecimento do probiótico, resultando em maior sobrevivência dos camarões ao desafio contra *V. alginolyticus*.

A utilização de probióticos pode, portanto aumentar a resistência dos camarões a infecções virais. Li et al., (2009) demonstraram que a adição de *Bacillus* OJ na dieta de *L. vannamei* aumentou a sobrevivência dos animais ao desafio contra WSSV. Em *F. chinensis*, o uso do probiótico *Halomonas* sp. B12 também aumentou a resistência dos camarões ao desafio contra WSSV (XIAOJIE, HONGMING, 2009). Ramirez (2006), demonstrou que o fornecimento de alimentação suplementada com *Lactobacillus* sp. a camarões com diagnóstico positivo para WSSV (por *nested* PCR) resultou em melhoria na sobrevivência destes camarões (56%) à infecção com *Vibrio alginolyticus* em relação ao controle (15%).

4.4 Sensor de quorum (*Quorum sensing*)

As bactérias podem agir de forma coordenada através da emissão e detecção de pequenos compostos químicos cuja concentração é crucial na coordenação do comportamento da população bacteriana (BOYER, WISNIEWSKI-DYÉ, 2009). Este processo é conhecido por sensor de quorum, e permite que a população bacteriana, em elevadas concentrações, expresse genes específicos quando o quorum presente é atingido (FUQUA et al., 1994). Uma vez que a população de bactérias aumenta, também aumenta a concentração dos sinais químicos, que são detectados e ativam ou reprimem a expressão de genes específicos. Alguns dos mais estudados sinais químicos são as N-acil homoserinas

lactonas (AHLs) que já foram descritos para mais 70 gêneros de bactérias (BOYER, WISNIEWSKI-DYÉ, 2009).

Em bactérias patogênicas, como as do gênero *Vibrio*, a concentração de AHLs estão relacionadas com a produção de toxinas e fatores de virulência (NG, BASSLER, 2009). Baruah et al., (2009), relataram que a adição de AHLs na água de cultivo, diminuiu a sobrevivência de larvas de *M. rosenbergii*, provavelmente por ativar os fatores de virulência da população bacteriana.

O uso de um probiótico, que degrade os AHLs, poderia diminuir o fator de virulência da população bacteriana, aumentando a sobrevivência dos animais de cultivo (DEFOIRDT et al., 2008). Como exemplo, culturas bacterianas com a capacidade de degradar AHLs, isoladas do trato digestório de *L. vannamei*, aumentaram a sobrevivência da larvicultura de linguado europeu ao serem adicionadas a água de cultivo (TINH et al., 2008). Contudo, a adição de bactérias que degradem AHLs no cultivo de camarões marinhos ainda precisa ser avaliada.

4.5 Melhora nos índices zootécnicos

Independentemente do modo de ação, é esperado que o uso de probióticos reflita na melhoria de pelo menos algum índice zootécnico no cultivo de camarões, seja na larvicultura ou engorda.

Quando as larvas de camarões marinhos estão no estágio de náuplio, sua nutrição é feita somente de vitelo, não havendo alimentação exógena. Neste estágio, existe apenas uma pequena colonização de bactérias pelo poro anal das larvas (GOMEZ-GIL et al., 2000). As larvas somente apresentam o trato digestório totalmente colonizado quando há a transformação para o estágio de protozoa, com o início da alimentação exógena. Sendo assim o fornecimento de dieta suplementada com probiótico, já neste estágio, pode levar ao estabelecimento de uma microbiota bacteriana intestinal favorável desde um primeiro momento, ocupando o espaço que poderia ser ocupado por bactérias patogênicas (GOMEZ-GIL et al., 2000).

Na larvicultura de *F. indicus*, a adição do *Bacillus* sp. na água aumentou a sobrevivência das larvas nos estágios de protozoa e misis (ZIAEI-NEJAD et al., 2006). O uso de *B. coagulans* também melhorou a sobrevivência na larvicultura de *L. vannamei* (ZHOU et al., 2009), assim como de *B. fusiformis* na larvicultura de *P. monodon* e *L. vannamei* (GUO et al., 2009). Em larviculturas comerciais de *L.*

vannamei, Decamp et al., (2008) relatam que o uso de probiótico a base de *Bacillus* sp. aumenta a sobrevivência.

Na engorda, o uso de *Bacillus* sp. (RENGPIPAT et al., 1998) e *Lactobacillus* sp. (PHIANPHAK et al., 1999) aumentaram a sobrevivência de *P. monodon*. Em *M. rosenbergii*, a adição de *L. acidophilus* e *L. sporogenes* aumentaram o crescimento e diminuiu a conversão alimentar dos animais (VENKAT et al., 2004). Resultado semelhante foi observado na adição de *Bacillus* sp. na água de cultivo de *F. indicus*, resultando em maior sobrevivência, ganho de peso e menor conversão alimentar dos camarões cultivados (ZIAEI-NEJAD et al., 2006).

A utilização de dieta suplementada com *Bacillus* sp. melhorou o crescimento e conversão alimentar de *L. vannamei* (LIU et al., 2009). A melhoria na conversão alimentar deve estar relacionada a maior digestibilidade aparente da dieta pela adição de *Bacillus* sp., já relatada por Lin et al., 2004.

No cultivo comercial de *P. monodon* (SOUNDARAPANDIAN, SANKAR, 2008) e *L. vannamei* (WANG et al., 2005), a adição de um probiótico comercial a base de *Bacillus* sp. na água de cultivo aumentou a sobrevivência e ganho de peso dos animais. Também em condições de cultivo, a adição de *P. acidilactici* aumentou a sobrevivência e diminuiu a conversão alimentar de *L. stylirostris* (CASTEX et al., 2008).

5 SELEÇÃO DE PROBIÓTICOS

O isolamento de uma cepa de bactéria específica com características benéficas para ser usada como probiótico é um trabalho complexo. Este trabalho deve seguir uma série de procedimentos, que vão desde o isolamento das bactérias até testes em escala comercial de cultivo que comprovem sua eficácia (BALCÁZAR et al., 2006). Os passos para seleção de um novo probiótico estão descritos na Figura 2.

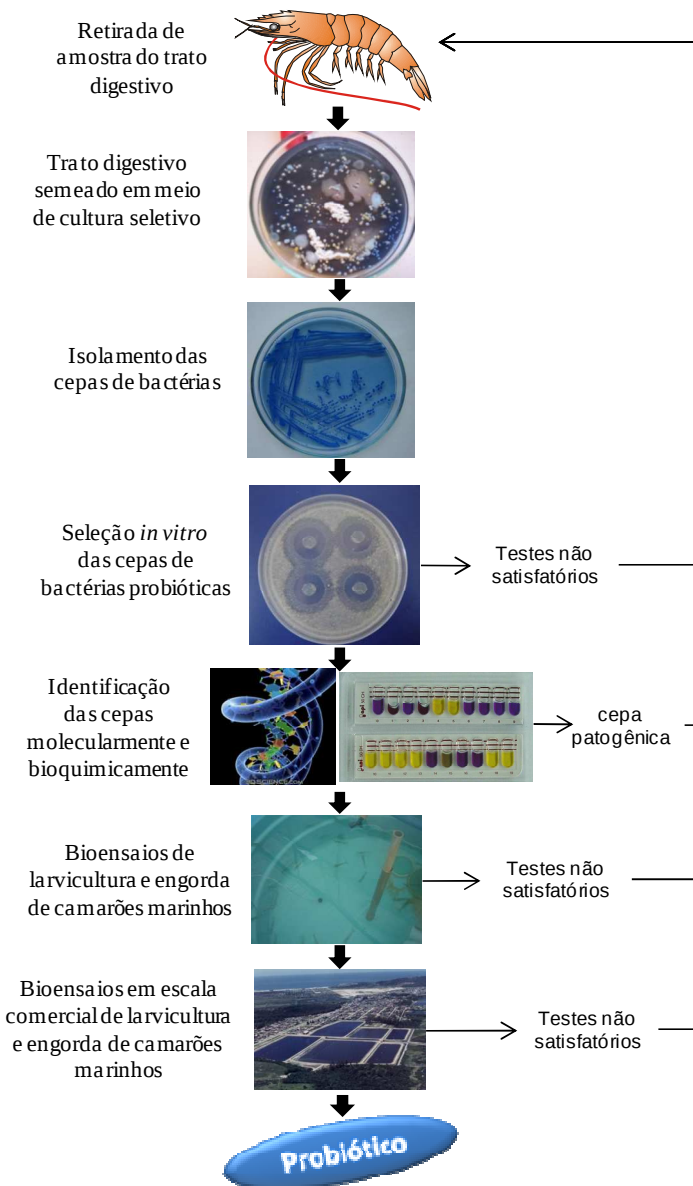


Figura 2: Fluxograma referente ao isolamento, caracterização e seleção de bactérias probióticas a ser realizado neste projeto.

5.1 Isolamento e seleção *in vitro*

O isolamento de bactérias do trato digestório do animal de interesse é o primeiro passo para obter sucesso no desenvolvimento de um probiótico (BALCÁZAR et al., 2006). Esta etapa normalmente está associada ao isolamento de dezenas ou até centenas de cepas de bactérias com potencial probiótico (GULLIAN et al., 2004). Este elevado número de bactérias inviabiliza a realização de ensaios com animais com todas as cepas isoladas. Assim, são realizados diversos testes de seleção em escala de laboratório (*in vitro*) como inibição de patógenos, produção de enzimas digestivas produção de substâncias antimicrobianas, velocidade de crescimento, capacidade de adesão do epitélio intestinal para a seleção de algumas cepas para realizar os ensaios como os animais de interesse (*in vivo*) (GATESOUBE et al., 1997; GULLIAN et al., 2004; VINE et al., 2004; BALCÁZAR et al., 2007b, 2008; ALY et al., 2008; EL-RHMAN et al., 2009)

Entre os testes *in vitro*, os ensaios de inibição de patógenos são os mais utilizados (VINE et al., 2004). Neste teste, é possível avaliar a capacidade do potencial probiótico na inibição de diferentes patógenos que podem causar danos aos animais cultivados. A técnica de difusão em ágar, por exemplo, utiliza como indicador a zona de inibição de crescimento do patógeno pela cepa probiótica (Figura 3)

Se nenhuma das cepas inicialmente isoladas apresentarem resultados satisfatórios nos testes *in vitro*, novas cepas devem ser isoladas. As cepas com bons resultados devem então ser identificadas (BALCÁZAR et al., 2006). Espécies de bactérias com histórico de serem agentes patogênicos para espécies aquáticas devem ser descartadas.

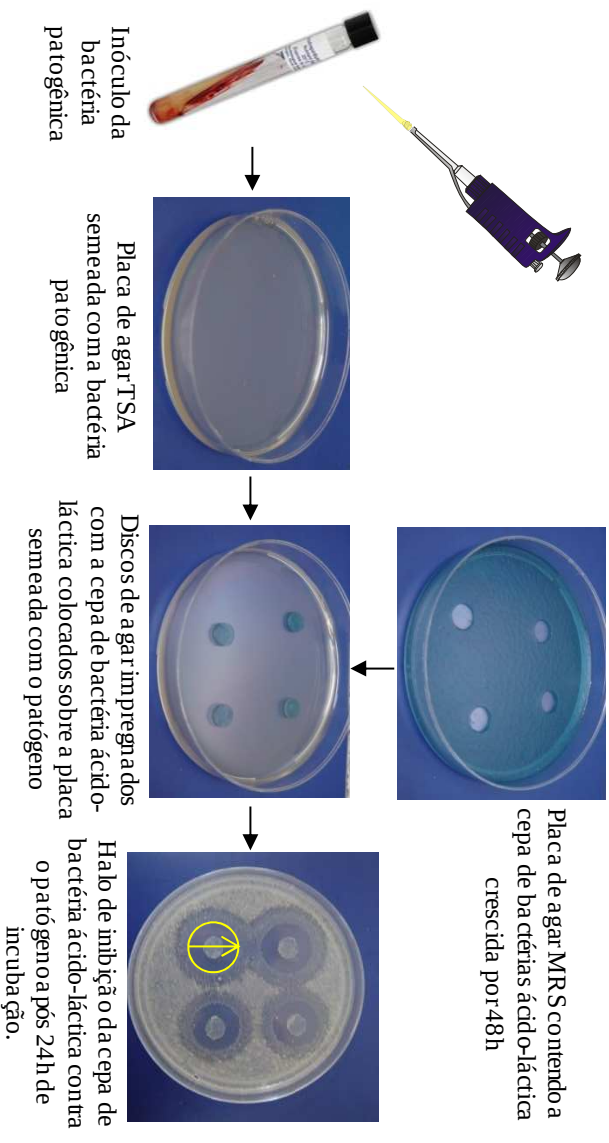


Figura 3: Metodologia para determinação *in vitro* da inibição do crescimento de cepas patogênicas por cepas de bactérias probióticas.

5.2 Ensaios em escala piloto

O passo seguinte no desenvolvimento do probiótico é a realização de ensaios com os animais de interesse em escala piloto. Nestes testes, pode-se utilizar a bactéria de duas maneiras: adicionada a dieta (CHIU et al., 2007) ou adicionada diretamente na água (VENKAT et al., 2004; RENGIPAT et al., 1998; 2000; GULLIAN et al., 2004). Independente de via escolhida, a primeira avaliação a ser realizada é se a cepa de bactéria coloniza o trato digestório do animal de interesse (BALCÁZAR et al., 2006). Neste momento, deve-se verificar se as bactérias selecionadas não causam algum sintoma patológico no animal (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Se o ensaio de colonização for bem sucedido, deve-se observar se a bactéria selecionada traz algum benefício ao hospedeiro. Nesta etapa podem ser realizados os mais diferentes ensaios, visando observar se a bactéria: melhora a microbiota bacteriana intestinal dos animais (diminui a população de bactérias patogênicas) (RENGIPAT et al., 1998, 2000; GULLIAN et al., 2004; CASTEX et al., 2008), aumenta a taxa de crescimento (VENKAT et al., 2004; CASTEX et al., 2008), melhora a digestibilidade da dieta (LIN et al., 2004), melhora o sistema imunológico (GULLIAN et al., 2004; CHIU et al., 2007, CASTEX et al., 2008) e traz maior resistência dos animais ao desafio contra patógenos bacterianos (CHIU et al., 2007; TSENG et al., 2009) e virais (XIAOJIE, HONGMING, 2009; LI et al., 2009). Se a bactéria não trazer nenhum benefício ao hospedeiro ela deve ser descartada e o processo de seleção do probiótico reiniciado (BALCÁZAR et al., 2006).

5.3 Ensaios em escala comercial

As condições em que são realizados os ensaios laboratoriais não condizem, na maioria das vezes, com as de cultivos comerciais. Assim, devem-se realizar ensaios em escala de produção para certificar-se de que os resultados positivos nos ensaios de laboratório se repetem no cultivo comercial (BALCÁZAR et al., 2006). Adicionalmente, nem sempre a forma em que o probiótico foi aplicado em escala piloto pode ser realizada em escala comercial, e precisa ser adaptada.

Os ensaios podem ser realizados em fazendas experimentais (RODRIGUEZ et al., 2007) ou em fazendas comerciais em conjunto com produtores (WANG et al., 2005; SOUNDARAPANDIAN, SANKAR, 2008). Nestes ensaios, deve-se observar o custo/benefício da adição do probiótico. Se os resultados forem positivos, está selecionada

uma nova bactérias para ser utilizada como probióticos. Caso contrário, se inicia um novo trabalho de isolamento e seleção.

6 JUSTIFICATIVA

Até o momento, as cepas de bactérias probióticas disponíveis no mercado brasileiro são importadas e não tem eficácia comprovada nas condições de cultivo nacional. Ainda, ao utilizar estas cepas, se introduz no ambiente uma bactéria exótica, cuja proliferação é imprevisível. Assim, destaca-se o caráter de ineditismo deste trabalho, ao trabalhar com o isolamento de cepas de bactérias brasileiras de camarões marinhos.

O desenvolvimento de probiótico isolado do trato digestório de camarões no ambiente de cultivo catarinense constitui uma possibilidade para contribuir com a solução do problema da presença das enfermidades na carcinicultura marinha. Também, o desenvolvimento da tecnologia e os detalhes da sua aplicabilidade em larga escala serão fundamentais para a carcinicultura no Brasil e para a aquicultura de forma ampla.

7 OBJETIVO

7.1 Objetivo geral

Desenvolver um probiótico com bactérias oriundas do trato digestório de camarões marinhos cultivados em Santa Catarina (*Litopenaeus vannamei*) avaliando seu efeito benéfico na larvicultura e engorda em escala piloto e comercial.

7.2 Objetivos específicos

- a) Isolamento de bactérias probióticas com potencial de proteção da saúde dos camarões;
- b) Caracterização *in vitro* das cepas isoladas e seleção das cepas para ensaios *in vivo*;
- c) Avaliar o uso de dieta suplementada com o probiótico em larvicultura piloto sobre os parâmetros zootécnicos e microbiológicos e resistência das larvas de camarões a infecção experimental por *V. harveyi*;

- d) Avaliação do efeito da suplementação na alimentação das bactérias probióticas sobre os parâmetros zootécnicos e imunológicos em engorda piloto de camarões marinhos;
- e) Avaliar o efeito da suplementação da dieta com as bactérias probióticas quanto à resistência dos camarões juvenis à infecção experimental por *Vibrio harveyi*;
- f) Avaliar o efeito da utilização em larga escala dos probióticos desenvolvidos em fazenda de engorda, sobre os índices zootécnicos, imunológicos, microbiológicos dos camarões cultivados.

8 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese está dividida em cinco capítulos. O primeiro referente a introdução e revisão de literatura e os quatro demais correspondem cada um a um artigo. O segundo e quinto capítulos estão formatados de acordo com as normas da revista “Aquaculture Research”; o terceiro de acordo a “Brazilian Journal of Oceanography” e o quarto segundo o “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E SELEÇÃO *IN VITRO* POR MÚLTIPLAS CARACTERÍSTICAS DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA USO COMO PROBIÓTICOS NA CARCINICULTURA MARINHA

Felipe do Nascimento Vieira, Adolfo Jatobá, José Luiz Pedreira
Mouriño, Bruno Correa da Silva, Eduardo Alano Vieira, Mariana
Soares, Walter Quadros Seiffert, Maurício Laterça Martins, Luis
Vinatea

Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture
Research”

9 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar cepas de bactérias ácido lácticas com potencial probiótico do trato digestório de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e realizar uma seleção *in vitro* baseada em múltiplas características. Foi definido o ideótipo (cepa ideal proposta), por meio das maiores médias dentre as cepas avaliadas para os caracteres velocidade máxima de crescimento, contagem final de células viáveis e halo de inibição contra nove patógenos de origem continental e marinha, e das menores médias para os caracteres tempo de duplicação, e tolerância das cepas para NaCl (1,5 e 3,0%), pH (6, 8, e 9) e sais biliares (5%). Foram estimadas as distâncias de Mahalanobis (D^2) entre todas as cepas trabalhadas do ideótipo, sendo consideradas as melhores candidatas as que apresentaram menor distância do ideótipo. Foram isoladas 10 cepas de bactérias identificadas bioquimicamente como *Lactobacillus plantarum* (3), *Lactobacillus brevis* (3), *Weissella confusa* (2), *Lactococcus lactis* (1) e *Lactobacillus delbrueckii* (1). As cepas de *L. plantarum* apresentaram a menor distância em relação ao ideótipo, seguidas pelas cepas de *W. confusa*, *L. brevis*, *L. lactis*, e *L. delbrueckii*. Entre as cepas avaliadas, as de *L. plantarum* apresentam o maior potencial para serem utilizadas como probióticos para camarões marinhos.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, camarão, bactérias ácido lácticas, inibição de patógenos.

10 ABSTRACT

The aim of this assay was to isolate lactic-acid bacteria strains from the intestines of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with probiotic potential and to realize in vitro selection based on the multiple characters. The most ideal strain was studied by analyzing the highest averages in growth maximum velocity, final counts of viable cells and inhibition against nine freshwater and marine pathogens. The lowest averages to duplication time and the resistance to (1.5 and 3.0%), pH (6, 8, and 9) and biliar salts (5%) were also determined. From the distances of Mahalanobis (D^2) among the studied strains, the best applicant strains were used. Ten bacterial strains were isolated and biochemically identified as *Lactobacillus plantarum* (3), *Lactobacillus brevis* (3), *Weissella confusa* (2), *Lactococcus lactis* (1) and *Lactobacillus delbrueckii* (1). *Lactobacillus plantarum* showed the lower distance in relation to ideal strain followed by *Weissella confusa*, *L. brevis*, *L. lactis*. and *L. delbrueckii*. Among the analyzed strains, *L. plantarum* has shown the highest potential to be used as a probiotic for marine shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, acid lactic bacteria, pathogen inhibition.

11 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vêm crescendo o interesse da indústria da carcinicultura marinha no uso de bactérias probióticas. Gatesoupe, (1999) define probiótico como “micro-organismo vivo que ao ser ministrado aos cultivos coloniza o trato digestório dos animais com o objetivo de melhorar sua saúde”.

Diversos são os relatos positivos do uso de probióticos na carcinicultura, incluindo melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (Rengpipat et al., 1998; Li et al., 2009; Zhang et al., 2009), produção/estimulação da produção de enzimas digestivas (Liu et al., 2009; Zhou et al., 2009), melhoria na taxa de crescimento (Liu et al., 2009; Far et al., 2009), eficiência alimentar (Lin et al., 2004; Wang et al., 2007), imunoestimulação (Gullian et al., 2004; Chiu et al., 2007; Zhang et al. 2009), resistência a infecção por patógenos bacterianos (Rengpipat et al., 2000) e virais (Tseng et al., 2009; Zhang et al., 2009). Contudo, os resultados do uso de probióticos ainda são controversos, com alguns relatos negativos (sem ação no hospedeiro) da sua utilização (MacIntosh et al., 2000; Meunpol et al., 2003; Alavandi et al., 2004). Estes relatos estão normalmente associados a produtos comerciais (MacIntosh et al., 2000; Meunpol et al., 2003), que muitas vezes é formulado por bactérias que não são oriundas do animal de estudo, até mesmo de ambiente terrestre.

O isolamento de bactérias do trato digestório do animal de interesse é o primeiro passo para o sucesso na obtenção de um novo probiótico (Balcazar et al., 2006). Esta etapa normalmente está associada ao isolamento de dezenas ou até centenas de cepas (Gullian et al., 2004). Após isolamento, normalmente, diversos testes de seleção *in vitro* como inibição de patógenos (Hai et al., 2007; Sansawat et al., 2009; Guo et al., 2009), produção de enzimas digestivas (Ochoa-Solano, 2006) produção de substâncias antimicrobianas (Sugita et al., 2007, Vázques et al., 2005), velocidade de crescimento (Vine et al., 2004a), capacidade de adesão do epitélio intestinal (Vine et al., 2004b) são realizados para a seleção de apenas algumas cepas para os ensaios *in vivo*. Contudo, a análise para a seleção das cepas *in vitro* a partir de tantos ensaios se torna complexa.

Entre as bactérias utilizadas como probióticos, destacam-se as ácido lácticas (Gatesoupe, 2008), por serem de fácil multiplicação, produzirem compostos antimicrobianos (ácidos orgânicos, ácido láctico,

bacteriocinas, e peróxido de hidrogênio) além de estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (Ringo & Gatesoupe, 1998).

O objetivo deste trabalho foi isolar cepas de bactérias ácido lácticas com potencial probiótico do trato digestório de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e realizar uma seleção *in vitro* baseada em múltiplas características.

12 MATERIAL E MÉTODOS

12.1 Isolamento bacteriano

As cepas foram isoladas do trato digestório de camarões adultos (*Litopenaeus vannamei*) provenientes do banco de matrizes do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Dos camarões coletados, foi extirpado o trato digestório em conexões de esterilidade que foi macerado em solução salina 2% de NaCl, semeados em placas com meio de cultura MRS (de Man; Rogosa; Sharpe, 1960) e incubadas por 48h a 30°C.

Depois da incubação, as colônias crescidas nos meios de cultura foram identificadas morfológicamente pelo método de Gram. As colônias de interesse foram semeadas em placas de Petri com meio de cultura MRS pelo método de estrias para o isolamento.

12.2 Cinética de crescimento

As cepas foram incubadas em triplicata em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura líquido MRS e mantidos a 30°C sob agitação contínua durante 24h. O monitoramento do crescimento bacteriano foi realizado a cada duas horas, pela leitura de 100µL de amostra de cada tubo em leitor de microplacas a 630nm. A concentração do inóculo foi transformada para unidades formadoras de colônia (UFC)/mL a partir de uma curva padrão feita previamente para cada cepa. A partir destes resultados, foi calculada a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e tempo de duplicação (t_{dup}) das cepas, segundo as seguintes equações:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(Z) - \ln(Z_0)}{dt}$$

Velocidade máxima:

Onde: μ_{max} = velocidade máxima de crescimento

Z = concentração (UFC/mL)

Z_0 = concentração inicial do inóculo (UFC/mL)

dt = tempo de cultivo (horas)

Tempo de duplicação

$$t_{dup} = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}$$

Onde: t_{dup} = tempo de duplicação (horas)

μ_{max} = velocidade máxima de crescimento

Após 24 h de crescimento, amostras de todos os frascos foram semeadas em meio de cultura Ágar MRS pela técnica de diluições seriadas e incubadas a 30°C por 48h. Passado este período, foram estimadas as unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

12.3 Estudo de tolerância frente a sais biliares

Para o estudo de tolerância das cepas frente a sais biliares foi seguido o método recomendado por Yimin et al., (1999). Sumariamente, as cepas foram incubadas (30°C) por 24h em tubos contendo 10mL de caldo MRS adicionado de 5% (p/v) de sais biliares (utilizando bile bovina) e sem sais biliares, em triplicata. Posteriormente, foi realizada a leitura de 100µL de cada cultura de cada tubo em leitor de microplacas a 630nm. A tolerância de cada cepa de bactéria isolada frente a sais biliares foi determinada pela porcentagem de queda na absorbância em relação ao meio de cultura sem adição de sais biliares.

12.4 Estudo de tolerância a NaCl

As cepas de bactérias foram semeadas em tubos contendo 10mL de meio de cultura caldo MRS adicionado de sal (0, 1,5 e 3%) e

incubados (30°C) durante 24 horas em triplicata. Posteriormente, foi realizada a leitura de 100µL de cada cultura em leitor de microplacas (DO de 630nm). A tolerância de cada cepa de bactéria isolada frente às diferentes concentrações de NaCl foi determinada pela porcentagem de queda na absorbância em relação ao meio de cultura sem adição de sal.

12.5 Estudo de tolerância ao pH

As cepas de bactérias foram semeadas em meio de cultura caldo MRS a diferentes pHs (6, 7, 8 e 9) e colocadas na estufa (30°C) durante 24 horas em triplicata. Posteriormente, foi realizada a leitura de 100µL de cada cultura em leitor de microplacas (DO de 630nm). A tolerância de cada cepa de bactéria isolada frente aos diferentes pHs foi determinada pela porcentagem de queda na absorbância em relação ao meio de cultura com pH 7.

12.6 Inibição de patógenos *in vitro*:

As cepas de bactérias isoladas dos camarões foram avaliadas pela sua capacidade de inibição das cepas de bactérias patogênicas gram negativas (*Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Vibrio alginolyticus* BCCM 2068, *Vibrio anguillarum* ATCC 19264, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* D363) e gram positivas (*Enterococcus durans* ATCC 19432, *Micrococcus luteus* A270, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715) *in vitro*. Para isto, placas de petri com meio de cultura ágar MRS foram semeadas com as cepas de bactérias isoladas dos camarões marinhos e incubadas a 30°C por 48h. Após este período, foram semeadas novas placas de petri com uma das cepas de patógenos em meio de cultura ágar Triptona de Soja (TSA) para as cepas patogênicas de água doce e TSA suplementado de 1,5% de sal para as de água salgada. Então, foram retirados discos de ágar (1cm de diâmetro) das placas de petri contendo as bactérias inicialmente isoladas e crescidas. Estes discos de ágar foram colocados sobre o meio de cultura das placas recém semeadas com os patógenos e incubadas a 30°C por 24h. A inibição do crescimento dos patógenos foi determinada pelo diâmetro do halo produzido ao redor do disco de ágar (Anexo I).

12.7 Identificação das espécies:

A identificação inicial das cepas selecionadas foi realizada fenotipicamente com o uso das galerias API 50 CHL mediante a fermentação de carboidratos (Biomérieux). A cepa que apresentou os

melhores resultados na seleção *in vitro* foi identificada molecularmente pelo sequenciamento e análise filogenética de fragmentos de gene RNAr 16S na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Suas sequências foram confrontadas com as sequências de organismos depositadas no Genbank.

12.8 Análise estatística

Os resultados dos caracteres avaliados foram submetidos à análise de variância unifatorial, segundo o delineamento inteiramente ao acaso com três repetições e posteriormente às médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls (SNK), ao nível de significância de 0,05 (Zars, 1994).

Posteriormente foi definido o ideótipo (cepa ideal proposta), por meio das maiores médias dentre as cepas avaliadas para os caracteres velocidade máxima de crescimento, contagem final de células viáveis e halo de inibição contra os patógenos, e das menores médias para os caracteres tempo de duplicação, perda de viabilidade das cepas a NaCl (1,5 e 3,0%), pH (6, 8, e 9) e sais biliares (5%). Em seguida, foram estimadas as distâncias de Mahalanobis (D^2), a partir de dados padronizados, entre todas as cepas trabalhadas e o ideótipo, com o auxílio do programa computacional Genes (Cruz, 2001). Desta forma, as cepas foram classificadas de acordo com o índice de seleção da distância ao ideótipo, ou seja, a distância que apresentaram em relação ao ideótipo, sendo consideradas as melhores cepas as que apresentaram as menores distâncias.

13 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 10 cepas de bactérias ácido lácticas do trato digestório de camarões marinhos da espécie *L. vannamei*, sendo três identificadas bioquimicamente como *Lactobacillus plantarum*, três como *Lactobacillus brevis*, duas como *Weissella confusa*, uma como *Lactococcus lactis* e uma como *Lactobacillus delbrueckii* (Tabela 2). A cepa de *L. plantarum* 1 teve sua identificação confirmada molecularmente, sendo mantida na coleção de microorganismos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o número de acesso CPQBA 007-07 DRM01. Para o desenvolvimento de um probiótico eficiente para uso na aquicultura, é indispensável que o micro-organismo utilizado como probiótico seja oriundo do animal de

interesse (Balcázar et al., 2006). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as bactérias ácido lácticas cumprem esta premissa.

As cepas avaliadas apresentaram grande variabilidade fenotípica, evidenciada pela diferença significativa ($p < 0,05$) observada pela análise de variância em todos os caracteres avaliados (Tabelas 3 e 4). A maioria dos caracteres avaliados apresentou grande variabilidade, representada pela grande amplitude entre a maior e a menor média. O halo de inibição contra *V. anguillarum* foi o caracter que apresentou maior variabilidade, evidenciado pelo maior número de classes distintas (8 classes) pelo teste de separação de médias SNK. Foram observadas desde cepas sem a capacidade de inibir o crescimento de *V. anguillarum* (*L. brevis* 1) até cepas que inibiram $17,67 \pm 0,58$ mm (*L. plantarum* 1) (Tabela 3).

A cepa *L. plantarum* 1, teve em média, os maiores ($p < 0,05$) halos de inibição do crescimento ($16,61 \pm 3,30$ mm) contra as cepas Gram negativas (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *A. hydrophila*), seguidos pelo *L. plantarum* 2 ($14,61 \pm 2,94$ mm) e *L. plantarum* 3 ($14,44 \pm 3,56$ mm). Para as bactérias Gram positivas (*M. luteos*, *E. durans* e *Y. enterocolitica*) as 3 cepas de *L. plantarum* apresentaram em média os maiores ($p > 0,05$) halos de inibição, com valores respectivos de $18,22 \pm 5,04$, $17,89 \pm 5,92$ e $17,33 \pm 4,33$ mm para as cepas *L. plantarum* 1, 2 e 3, sendo superiores as demais cepas ($p < 0,05$). Estes resultados demonstram que os *L. plantarum* apresentam um grande espectro de ação contra patógenos, tanto Gram negativos quanto Gram positivos (Tabela 3).

Tabela 2: Identificação fenotípica das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato digestório de camarões marinhos pela fermentação de 49 carboidratos pelo kit api 50 CHL (Biomérieux).

[illegible]

Tabela 2: continuação.

Testes bioquímicos	Cepas									
	Lpl1	Lpl2	Lpl3	Lbr1	Lbr2	Lbr3	Wco1	Wco2	Lla1	Lde1
Salicina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
D-Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
D-Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Trealose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinose	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Turanose	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Lixose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato de potássio	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
2-Cetogluconato de potássio	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
5-Cetogluconato de potássio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Probabilidade (%)	99,9	99,9	99,9	94,5	94,4	89,9	78,5	99,6	82,4	78,0

Lpl = *Lactobacillus plantarum*, Lbr = *Lactobacillus brevis*, Wco = *Weissella confusa*, Lla = *Lactococcus lactis*, Lde = *Lactobacillus delbrueckii*.

As bactérias ácido lácticas são conhecidas como produtoras de compostos antimicrobianos (Roissart & Luquet, 1994). Dentre estes compostos, as bacteriocinas estão entre os mais estudados, tendo ação principalmente contra bactérias Gram positivas (Gillor et al., 2008). O *L. plantarum* produz uma bacteriocina conhecida como plantaricim (Suma et al., 1998; van Reenen et al., 1998; Hernández et al. 2004), a qual pode estar relacionada a formação dos halos de inibição do crescimento observados contra as bactérias Gram positivas neste estudo. Contudo, as bacteriocinas não possuem grande ação contra as bactérias Gram negativas (Vázques et al., 2005). Os halos de inibição do crescimento formados contra as bactérias Gram negativas possivelmente estão associados a outros compostos produzidos por bactérias ácido lácticas como peróxido de hidrogênio (Sugita et al., 2007) e ácidos orgânicos e acético (Vázques et al., 2005). Semelhante inibição *in vitro* contra patógenos foi relatada por outros potenciais probióticos isolados de organismos aquáticos como *Lactobacillus* sp. isolado de salmão (Balcázar et al., 2007, 2008), *Bacillus pumilus* (Aly et al., 2008), *M. lutueus* e *Pseudomonas* sp. (El-Rhman et al., 2009), *Lactobacillus plantarum* (Jatobá et al., 2008) isoladas de tilápias e *Bacillus* sp. isolado de *L. vannamei* (Gullian et al., 2004).

Para a contagem final de células viáveis e velocidade máxima de crescimento, somente a cepa *L. plantarum* 2 apresentou resultado superior ($p < 0,05$) as demais. Já para o tempo de duplicação, houve uma sobreposição na separação de médias. Contudo, a cepa *L. plantarum* 2 apresentou os menores valores brutos (Tabela 4). Maior velocidade de crescimento e menor tempo de duplicação das bactérias tornam os processos comerciais de produção mais eficientes e podem indicar uma maior competitividade *in vivo* da cepa (Vine et al., 2004a). Os resultados da cinética de crescimento obtidos pelas cepas isoladas de camarões foram superiores para a velocidade máxima de crescimento e contagem final de células viáveis e inferiores para tempo de duplicação em relação a cepas de probióticos com potencial para aquicultura isoladas por Vine et al., (2004a).

Na carcinicultura marinha, a variação na salinidade dos cultivos, dependendo da região, época do ano e índice de pluviosidade, pode variar desde valores próximos a zero (Araneda et al., 2008) até águas com salinidade superior a oceânica como ocorrido em regiões salineiras. Assim, é importante que uma bactéria probiótica comercial possa suportar ampla variação de salinidade. A cepa *L. plantarum* 1, foi a única que não apresentou perda de crescimento quando exposta a 1,5%

de NaCl. Já em 3,0% de NaCl, observou-se que para todas as cepas bacterianas houve perda no crescimento em relação a 1,5%. Contudo, em 3% de NaCl, a cepa que apresentou menor perda de crescimento foi a *W. confusa* 2, contudo não diferindo significativamente das cepas *L. plantarum* 1, 2 e 3; *L. brevis* 1 e 3; *W. confusa* 1 e *L. lactis* 1 (Tabela 4). Ricciardi et al., (2009) e Papamanoli et al., (2002) também observaram, respectivamente, que cepas de *W. cibaria* e *L. plantarum* apresentaram baixa perda de viabilidade em meios com adição de 3% de NaCl.

Semelhante a salinidade, o pH da água de cultivo não é constante, podendo variar desde próximos a 6 no cultivo superintensivo de camarões em bioflocos (Vinatea et al., 2010) até 9 em um viveiro de cultivo eutrofizado (Momoyama, 2004). Assim, é importante que uma cepa selecionada para ser utilizada como probiótico resista a uma ampla faixa de pH. Com pH 6, houve perda de crescimento em todas as cepas avaliadas, contudo as cepas *L. plantarum* 1, 2 e 3; *L. brevis* 1 e *W. confusa* tiveram menor perda de crescimento em relação as demais. Já para os pHs 8 e 9, o *L. plantarum* 1 foi a única cepa que não apresentou perda no crescimento (Tabela 4). Papamanoli et al., (2002) observaram que o *L. plantarum* apresenta baixa perda de viabilidade em meios de cultura com pH de até 5.

Os sais biliares têm função emulsificante, aumentando a solubilidade das gorduras e das vitaminas lipossolúveis para ajudar na sua absorção (Lehninger et al., 2008). Este efeito detergente é microbicida, pois pode afetar os fosfolipídios e ácidos graxos das paredes dos micro-organismos. Contudo, algumas bactérias são capazes de hidrolisar os sais biliares com enzimas específicas, diminuindo o efeito detergente (Erkkilä & Petäjä, 2000). Para que um probiótico colonize eficientemente o trato digestório de um animal, é importante que ele possa resistir aos sais biliares. Os sais biliares diminuíram o crescimento de todas as cepas avaliadas, contudo o *L. plantarum* 2 e *L. lactis* 1 foram as cepas que tiveram menor perda de crescimento. Cepas de *L. plantarum* e *L. lactis* isoladas de truta arco-íris também apresentaram baixa perda de viabilidade por sais biliares (Balcázar et al., 2008).

Tabela 3: Halo de inibição (em mm) contra *Vibrio harveyi* (VH), *V. alginolyticus* (Val), *V. anguillarum* (Van), *Enterococcus durans* (ED), *Micrococcus luteus* (ML), *Escherichia coli* (EC), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Aeromonas hydrophila* (AH) e *Yersenia enterocolitica* (YE) das 10 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato digestório de *Litopenaeus vannamei*.

Cepas	VH	VAL	VAN	ED	ML	EC	PA	AH	YE
	16,33±	13,00±	17,67±	14,67±	24,00±	26,33±	16,67±	9,67±	16,00±
Lpl1	0,58 ^a	1,00 ^c	0,58 ^a	0,58 ^{ab}	1,00 ^a	0,58 ^a	1,53 ^a	0,58 ^{cd}	1,00 ^a
	13,33±	20,00±	10,33±	12,67±	24,33±	16,33±	13,33±	13,33±	16,67±
Lpl2	0,58 ^b	2,00 ^a	0,58 ^c	1,15 ^{ab}	0,58 ^a	1,15 ^c	0,58 ^{cd}	1,53 ^a	0,58 ^a
	16,00±	13,33±	14,00±	14,67±	22,33±	20,00±	15,67±	8,67±	15,00±
Lpl3	0,00 ^a	0,58 ^b	0,00 ^b	0,58 ^{ab}	0,58 ^b	2,00 ^b	0,58 ^{abc}	0,58 ^{cd}	1,73 ^{ab}
	9,00±	9,67±	0,00±	6,00±	15,67±	14,00±	13,67±	8,00±	10,67±
Lbr1	0,00 ^{cd}	1,15 ^{cd}	0,00 ^g	5,20 ^d	1,53 ^d	1,00 ^d	1,53 ^{bcd}	0,00 ^d	2,08 ^{cd}
	8,33±	11,67±	7,33±	7,67±	13,67±	10,33±	8,67±	10,33±	8,00±
Lbr2	0,58 ^d	0,58 ^{bc}	0,58 ^e	0,58 ^{cd}	0,58 ^{ef}	0,58 ^{cd}	0,58 ^e	0,58 ^{bc}	1,00 ^d
	0,00±	9,00±	9,00±	10,67±	15,00±	10,67±	12,33±	8,00±	12,33±
Lbr3	0,00 ^f	0,00 ^d	0,00 ^d	0,58 ^{bc}	1,00 ^{de}	0,58 ^{cd}	0,58 ^d	0,00 ^d	2,08 ^{bc}
	9,67±	11,33±	7,67±	5,67±	11,33±	11,33±	8,67±	8,33±	8,33±
Wco1	0,58 ^c	0,58 ^{bc}	0,58 ^e	0,58 ^d	0,58 ^g	0,58 ^e	0,58 ^e	0,58 ^d	0,58 ^d
	0,00±	13,67±	10,00±	9,00±	19,67±	9,00±	16,00±	11,33±	16,67±
Wco2	0,00 ^f	1,15 ^b	0,00 ^c	0,00 ^{cd}	0,58 ^c	0,00 ^{de}	2,00 ^{ab}	1,15 ^b	0,58 ^a
	6,33±	6,33±	6,33±	6,00±	13,00±	8,33±	14,67±	8,67±	8,67±
Lla1	0,58 ^e	0,58 ^e	0,58 ^f	1,00 ^d	1,00 ^f	0,58 ^e	0,58 ^{abcd}	0,58 ^{cd}	0,58 ^d
	0,00±	11,67±	9,00±	0,00±	19,00±	19,00±	0,00±	9,00±	14,67±
Lde1	0,00 ^f	1,15 ^{bc}	0,00 ^d	0,00 ^e	1,00 ^c	1,00 ^b	0,00 ^f	0,00 ^{cd}	2,31 ^{ab}
	16,33±	20,00±	17,67±	14,67±	24,33±	26,33±	16,67±	13,33±	16,67±
Ideótipo	0,58	2,00	0,58	0,58	0,58	0,58	1,53	1,53	0,58

Lpl = *Lactobacillus plantarum*, Lbr = *Lactobacillus brevis*, Wco = *Weissella confusa*, Lla = *Lactococcus lactis*, Lde = *Lactobacillus delbrueckii*.

Tabela 4: Avaliação *in vitro* da contagem final de bactérias (CFB), velocidade máxima de crescimento (VM), tempo de duplicação (TD), tolerância a 1,5% de NaCl (NaCl15), 3,0% de NaCl (NaCl30), pH6, pH8, pH9 e 5% de sais biliares (SB) das 10 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato digestório de *Litopenaeus vannamei*.

Cepas	CFB (UFC/mL x 10 ⁸)	VM (h ⁻¹)	TD (h)	NaCl15 (%)	NaCl30 (%)	pH6 (%)	pH8 (%)	pH9 (%)	SB (%)
Lpl1	21,67 ±	0,11±	6,35±	0,00±	33,97±	11,88±	0,00±	0,00±	68,28±
	10,41 ^b	0,02 ^b	1,23 ^{ab}	0,00 ^a	2,27 ^{ab}	6,77 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	12,12 ^{bcd}
Lpl2	49,67 ±	0,15±	4,56±	19,49±	43,02±	11,00±	3,00±	16,32±	30,33±
	33,20 ^a	0,01 ^a	0,38 ^a	9,07 ^{bc}	6,05 ^{ab}	1,00 ^a	1,00 ^a	4,61 ^{ab}	3,21 ^a
Lpl3	27,90 ±	0,13±	5,50±	8,57±	48,82±	11,29±	5,83±	17,63±	64,44±
	2,59 ^b	0,01 ^b	0,23 ^{ab}	8,73 ^{ab}	24,45 ^{ab}	3,52 ^a	0,06 ^a	3,18 ^{ab}	7,51 ^{bcd}
Lbr1	7,57 ±	0,12±	6,19±	35,49±	45,64±	5,75±	0,00±	16,62±	63,79±
	1,91 ^b	0,02 ^b	1,27 ^{ab}	9,90 ^c	5,32 ^{ab}	2,26 ^a	0,00 ^a	4,56 ^{ab}	14,69 ^{bcd}
Lbr2	4,87 ±	0,11±	6,03±	36,56±	64,16±	55,35±	48,30±	17,79±	73,20±
	1,60 ^b	0,00 ^b	0,02 ^{ab}	10,48 ^c	9,77 ^b	9,54 ^d	9,63 ^b	1,90 ^{ab}	0,99 ^{cd}
Lbr3	2,10 ±	0,10±	7,25±	34,29±	47,18±	36,37±	0,00±	34,59±	74,03±
	0,95 ^b	0,01 ^b	1,09 ^b	13,40 ^c	1,98 ^{ab}	4,44 ^c	0,00 ^a	6,07 ^{de}	3,87 ^{cd}
Wco1	5,33 ±	0,10±	6,68±	20,20±	26,73±	27,71±	24,21±	26,77±	71,36±
	1,90 ^b	0,00 ^b	0,10 ^b	0,89 ^{bc}	1,61 ^a	5,19 ^b	3,29 ^b	6,10 ^{cd}	5,25 ^{cd}
Wco2	6,93 ±	0,11±	6,54±	29,68±	32,57±	1,64±	0,00±	17,55±	60,24±
	1,90 ^b	0,01 ^b	0,76 ^b	4,79 ^c	3,70 ^{ab}	2,29 ^a	0,00 ^a	8,43 ^{ab}	3,10 ^{ab}
Lla1	3,06 ±	0,10±	6,71±	23,28±	42,91±	61,12±	20,81±	36,80±	49,02±
	2,25 ^b	0,00 ^b	0,15 ^b	5,38 ^{bc}	6,34 ^{ab}	0,60 ^d	3,05 ^b	2,17 ^e	15,92 ^b
Lde1	1,73 ±	0,13±	5,52±	77,19±	80,27±	89,72±	89,98±	74,33±	86,56±
	1,27 ^b	0,01 ^b	0,39 ^{ab}	4,45 ^d	2,56 ^c	0,47 ^e	0,72 ^d	3,48 ^f	2,15 ^e
Ideótipo	49,67 ±	0,15±	4,56±	0,00±	26,73±	1,64±	0,00±	0,00±	30,33±
	33,20	0,01	0,38	0,00	1,61	2,29	0,00	0,00	3,21

Lpl = *Lactobacillus plantarum*, Lbr = *Lactobacillus brevis*, Wco = *Weissella confusa*, Lla = *Lactococcus lactis*, Lde = *Lactobacillus delbrueckii*.

Considerando todos os caracteres avaliados *in vitro*, a cepa *L. plantarum* 1 obteve a menor distância de Mahalanobis (D^2) em relação ao ideótipo. Ela foi seguida pelas outras duas cepas de *L. plantarum*, as duas cepas de *W. confusa*, as três de *L. brevis* e a *L. lactis*. O *L. delbrueckii* foi a cepa que apresentou a maior distância do ideótipo (Tabela 5). Estes resultados evidenciam, que dentre as cepas bacterianas avaliadas, as cepas de *L. plantarum* apresentaram o melhor potencial para ser utilizadas como probióticos na carcinicultura marinha, por terem apresentados bons resultados para todos os caracteres avaliados, evidenciado pela menor distância ao ideótipo.

Tabela 5: Índice de seleção da distância ao ideótipo (IDI) das 10 cepas de bactérias ácido lácticas avaliadas.

Cepa bacteriana	IDI	Ranking
<i>L. plantarum</i> 1	304	1º
<i>L. plantarum</i> 3	1693	2º
<i>L. plantarum</i> 2	3163	3º
<i>W. confusa</i> 2	8304	4º
<i>W. confusa</i> 1	9635	5º
<i>L. brevis</i> 3	10975	6º
<i>L. brevis</i> 1	12493	7º
<i>L. brevis</i> 2	13922	8º
<i>L. lactis</i> 1	15110	9º
<i>L. delbrueckii</i> 1	21469	10º

14 CONCLUSÃO

Das cepas isoladas do trato digestório de *L. vannamei*, *Lactobacillus plantarum* apresentam o maior potencial para serem utilizados como probióticos para camarões marinhos, mais especificamente *L. plantarum* 1.

15 REFERENCIAS

Alavandi, S. V., Vijayan, K. K., Santiago, T. C., Poornima, M., Jithendran, K. P., Ali, S. A. & Rajan, J. J. S. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp PM

- 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17, 115-120.
- Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A. & Mohamed, M. F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 128-136.
- Araneda, M., Perez, E. P. & Gasca-Leyva, E. 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight. *Aquaculture*, 283, 13-18.
- Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Muzquiz, J. L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O. & Muzquiz, J. L. 2007. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, 122, 373-380.
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L. & Girones, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278, 188-191.
- Cai, Y. M., Suyanandana, P., Saman, P. & Benno, Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 177-184.
- Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M. & Cheng, W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 364-377.
- Cruz, C. D. 2001. *Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística*, Viçosa, UFMG.
- De Man, J. C., Rogosa, M. & Sharpe, M. E. 1960. A medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 5.
- El-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. E. & Shalaby, A. M. E. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27, 175-180.
- Erkkila, S. & Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at

- low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297-300.
- Far, H. Z., Saad, C. R. B., Daud, H. M., Harmin, S. A. & Shakibazadeh, S. 2009. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *African Journal of Biotechnology*, 8, 3369-3376.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gatesoupe, F. J. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 14, 107-14.
- Gillor, O., Etzion, A. & Riley, M. A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81, 591-606.
- Gullian, M., Thompson, F. & Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233, 1-14.
- Guo, J. J., Liu, K. F., Cheng, S. H., Chang, C. I., Lay, J. J., Hsu, Y. O., Yang, J. Y. & Chen, T. I. 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research*, 40, 609-618.
- Hernandez, D., Cardell, E. & Zarate, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 77-84.
- Jatoba, A., Vieira, F. D., Neto, C. B., Silva, B. C., Mourino, J. L. P., Jeronimo, G. T., Dotta, G. & Martins, M. L. 2008. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 43, 1201-1207.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*, New York, W. H. Freeman.
- Li, J. Q., Tan, B. P. & Mai, K. S. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291, 35-40.
- Lin, H. Z., Guo, Z. X., Yang, Y. Y., Zheng, W. H. & Li, Z. J. J. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 35, 1441-1447.

- Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L. & Wang, S. W. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1031-1041.
- Mcintosh, D., Samocha, T. M., Jones, E. R., Lawrence, A. L., Mckee, D. A., Horowitz, S. & Horowitz, A. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21, 215-227.
- Meunpol, O., Lopinyosiri, K. & Menasveta, P. 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 220, 437-448.
- Momoyama, K. 2004. Mortalities of farm-raised Kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by high pH ambient water due to blooms of a blue-green alga, *Chroococcus turgidus*. *Fish Pathology*, 39, 129-135.
- Ochoa-Solano, J. L. & Olmos-Soto, J. 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519-525.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867.
- 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.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. & Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191, 271-288.
- Ricciardi, A., Parente, E. & Zotta, T. 2009. Modelling the growth of *Weissella cibaria* as a function of fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1528-1535.
- Ringo, E. & Gatesoupe, F. J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160, 177-203.
- Roissart, H. & F.M., L. 1994. *Bactéries Lactiques: Aspects Fondamentaux et Technologiques*, Uriage, Lorica.
- Sansawat, A. & Thirabunyanon, M. 2009. Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 3, 77-87.

- Sugita, H., Ohta, K., Kuruma, A. & Sagesaka, T. 2007. An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. *Aquaculture Research*, 38, 1002-1004.
- Suma, K., Misra, M. C. & Varadaraj, M. C. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 17-25.
- Tseng, D. Y., Ho, P. L., Huang, S. Y., Cheng, S. C., Shiu, Y. L., Chiu, C. S. & Liu, C. H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 339-344.
- Van Hai, N., Fotedar, R. & Buller, N. 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture*, 272, 231-239.
- Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T. & Chikindas, M. L. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1131-1137.
- Vazquez, J. A., Gonzalez, M. P. & Murado, M. A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245, 149-161.
- Vinatea, L., Galvez, A. O., Browdy, C. L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B. L., Lawson, A., Shuler, A. & Leffler, J. W. 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, 42, 17-24.
- Vine, N. G., Leukes, W. D. & Kaiser, H. 2004. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *Fems Microbiology Letters*, 231, 145-152.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. & Hecht, T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27, 319-326.
- Wang, Y. B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269, 259-264.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*, Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall.
- Zhang, L., Mai, K. S., Tan, B. P., Ai, Q. H., Qi, C. Z., Xu, W., Zhang, W. B.,

- Liufu, Z. G., Wang, X. J. & Ma, H. M. 2009. Effects of Dietary Administration of Probiotic *Halomonas* sp B12 on the Intestinal Microflora, Immunological Parameters, and Midgut Histological Structure of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40, 58-66.
- Zhou, X. X., Wang, Y. B. & Li, W. F. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287, 349-353.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DO USO DE DIETA SUPLEMENTADA COM BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NA LARVICULTURA DE CAMARÕES MARINHOS

Felipe do Nascimento Vieira, Fabiola Santiago Pedrotti, Celso
Carlos Buglione Neto, José Luiz Pedreira Mouriño, Elpídio Beltrame,
Maurício Laterça Martins, Cristina Ramirez, Luis Vinatea

Artigo formatado segundo as normas da revista “Brazilian Journal of
Oceanography”

16 RESUMO

Este estudo avaliou o efeito da adição de duas cepas de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus parvulus*) na alimentação de larvas de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) do estágio de náuplio 5 até pós-larva 1. Foram realizadas análises microbiológicas, da sobrevivência final na larvicultura e a tolerância das larvas ao desafio com *Vibrio harveyi*. A sobrevivência das pós larvas 1 do controle ($21,25 \pm 11,35\%$) foi inferior ($p < 0,05$) a dos tratamentos alimentados com as cepas *L. plantarum* ($50,57 \pm 2,80\%$) e *P. parvulus* ($44,23 \pm 4,32\%$), que não diferiram entre si ($p \geq 0,05$). A sobrevivência das misis alimentadas com *L. plantarum* ($79,85 \pm 18,02\%$) foi superior ($p < 0,05$) às alimentadas com *P. parvulus* ($49,13 \pm 9,32\%$) e controle ($48,02 \pm 4,23\%$), 48h após o desafio com *V. harveyi*. A população de *Vibrio* spp. nas pós-larvas 1, do controle ($3,16 \pm 0,55 \times 10^5$ UFC/g) não diferiu das alimentadas com *P. parvulus* ($2,51 \pm 0,81 \times 10^5$ UFC/g) que foram superiores ($p < 0,05$) às larvas alimentadas com *L. plantarum* ($1,58 \pm 0,21 \times 10^1$ UFC/g). A população de bactérias ácido lácticas foi superior nas pós-larvas 1 alimentadas com *L. plantarum* ($5,01 \pm 0,8 \times 10^3$ UFC/mL) e *P. parvulus* ($4,98 \pm 0,55 \times 10^3$ UFC/mL) em relação ao controle (0). A suplementação na dieta com *L. plantarum* melhorou sobrevivência da larvicultura de *L. vannamei*, diminuindo a população de *Vibrio* spp. nas larvas e aumentando sua tolerância ao desafio com *V. harveyi*.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus*, infecção, *Vibrio harveyi*, sobrevivência.

17 ABSTRACT

This study evaluated the effect of the addition of two strains of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus parvalus*) on the feeding of marine shrimp larvae (*Litopenaeus vannamei*) at the stages nauplii 5 to post-larval 1. Microbiological analyzes, survival rate in the hatchery and larval tolerance against *Vibrio harveyi* challenge was performed. The survival in unsupplemented shrimp (21.25±11.35%) was lower than that observed on shrimp supplemented with *L. plantarum* (50.57±2.80%) and *P. parvalus* (44.23±4.32%). These last ones did not differ between them. Forty eight hours after challenge, the survival of mysis fed *L. plantarum* (79.85±18.02%) was higher ($p<0.05$) than those fed *P. parvalus* (49.13±9.32%) and unsupplemented (48.02±4.23%). The population of *Vibrio* spp. in unsupplemented post-larvae 1 ($3.16\pm0.55 \times 10^5$ CFU/g) did not differ from those fed *P. parvalus* ($2.51\pm0.81 \times 10^5$ CFU/g). On the other hand, the population of *Vibrio* spp. in larvae fed *P. parvalus* was increased when compared to those fed *L. plantarum* ($1.58\pm0.21 \times 10^1$ UFC/g). Contrarily to unsupplemented shrimp, an increase in the lactic-acid bacteria population was reported in post-larvae 1 fed *L. plantarum* ($5.01\pm0.8 \times 10^3$ CFU/mL) and *P. parvalus* ($4.98\pm0.55 \times 10^3$ CFU/mL). The supplementation with *L. plantarum* did improve the survival of shrimp in reducing the *Vibrio* spp. population and increasing the resistance of larvae to *V. harveyi*.

Key-words: *Litopenaeus vannamei*, probiotic, infection, *Vibrio harveyi*, survival.

18 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de doenças no cultivo de camarões não é resultado apenas da intensificação da densidade de produção, mas também de distúrbios ecológicos, alimentares e poluição (KAUTSKY et al., 2000). Bactérias patogênicas são comuns no ambiente aquático e tiram vantagens de mudanças ecológicas na água utilizada na aquicultura (SKJERMO; VADSTEIN, 1999). Dentre as bactérias patogênicas destacam-se as do gênero *Vibrio*, que tem causado mortalidades em larviculturas e engorda de camarões em diferentes países (ABRAHAM; PALANIAPPAN, 2004). Para o controle destas enfermidades, a utilização profilática de antibióticos é a estratégia mais utilizada na carcinicultura (SKJERMO; VADSTEIN, 1999). Porém, o uso massivo de antibióticos tende a selecionar cepas de bactérias resistentes (HOLMSTRÖM et al., 2003). Além disso, a presença de resíduo de antibióticos no tecido do camarão inviabiliza a comercialização para muitos países e prejudica a saúde do consumidor (SAPKOTA et al., 2008).

Um método alternativo para o controle de enfermidades bacterianas, que vem ganhando aceitação, é a utilização de bactérias probióticas (GOMEZ-GIL, et al., 2000). Gatesoupe (1999) definiu probiótico como: “micro-organismo vivo que ao ser ministrado ao cultivo coloniza o trato digestório dos animais com o objetivo de melhorar seu estado de saúde”.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a utilização de probióticos pode melhorar o crescimento, resposta imunológica e sobrevivência de camarões (RENGPIPAT et al., 1998, 2000; GULLIAN, et al., 2004; CHIU et al., 2007; TSENG et al., 2009; XIAOJIE; HONGMING, 2009). Porém, poucos trabalhos têm estudado o efeito benéfico da utilização de probióticos durante todos os estágios larvais do camarão *Litopenaeus vannamei*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de duas cepas de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus parvulus*) na alimentação da larvicultura de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) do estágio de náuplio 5 até pós-larva 1, quanto à microbiologia da água e larvas, qualidade larval, sobrevivência final da larvicultura e tolerância ao desafio por *Vibrio harveyi*.

19 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

19.1 Material biológico

Larvas de camarões no estágio de náuplio 5, provenientes do setor de maturação do LCM-UFSC foram utilizadas para a realização do experimento.

As cepas de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* CQPBA 007 07 DRM01 isoladas de *L. vannamei* do banco de reprodutores do LCM/UFSC e *Pediococcus parvulus* CQPBA 5889 DRM01 isoladas do trato digestório de *L. vannamei* do ambiente natural da Colômbia (RAMIREZ, 2005) foram utilizadas no experimento. Para o desafio experimental foi utilizado *Vibrio harveyi* ATCC 14126, patogênico para camarões marinhos.

19.2 Condições experimentais

O experimento foi dividido em três grupos experimentais com quatro réplicas em delineamento inteiramente casualizado. Cada unidade experimental foi composta de um tanque de 20L povoado com 1500 náuplios no estágio 5 de *L. vannamei*, divididos nos seguintes grupos:

- Tratamento *L. plantarum*: alimentação das larvas de camarão com dieta líquida (Oceandrops) suplementada com a *L. plantarum* na concentração de 10^8 UFC/mL.
- Tratamento *P. parvulus*: alimentação das larvas de camarão com dieta líquida (Oceandrops) suplementada com *P. parvulus* na concentração de 10^8 UFC/mL.
- Controle: alimentação das larvas de camarão somente com dieta líquida (Oceandrops).

Antes do início do experimento (48h), a água dos tanques foi tratada com 5 ppm de formaldeído 37%. No dia do povoamento, a água dos tanques foi inoculada com *Chaetoceros calcitrans* na concentração de 5×10^4 células/mL. Todos os dias durante a realização do experimento foi inoculado um volume desta microalga, previamente calculado, para manter esta concentração. A água dos tanques foi renovada (50%) apenas uma vez durante a realização do experimento quando as larvas atingiram o estágio de misis 1.

19.3 Avaliação da sobrevivência e qualidade larval

Diariamente uma amostra de 10 larvas de todos os tanques foi retirada para avaliação da qualidade larval com auxílio de microscópio óptico. Nestas avaliações observou-se a presença de necroses, cromatóforos expandidos, trato digestório cheio ou vazio, má formação, presença de parasitos como descrito por Mouriño et al., (2008) (Anexo II). A sobrevivência dos animais foi avaliada em dois momentos: durante a metamorfose para misis 1 e de misis 3 para pós-larva 1.

19.4 Avaliação microbiológica

Quando as larvas atingiram o estágio de misis 1 e pós-larva 1, foram retiradas amostras de água e de larvas para avaliação microbiológica. As amostras foram lavadas com álcool 70%, depois enxaguadas com água destiladas, retirado o excesso de água, pesadas e maceradas. Foram realizadas cinco diluições seriadas (1/10) com as amostras de larvas e de água, separadamente, sendo as diluições 10^{-1} até 10^{-5} semeadas em meio de cultura ágar Marine (contagem total de bactérias), ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, para *Vibrio* spp.) e ágar de Man Rogosa e Sharpe (MRS, para bactérias ácido lácticas) e incubadas a 30°C. As unidades formadoras de colônias foram quantificadas após 24h nos meios ágar Marine e ágar TCBS e após 48h no meio ágar MRS.

19.5 Desafio com *Vibrio harveyi*

No estágio de misis 2, quatro amostras de 100 larvas foram retiradas de cada tratamento alimentado com bactérias ácido lácticas e oito amostras de 100 larvas foram retiradas do controle e estocadas em frascos de 1L. As amostras dos tratamentos alimentados com bactérias ácido lácticas e quatro amostras do grupo controle foram inoculadas com 10^7 UFC/mL de *V. harveyi*. Para controle, quatro amostras de larvas do controle foram mantidas sem o desafio contra o *V. harveyi*. A sobrevivência foi avaliada 48h após o desafio.

19.6 Análise estatística

Primeiramente os dados foram submetidos ao teste de Bartlett, de homocedasticidade, e os dados das contagens de bactérias foram transformados em $\log(x+1)$. Utilizou-se análise de variância para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos ($\alpha < 0,05$), e

posteriormente o teste Student Newman Keuls (SNK) de separação de médias ao nível de significância de 0,05 (ZAR, 1984).

20 RESULTADOS

20.1 Taxa de sobrevivência e qualidade larval

Não foi observada diferença na sobrevivência ($p \geq 0,05$) e na qualidade das larvas após a metamorfose para misis 1 entre os tratamentos. Já na metamorfose para pós-larvas 1, a sobrevivência das pós-larvas alimentadas com *L. plantarum* e *P. parvulus* foram superiores ao controle ($p < 0,05$) (Tabela 6). As larvas alimentadas com *L. plantarum* apresentaram maior atividade natatória, menor presença de necroses e parasitos e intestino cheio em relação aos demais tratamentos. Não foi observada má formação nas larvas de nenhum dos tratamentos.

Tabela 6: Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus* e sem suplementação após a metamorfose de protozoa 3 para misis 1 e misis 3 para pós-larva 1.

Tratamento	Sobrevivência(%) após a metamorfose para misis 1	Sobrevivência após a metamorfose para pós-larva 1 (%)
<i>L. plantarum</i>	63,0 $\pm$ 5,1 a	50,2 $\pm$ 2,8 a
<i>P. parvulus</i>	68,2 $\pm$ 11,4 a	44,5 $\pm$ 4,3 a
Controle	61,3 $\pm$ 10,6 a	21,1 $\pm$ 11,3 b

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP), letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos na coluna pelo teste SNK ($p < 0,05$)

20.2 Análises microbiológicas

Observou-se a presença de bactérias ácido lácticas, somente nos tratamentos alimentados com probióticos, tanto na água quanto no macerado de larvas, indicando que as cepas utilizadas colonizaram as larvas. As contagens de bactérias totais não variaram significativamente nos dois estádios avaliados, tanto na água quanto nas larvas (Tabela 7). A contagem de *Vibrio* spp. no estágio de misis 1 não foi significativamente diferente ($p \geq 0,05$), entre os tratamentos tanto na água quanto nas larvas. No estágio de pós-larva 1, a contagem de *Vibrio* spp. na água e nas larvas alimentadas com *L. plantarum* foi inferior ($p < 0,05$) aos demais (Tabela 7).

Tabela 7: Contagens microbiológicas da água e das larvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus* e sem suplementação nos estágios de misis 1 (M1) e pós-larva 1 (PL1).

Tratamento	Contagens microbiológicas			
	Estágio	Água (UFC/mL)		
		Bactérias totais	<i>Vibrio</i> spp.	Bactérias ácido lácticas
<i>L. plantarum</i>	M1	$7,94 \pm 0,15 \times 10^2$ a	$1,02 \pm 0,01 \times 10^2$ a*	$3,16 \pm 0,12 \times 10^1$ a
<i>P. parvulus</i>	M1	$1,26 \pm 0,18 \times 10^3$ a	$2,51 \pm 0,17 \times 10^1$ a	$3,98 \pm 0,16 \times 10^1$ a
Controle	M1	$1,26 \pm 0,11 \times 10^3$ a	$3,16 \pm 0,13 \times 10^1$ a	0 ± 0 b
<i>L. plantarum</i>	PL1	$7,94 \pm 1,12 \times 10^5$ a	$1,26 \pm 0,20 \times 10^1$ a	$6,31 \pm 0,22 \times 10^1$ a
<i>P. parvulus</i>	PL1	$1,26 \pm 0,25 \times 10^6$ a	$2,51 \pm 0,31 \times 10^2$ b	$5,1 \pm 0,43 \times 10^1$ a
Controle	PL1	$2,02 \pm 0,82 \times 10^6$ a	$3,16 \pm 0,51 \times 10^3$ b	0 ± 0 b
Tratamento	Contagens microbiológicas			
	Estágio	Larva (UFC/g)		
		Bactérias totais	<i>Vibrio</i> spp.	Bactérias ácido lácticas
<i>L. plantarum</i>	M1	$1,26 \pm 0,12 \times 10^3$ a	$6,31 \pm 0,3 \times 10^1$ a	$2,32 \pm 0,31 \times 10^1$ a
<i>P. parvulus</i>	M1	$5,01 \pm 0,22 \times 10^2$ a	$5,01 \pm 0,16 \times 10^1$ a	$1,58 \pm 0,51 \times 10^1$ a
Controle	M1	$1,10 \pm 0,35 \times 10^3$ a	$3,98 \pm 0,11 \times 10^1$ a	$0,0 \pm 0$ b
<i>L. plantarum</i>	PL1	$6,31 \pm 0,34 \times 10^5$ a	$1,58 \pm 0,21 \times 10^1$ a	$5,01 \pm 0,8 \times 10^3$ a
<i>P. parvulus</i>	PL1	$1,26 \pm 0,25 \times 10^6$ a	$2,51 \pm 0,81 \times 10^5$ b	$4,98 \pm 0,55 \times 10^3$ a
Controle	PL1	$5,01 \pm 0,41 \times 10^5$ a	$3,16 \pm 0,55 \times 10^5$ b	0 ± 0 b

*Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos na coluna para o mesmo estágio de desenvolvimento larval pelo teste SNK ($p < 0,05$)

20.3 Desafio com *Vibrio harveyi*

A taxa de sobrevivência das larvas alimentadas com *L. plantarum* 48h após o desafio com *V. harveyi* foi semelhante ($p \geq 0,05$) a das larvas não desafiadas, as quais apresentaram sobrevivência superior ($p < 0,05$) às alimentadas com *P. parvulus* e controle após o desafio (Tabela 8).

Tabela 8: Sobrevivência de mysis 2 de *Litopenaeus vannamei* alimentada com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus* e sem suplementação 48h após o desafio experimental com *Vibrio harveyi*.

Tratamento	Sobrevivência (%)
<i>L. plantarum</i> desafiado com por <i>V. harveyi</i>	79,8 $\pm$ 18,0 a
Sem a inoculação de micro-organismos	73,3 $\pm$ 3,4 a
<i>P. parvulus</i> desafiado com <i>V. harveyi</i>	48,2 $\pm$ 9,3 b
Controle desafiado com <i>V. harveyi</i>	49,5 $\pm$ 4,1 b

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP), letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos pelo teste SNK ($p < 0,05$).

21 DISCUSSÃO

A colonização do trato digestório das larvas de camarões por bactérias benéficas pode ser um importante estratégia na prevenção de enfermidades (FARZANFAR, 2006). Quando as larvas de camarões marinhos estão no estágio de náuplio, sua nutrição é feita somente de vitelo, não havendo alimentação exógena. Neste estágio, existe apenas uma pequena colonização de bactérias pelo poro anal das larvas (GOMEZ-GIL et al., 2000). As larvas apresentam somente o trato digestório totalmente colonizado quando há a transformação para o estágio de protozoa, com o início da alimentação exógena. Sendo assim, o fornecimento de dieta suplementada com probiótico já neste estágio pode levar ao estabelecimento de uma microbiota bacteriana intestinal favorável desde um primeiro momento, ocupando o espaço que poderia ser ocupado por bactérias patogênicas (GOMEZ-GIL et al., 2000).

As duas cepas utilizadas colonizaram o trato digestório das larvas de *L. vannamei*, demonstrando que a via de alimentação utilizada no trabalho foi eficiente. As bactérias se mantiveram viáveis na dieta por tempo suficiente após o fornecimento da alimentação para colonizar as larvas. Contudo, no estágio de mysis 1, a população de bactérias ácido lácticas nas larvas alimentadas com dieta suplementada com *L. plantarum* e *P. parvulus* foi baixa, o que deve explicar a não alteração

na população de *Vibrio* spp. Este resultado pode ser associado ao hábito alimentar dos camarões. Até o estágio de misis 1, as microalgas representam uma grande parcela da alimentação das larvas (LE VAY et al., 2001) e o volume de ração consumido, veículo do probiótico, não é elevado.

No estágio de pós-larva 1, a população de bactérias ácido lácticas foi 100 vezes superior nas pós-larvas 1 alimentadas com *L. plantarum* e *P. parvulus* quando comparado ao estágio de misis 1. Isto pode estar relacionado com o hábito essencialmente carnívoro do camarão neste estágio de vida (LE VAY et al., 2001), e o elevado volume de ração consumido. Adicionalmente, as pós-larvas 1 têm o sistema digestório mais desenvolvido que as misis (ABRUNHOSA; MELO, 2008), o que pode ter favorecido a fixação das bactérias ácido lácticas. Contudo, somente o *L. plantarum* foi capaz de diminuir a população de *Vibrio* spp. no trato digestório das larvas e na água, sendo que a população de bactérias ácido lácticas foi superior a de *Vibrio* spp. Este resultado provavelmente está relacionado a maior capacidade desta cepa em produzir compostos antimicrobianos. Esta hipótese é sustentada por trabalhos anteriores que demonstraram que a capacidade de inibição *in vitro* por difusão em ágar contra *V. harveyi* e *V. alginolyticus* de *L. plantarum* (VIEIRA et al., 2009) foi em média 2,5 vezes maior do que de *P. parvulus* (RAMIREZ, 2005).

Bactérias do gênero *Vibrio* são patógenos conhecidos de larvas de camarões, sendo responsáveis por mortalidades expressivas em larviculturas comerciais. Entre os sintomas clínicos associados à presença de *Vibrio* spp. patogênicos, estão necroses nos órgãos internos e externos (hepatopâncreas, tubo intestinal, pereiópodos, pleópodos) e perda da atividade natatória das larvas (LIGHTNER, 1996). A menor população de *Vibrio* spp. deve estar relacionada à menor presença de necroses, maior atividade natatória e maior sobrevivência final nas larvas alimentadas com *L. plantarum*. Resultado semelhante na diminuição da população de *Vibrio* spp. no trato digestório das larvas foi relatada em *Fenneropenaeus indicus*, com o uso de probiótico comercial formulado com *Bacillus* sp. (ZIAEI-NEJAD, et al., 2006). O uso de *Bacillus* spp. como probiótico também tem apresentado efeito no aumento da sobrevivência durante a larvicultura de *L. vannamei* (DECAMP et al., 2008; GUO et al., 2009).

A suplementação com *L. plantarum* na dieta também promoveu maior resistência das misis 1 ao desafio com *V. harveyi*. Este resultado pode estar relacionado à colonização do trato digestório dos camarões

pelo *L. plantarum* que pode ter dificultado a fixação do *V. harveyi* (previamente discutido) e/ou a estas larvas estarem mais imunocompetentes. Em *L. vannamei* já foi demonstrado que a suplementação com *L. plantarum* provocou em animais adultos imunoestimulação e maior resistência ao desafio contra *V. harveyi* (Vieira et al., 2008) e *V. alginolyticus* (Chiu et al., 2007). Assim, o efeito imunoestimulante do *L. plantarum* pode ter sido responsável pelo aumento na resistência das larvas ao desafio observado neste estudo. Contudo, não foi encontrada na literatura relato semelhante de aumento de resistência de larvas de camarão ao desafio experimental com patógenos.

22 CONCLUSÃO

A suplementação da dieta com *L. plantarum* melhora a taxa de sobrevivência da larvicultura de *L. vannamei*, diminuiu a população de *Vibrio* spp. nas larvas e aumenta sua resistência quando desafiadas com *V. harveyi*.

23 REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, F.; MELO, M. Desenvolvimento e morfologia funcional dos estômagos de larvas e pós-larvas de três crustáceos decápodes. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.221-228, 2008
- ABRAHAM, T.J.; PALANIAPPANB, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture**, v.232, p.81-90, 2004.
- ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de Camarões Marinhos. in: Poli, C. R., Poli, A.T.B.; Andreatta, E.R.; Beltrame, E. (Ed.). **Aquicultura: Experiência brasileira**. Florianópolis: Multireta, 2004. p.199-220.
- CHIU, C.H., GUU, Y.K., LIU, C.H., PAN, T.M.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.23, p.364-377, 2007
- DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W.; LAVENS, P. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America, **Aquaculture Research**, v.39, p.334-338, 2008.
- FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture, **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.48, p.149-158, 2006.

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

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v.191, p.259-270, 2000.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, p.1-14, 2004.

GUO, J.J.; LIU, K.F.; CHENG, S.H.; CHANG, C.I.; LAY, J.J.; HSU, Y.O.; YANG, J.Y.; CHEN, T.I. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture, **Aquaculture Research**, v.40, p.609-618, 2009.

HOLMSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHSTRÖM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.255-266, 2003.

KAUTSKY, N.; RÖNNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v.191, p.145-161, 2000.

LE VAY, L.; JONES, D.A.; PUELLO-CRUZ, A.C.; SANGHA, R.S.; NGAMPHONGSAI, C. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128a, p.623–630, 2001.

LIGHTNER, D. V. **A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp**. World Aquaculture Society, L.A., Baton Rouge, 1996. 304p.

MOURIÑO, J.L.P.; BUGLIONE, C.C.; VIEIRA, F.N.; RAMIREZ, C.; PEDROTTI, F.S.; BELETTINI, F.; SEIFFERT, S.; BELTRAME, E. Avaliação bacteriológica aplicada à produção de pós-larvas de *Penaeus vannamei*, **Revista Atlântica**, v.30, p.9-16, 2008.

RAMIREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**, 2005, Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. 153p.

RAMÍREZ, C.; CIFONNI, E.M.G.; PANCHENIAK, E.F.R.; SOCCOL, C.R. Microrganismos lácticos con características probióticas para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. **La Alimentación Latinoamericana**, v.264, p.70-78, 2006.

- RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v.167, p.301-313, 1998.
- RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p. 271-288, 2000.
- SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A.R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v.34, p. 1215-1226, 2008.
- SKJERMO, J.; VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**, v.177, p.333-343, 1999.
- TSENG, D.Y., HO, P.L., HUANG, S.Y., CHENG, S.C., SHIU, Y.L., CHIU, C.S. & LIU, C.H. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish & Shellfish Immunology**, v.26, p.339-344, 2009.
- VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J. L.; JATOBÁ, A.; TORO, C. R.; MARTINS, M.L.; BARRACCO, M.; VINATEA, L. A. 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, 2008.
- VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J.L.; SILVA, B.C.; BUGLIONE-NETO, C.C.; SOARES, M.; SEIFFERT, W.; MARTINS, M.L.; VINATEA, L.A. Isolamento e seleção *in vitro* de bactérias probióticas com potencial para uso na carcinicultura marinha, **Aquaculture Research**, *in press*.
- XIAOJIE, W. & HONGMING, M. Effects of Dietary Administration of Probiotic *Halomonas* sp. B12 on the Intestinal Microflora, Immunological Parameters, and Midgut Histological Structure of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, p.58-66, 2009.
- ZAR, J. H. 1984. **Biostatistical analysis**. 2nd. ed. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. 718p.
- ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M.H.; TAKAMI, G.A.; LOVETT, D.L.; MIRVAGHEFI, A.; SHAKOURI, M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v.252, p.516-524, 2006.

CAPÍTULO 4:

EFEITO DO USO DE DIETA SUPLEMENTADA COM O PROBIÓTICO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE CAMARÕES MARINHOS APÓS O DESAFIO COM *Vibrio harveyi*

Felipe do Nascimento Vieira, Celso Carlos Buglione Neto, José Luiz Pedreira Mouriño, Adolfo Jatobá, Fabíola Santiago Pedrotti, Delano Dias Schleder, Edeimar Roberto Andreatta, Margherita Anna Barracco, Maurício Laterça Martins, Luis Vinatea

Artigo formatado segundo as normas da revista “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”

24 RESUMO

Neste estudo avaliou-se o efeito de dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* na engorda de *Litopenaeus vannamei* sobre os índices zootécnicos, microbiota bacteriana do trato digestório, sobrevivência e alguns parâmetros hemato-imunológicos após desafio com *Vibrio harveyi*. Não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) na sobrevivência ($80 \pm 6\%$) e no peso final dos camarões ($6,63 \pm 0,56\text{g}$) durante a engorda (60 dias). A população de bactérias totais viáveis e *Vibrio* spp. no intestino não diferiu ($p \geq 0,05$) até o 40° dia de cultivo, mas foi inferior ($p < 0,05$) nos camarões alimentados com dieta suplementada com probiótico no 60° dia de cultivo em relação aos alimentados sem suplementação. A população de bactérias ácido lácticas foi superior ($p < 0,05$) no intestino de camarões alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* após o 20° dia de cultivo. Dez horas após o desafio, a sobrevivência de camarões alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* ($65,7 \pm 2,9\%$) foi superior ($p < 0,05$) a dos alimentados com dieta sem suplementação ($39,9 \pm 4,4\%$). Camarões alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* e inoculados com *V. harveyi* apresentaram menor contagem de bactérias na hemolinfa e hepatopâncreas ($p < 0,05$). A contagem total de hemócitos e a atividade aglutinante da hemolinfa foram superiores nos camarões inoculados com *V. harveyi* alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* ($p < 0,05$). Este estudo demonstrou que a suplementação da dieta com *L. plantarum* modificou a microbiota bacteriana intestinal dos camarões aumentando sua resistência quando desafiado com *V. harveyi*, comprovando assim seu potencial uso como probiótico.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, *Lactobacillus plantarum*, microbiota intestinal.

25 ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of a *Lactobacillus plantarum*-supplemented diet on shrimp growth performance, bacterial microbiota of the digestive tract, survival, and hemato-immunological parameters after challenged with *Vibrio harveyi*. No significant difference ($p \geq 0.05$) was observed in shrimp survival ($80 \pm 6\%$) and final weight ($6.63 \pm 0.56\text{g}$) after 60 days feeding trial. Total bacteria count and *Vibrio* spp. count in the digestive tract were not different ($p \geq 0.05$) until day 40, but they were lower ($p < 0.05$) in the probiotic-supplemented group on day 60. Total lactic bacteria in the shrimp digestive tract was higher after day 20 in the probiotic-supplemented group. Ten hours after *V. harveyi* challenge, survival of the probiotic-supplemented group ($65.7 \pm 2.9\%$) was higher ($p < 0.05$) than the control group ($39.9 \pm 4.4\%$). *Vibrio* spp. in hemolymph and hepatopancreas was lower ($p < 0.05$) in the probiotic-supplemented group than in the control group after *V. harveyi* challenge. Total hemocyte count and serum agglutination activity were higher ($p < 0.05$) in the probiotic-supplemented group after challenged with *V. harveyi*. This assay comproved that probiotic-supplemented diet modified the bacterial microbiota of the shrimp digestive tract and increased its resistance to *V. harveyi* infection.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, probiotic, intestinal microbiota.

26 INTRODUÇÃO

A microbiota do ambiente aquático está normalmente em equilíbrio, sendo composta por bactérias benéficas e neutras para o animal cultivado, bem como bactérias patogênicas obrigatórias e oportunistas (Schulze et al., 2006). Este equilíbrio pode ser rompido por práticas inadequadas de manejo, que podem acarretar a proliferação de bactérias patogênicas (Karunasagar et al., 1994).

Na carcinicultura marinha, o controle de enfermidades de origem bacteriana é feito principalmente pelo uso de antibióticos (Karunasagar et al., 1994). Porém, o uso indiscriminado destes antibióticos tem levado ao surgimento de cepas de bactérias resistentes (Skjermo e Vadstein, 1999; Verschuere et al., 2000), além de deixar resíduos destas moléculas na carne do camarão, e causar contaminação ao ambiente (Holmström et al., 2003). Assim, diversos países baniram o uso de antibióticos na carcinicultura (FAO, 2002; Vine et al., 2006).

Como alternativa ao uso de antibióticos, vem ganhando espaço na indústria aquícola a utilização de cepas de bactérias “probióticas” para controle de bactérias patogênicas. Gatesoupe (1999) definiu probiótico como “micro-organismo vivo que ao ser ministrado aos cultivos coloniza o trato digestório dos animais com o objetivo de melhorar sua saúde”.

Entre as bactérias probióticas utilizadas na aquicultura, destacam-se as bactérias ácido lácticas, por serem de fácil multiplicação, produzirem compostos antimicrobianos (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e láctico) e estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (Gatesoupe, 2008). Estudos vêm demonstrando o efeito benéfico da inclusão destas bactérias no cultivo de diversas espécies aquáticas como *Scophthalmus maximus* (Gatesoupe, 1994), *Salmo salar* (Robertson et al., 2000), *Pollachius pollachius* (Gatesoupe, 2002), *Macrobrachium rosenbergii* (Venkat et al., 2004), *Oncorhynchus mykiss* (Panigrahi et al., 2005) e *Sparus aurata* L. (Salinas et al., 2006). Porém, poucos estudos foram conduzidos avaliando o uso de cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de camarões marinhos.

Parâmetros hemato-imunológicos, como hemogramas, atividade da enzima fenoloxidase (PO) e título aglutinante da hemolinfa têm sido empregados como indicadores do estado de saúde de camarões marinhos (Rengpipat et al., 2000; Perazzolo et al., 2002; Gullian et al., 2004; Maggioni et al., 2004).

A hipótese deste ensaio foi verificar se camarões alimentados com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* apresentam melhora nos índices zootécnicos e taxa de sobrevivência, bem como alterações na microbiota bacteriana intestinal e alguns parâmetros hemato-imunológicos após o desafio com *Vibrio harveyi*.

27 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM - Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC) em conjunto com o Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aquicultura (Departamento de Aquicultura - UFSC) e o Laboratório de Imunologia Aplicado à Aquicultura (Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - UFSC).

27.1 Material biológico

Foram utilizadas pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* em estágio 20 (PL 20) com peso médio de $0,08 \pm 0,01$ g, provenientes do LCM-UFSC. A cepa de bactéria ácido láctica, *Lactobacillus plantarum*, utilizada foi isolada de camarões do banco de reprodutores do LCM e mantida na coleção de micro-organismos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o número de acesso CPQBA 007-07 DRM01, sendo que para o desafio experimental utilizou-se *Vibrio harveyi* ATCC 14126.

27.2 Preparo do inóculo bacteriano

A bactéria *L. plantarum* foi cultivada em meio de cultura caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, 1960; Difco) em banho microprocessado sob agitação contínua (200 x g) a 35°C por 24h, até alcançar o número de 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL.

A bactéria marinha *V. harveyi* foi cultivada em meio de cultura líquido de infusão de coração e cérebro (BHI, Oxoid) sob agitação contínua (200 x g) a 30°C. Após 24h do crescimento da cultura, a suspensão bacteriana foi centrifugada (2000 x g), o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em solução salina estéril (SSE - 1,5% de NaCl), e a concentração ajustada para 10^7 UFC/mL.

27.3 Dieta experimental

A ração comercial marca Guabi[®] (35% de proteína) foi aspergida com 200 mL/kg de inóculo bacteriano, a 10^9 UFC/mL de *L. plantarum*/mL. Após a aspersão, a ração foi hermeticamente fechada e incubada em estufa a 35°C por 24h, transferida para uma segunda estufa com circulação de ar para secagem a 35°C por 24h até atingir a concentração final de $1,5 \pm 0,7 \times 10^8$ UFC/g de ração.

27.4 Protocolo experimental

Foram utilizados oito tanques circulares com capacidade para 1000L, povoados com 400 PL 20, sendo: quatro tanques alimentados com ração comercial suplementada com *L. plantarum* e quatro tanques alimentados com ração sem suplementação (dieta padrão). A água dos tanques foi diariamente renovada em 70% e os sedimentos do fundo retirados (8:00h). A ração foi fornecida quatro vezes ao dia (8:30, 12:00, 18:00, 22:00h) em bandejas *ad-libitum*.

O experimento foi conduzido por 60 dias, sendo realizadas biometrias quinzenais de 30 camarões por tanque, para determinar o ganho em peso dos camarões. A sobrevivência foi calculada no final dos 60 dias. Nos dias 0, 20, 40 e 60 foram retiradas amostras de tratos digestórios de cinco camarões por tanque (n=20 por tratamento) para a quantificação de bactérias viáveis totais, vibriónaceas e bactérias ácido lácticas. Para isto, os intestinos dos camarões foram extirpados, pesados em *pools* de cinco animais e macerados em SSE na proporção de 1:1 (p/v). Foram então realizadas cinco diluições seriadas (fator 10) em tubos contendo SSE e posteriormente semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Marine (Difco, para contagem total de bactérias), ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Difco, para contagem de *Vibrio* spp.) e ágar MRS (Difco, para contagem de bactérias ácido lácticas) para contagens totais de UFC após 24h de incubação nos meios de cultura ágar Marine e ágar TCBS e após 48h no meio ágar MRS. Das colônias crescidas em MRS, foi feita a coloração de Gram para verificação de similaridade da morfologia das bactérias com a utilizada como probiótica.

27.5 Infecção experimental

Passados 60 dias de alimentação, 35 camarões de cada tanque (n=140 por tratamento) foram transferidos para tanques de 100 L com a mesma água utilizada na engorda, e injetados com 25 µL de uma

suspensão de *V. harveyi* diluído em solução salina na concentração de 1×10^7 UFC/mL ou com 25 µL de SSE no caso dos controles. A sobrevivência dos camarões foi avaliada 10h após o desafio. Amostras de cinco camarões por tanque (quatro *pools* de cinco animais por tratamento) foram retiradas para coleta de hemolinfa e hepatopâncreas para avaliação de alguns parâmetros imunológicos e avaliações microbiológicas.

27.6 Coleta da hemolinfa e do hepatopâncreas

Um volume de 300 µL de hemolinfa foi obtido do sinus ventral de cada camarão com seringas estéreis de 1mL, acopladas a agulhas 21G e previamente resfriadas a 4°C, para evitar a coagulação. Uma amostra de 10 µL da hemolinfa coletada foi fixada em 4% de formaldeído em solução anticoagulante de MAS (27 mM citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7.0) para contagem total de hemócitos (THC). Outros 10 µL de hemolinfa foram utilizados para avaliação microbiológica e o restante foi deixado coagular a 4°C. O coágulo foi então congelado (-20°C) e descongelado para permitir a ruptura celular e a liberação do conteúdo dos grânulos e centrifugado repetidamente (2.000 x *g* por 10 min). O sobrenadante ou soro foi alíquotado e estocado a -20°C, para uso posterior.

Após a extração da hemolinfa, a carapaça do cefalotórax dos camarões foi aberta com o auxílio de tesoura. Com um bisturi foi feita a retirada de uma amostra do hepatopâncreas, tomando cuidado para não haver o rompimento do trato digestório, e consequente contaminação da amostra.

27.7 Análise microbiológica da hemolinfa e do hepatopâncreas

A hemolinfa coletada (10 µL) foi semeada em condições de esterilidade em placas de Petri contendo meio de cultura ágar TCBS. As amostras de hepatopâncreas foram maceradas em SSE e semeadas também em placas de Petri contendo meio de cultura ágar TCBS, em condições de esterilidade. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24h para detectar o crescimento de *Vibrio* spp.

27.8 Análises imunológicas

A contagem total de hemócitos (THC) foi estimada em câmara de Neubauer e a concentração de proteínas totais do soro estimada pelo

método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi determinada por colorimetria pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato enzimático L-diidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma). Amostras de 50 μ L de soro (quatro *pools* de cinco animais por tratamento) previamente diluído (10x) em TBS-1 (50 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , pH 7.4) foram incubadas com um volume igual de tripsina (Sigma, 1mg/mL), indutor enzimático em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 min a 25°C. Após incubação, foi adicionado um volume de 50 μ L de L-DOPA (3mg/mL) em cada poço. Nos controles, o soro ou a tripsina foram substituídos por TBS-1. A formação do DOPA-cromo foi monitorada em Leitora de Microplaca (490 nm) após 5, 10, 20 e 30 min. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligrama de proteína (Söderhäll e Häll, 1984). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade hemaglutinante do soro foi avaliada contra eritrócitos de rato. Para tal, amostras de 50 μ L de soro dos camarões (quatro *pools* de cinco animais por tratamento) foram diluídos serialmente (fator 2) em TBS-2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 7,4) em microplacas de 96 poços (fundo U) e incubados com um mesmo volume de uma suspensão de eritrócitos de rato a 2% em TBS-2, por 2 h em câmara úmida. Nos controles, o soro foi substituído por TBS-2. O título aglutinante foi estimado como sendo o recíproco da maior diluição ainda capaz de aglutinar os eritrócitos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

27.9 Análises estatísticas

Os valores das contagens microbianas e THC apresentaram heterogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, e foram transformados para $\log(x+1)$. O título aglutinante do soro foi transformado em $\log_2(x)$. Utilizou-se a análise de variância com parcelas subdivididas no tempo para o ganho de peso e a avaliação microbiológica do trato digestório dos camarões durante a engorda. Para os resultados obtidos na infecção experimental, foi utilizada uma análise fatorial 2x2, sendo o fator 1 a alimentação ou não com dieta suplementada com *L. plantarum* e o fator 2 a inoculação dos camarões com *V. harveyi* ou SSE. Quando observadas diferenças significativas

pela análise de variância, foi utilizado o teste Student Newman Keuls (SNK) de separação de médias (Zar, 1984).

28 RESULTADOS

28.1 Sobrevivência e crescimento dos camarões

Após 60 dias de experimento, os camarões alimentados com a ração suplementada com *L. plantarum* apresentaram $81\pm 5\%$ de sobrevivência e atingiram um peso médio final de $6,86\pm 0,25$ g. Estes resultados não se mostraram significativamente diferentes ($p\geq 0,05$) dos animais alimentados com a dieta padrão, sem suplementação com o probiótico, que apresentaram $79\pm 7\%$ de sobrevivência e $6,39\pm 0,86$ g de peso médio final.

28.2 Microbiota bacteriana do trato digestório

A contagem de bactérias totais no trato digestório dos camarões não diferiu significativamente ($p\geq 0,05$) entre os grupos de camarões nos diferentes dias de avaliação (0, 20 e 40 dias). Contudo, após 60 dias, os grupos alimentados com a dieta suplementada com *L. plantarum* apresentaram uma menor contagem de bactérias viáveis totais no trato digestório que os grupos da dieta padrão (Figura 4a).

A contagem de *Vibrio* spp. no intestino dos camarões seguiu a mesma tendência da contagem total de bactérias, sendo que os camarões alimentados com a dieta suplementada com a bactéria probiótica apresentaram uma contagem inferior de *Vibrio* spp. ($p<0,05$) no intestino somente após 60 dias do início do experimento (Figura 4b).

Os camarões alimentados com a dieta suplementada com o probiótico apresentaram uma contagem superior de bactérias ácido lácticas ($p<0,05$) após 20 dias do início do experimento, sendo que esta diferença se manteve até o final do experimento (Figura 4c).

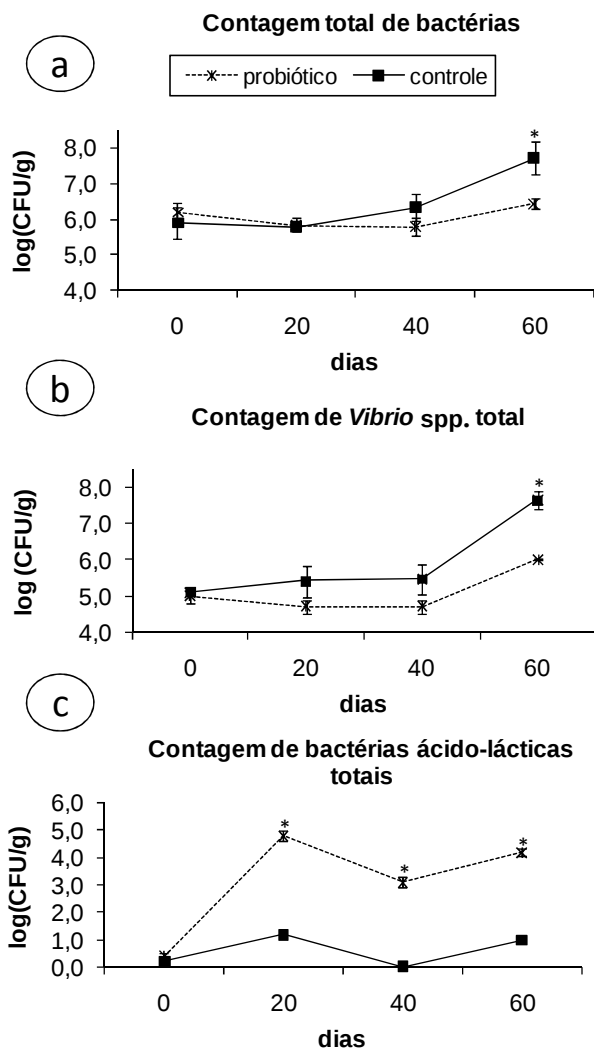


Figura 4: Microbiota bacteriana do trato digestório de camarões *Litopenaeus vannamei* durante 60 dias de alimentação com dieta suplementada ou não com *Lactobacillus plantarum*. A: contagem de bactérias viáveis totais; B: contagem de *Vibrio* spp.; C: contagem de bactéria ácido lácticas.

* diferença significativa pela teste SNK de separação de média ($p < 0,05$).

A análise microscópica das bactérias do trato digestório dos grupos de camarões alimentados com *L. plantarum*, após coloração de Gram, revelou a presença de bacilos Gram positivos agrupados de 2 em 2, morfologia semelhante à bactéria utilizada como probiótica. Já, o intestino dos grupos de camarão alimentados com a dieta padrão continha diferentes tipos de bactérias Gram positivas, sendo a maioria cocos.

28.3 Infecção experimental com *Vibrio harveyi*

Os camarões alimentados com a dieta suplementada com probiótico e desafiados com *V. harveyi* tiveram uma sobrevivência superior aos camarões alimentados com a dieta padrão ($p < 0,05$) após 10h de desafio (Tabela 9). Não foi observada mortalidade nos camarões inoculados com SSE.

A contagem de *Vibrio* spp. na hemolinfa e no hepatopâncreas dos camarões alimentados com a dieta suplementada com probiótico e inoculados com *V. harveyi* foi inferior a dos camarões alimentados com a dieta padrão ($p < 0,05$). Os animais inoculados com SSE não apresentaram *Vibrio* spp. na hemolinfa, e apenas uma pequena quantidade no hepatopâncreas (Tabela 9). A concentração de *Vibrio* spp. foi superior no hepatopâncreas em relação a hemolinfa em todos os animais avaliados.

Os camarões alimentados com a dieta suplementada com probiótico e inoculados com *V. harveyi* apresentaram THC significativamente maior (3x) do que os animais alimentados com a dieta padrão ($p < 0,05$) e injetados com a mesma bactéria. Por outro lado, a THC dos camarões injetados com SSE foi semelhante nos camarões tratados com ambas as dietas ($p \geq 0,05$), mas estatisticamente superior aos camarões injetados com *V. harveyi* (Tabela 9).

A atividade aglutinante do soro dos camarões injetados com *V. harveyi* e alimentados com dieta suplementada com probiótico foi superior ($p < 0,05$) a dos demais grupos (Tabela 9).

Quanto a atividade da PO houve variação de 22 a 57 U, mas não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de camarões ($p \geq 0,05$), devido provavelmente aos altos desvios da média de cada grupo. Contudo, nos animais desafiados com *V. harveyi* e tratados com a dieta suplementada com o probiótico, houve uma tendência de aumento (2x) nos valores da atividade da PO (Tabela 9).

Tabela 9: Porcentagem de sobrevivência, contagem de *Vibrio* spp. na hemolinfa e no hepatopâncreas, contagem total de hemócitos (THC), atividade da enzima fenoloxidase (PO) e título hemaglutinante do soro dos camarões alimentado com dieta suplementada ou não com *Lactobacillus plantarum* inoculados com solução salina (SSE- controles) ou *Vibrio harveyi*.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Vibrio spp. (log UFC/mL)		THC ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Atividade da PO (U/min/mg ⁻¹)	Título Hemoaglutinante
		Hemolinfa	Hepatopâncreas			
Dieta + <i>L. plantarum</i> e injeção de SSE	100 $\pm$ 0a	0a	0,28 $\pm$ 0,1a	24,6 $\pm$ 3,1a	22,1 $\pm$ 6,6a	24576,0 $\pm$ 8192a
Dieta padrão e injeção de SSE	100 $\pm$ 0a	0a	2,5 $\pm$ 0,1a	13,6 $\pm$ 4,2a	37,3 $\pm$ 10,2a	32768,0 $\pm$ 0a
Dieta + <i>L. plantarum</i> e injeção de <i>V. harveyi</i>	65,7 $\pm$ 2,9b	2,0 $\pm$ 1,0b	2,9 $\pm$ 0,2a	5,2 $\pm$ 5,1c	57,4 $\pm$ 14,5a	109226,7 $\pm$ 21845,3b
Dieta padrão e injeção de <i>V. harveyi</i>	39,9 $\pm$ 4,4c	3,5 $\pm$ 0,3c	3,90 $\pm$ 0,02b	1,7 $\pm$ 1,3b	29,7 $\pm$ 9,3a	43690,7 $\pm$ 10922,7a

*Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste SNK de comparação de médias ($p < 0,05$).

29 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a suplementação da dieta com a bactéria probiótica *L. plantarum* alterou significativamente a microbiota bacteriana intestinal dos camarões, aumentando aparentemente a resistência dos animais à infecção por *V. harveyi*.

Em organismos aquáticos, a microbiota bacteriana intestinal é composta principalmente por bactérias Gram negativas, sendo predominantes as dos gêneros *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Aeromonas* (Yasuda e Kitao, 1980; Leaño et al., 1998; Gomez-Gil et al., 2000; Vine et al., 2006). Contudo, diversos trabalhos têm demonstrado que esta microbiota bacteriana pode ser modificada pela administração de bactérias Gram positivas na dieta (Ziaei-Nejad et al., 2006; Vieira et al., 2007) ou na água de cultivo (Rengpipat et al. 1998, 2000). Em nosso estudo, animais alimentados com a dieta suplementada com *L. plantarum* apresentaram menor número de bactérias totais viáveis e *Vibrio* spp. e maior número de bactérias ácido lácticas corroborando os achados supracitados.

A modificação na microbiota intestinal constitui portanto, em importante ferramenta preventiva ao aparecimento de enfermidades, uma vez que, o nicho ecológico ocupado por bactérias benéficas, pode impedir a fixação de possíveis bactérias patogênicas (Gómez-Gil et al., 2000). Além disso, as bactérias ácido lácticas presentes no trato digestório podem produzir substâncias imunoestimulantes (Ringo e Gatesoupe, 1998).

No presente estudo, não houve melhora no ganho de peso dos camarões alimentados com a dieta suplementada com o probiótico, corroborando os achados de Rengpipat et al. (2000) ao adicionarem *Bacillus* S11 na água de cultivo de *Penaeus monodon*.

Neste estudo, os camarões alimentados com a dieta suplementada com o probiótico apresentaram maior resistência quando desafiados com *V. harveyi*. Também em *P. monodon* foi referido um efeito semelhante, de maior sobrevivência a infecção por *V. harveyi*, quando a cepa de *Bacillus* S11 foi adicionada na água de cultivo (Rengpipat et al., 1998). A sobrevivência superior dos camarões alimentados com a dieta suplementada com o probiótico poderia estar relacionada a um efeito de imunoestimulação dos probióticos no hospedeiro. As bactérias ácido lácticas são conhecidas por produzirem compostos extracelulares que

podem estimular a resposta imune não específica em vertebrados (Blum et al., 1999; Marteau et al., 2002; Gill, 2003).

O sistema imunológico dos crustáceos é formado por barreiras físicas potentes (como uma cutícula espessa) somadas a defesas celulares e humorais (Jiravanichpaisal et al., 2006). Quando uma bactéria consegue romper a barreira da cutícula, o sistema imune do animal age diminuindo rapidamente a concentração dos micro-organismos na circulação, que se fixam nos órgãos dos camarões (Van de Braak et al., 2002). O mesmo foi observado neste estudo, onde 10 h após a infecção foi observada uma concentração de bactérias no hepatopâncreas superior a da hemolinfa. As bactérias encontradas no hepatopâncreas dos camarões inoculados com solução salina podem estar relacionadas ao ferimento resultante da infecção, que podem ter permitido a infecção por micro-organismos presentes na água.

A queda no número de hemócitos circulantes observada neste estudo possivelmente está relacionada à migração destas células para o sítio lesado, conforme sugerido por Lorenzon et al. (2002). Adicionalmente, os hemócitos podem se agregar em nódulos hemocíticos, onde atuam moléculas de adesão celular como peroxinectina, que aprisionam micro-organismos em seu interior (Jiravanichpaisal et al., 2006) e que podem ser retirados de circulação pelas brânquias por processos mecânicos (Martin et al., 2000).

O fato dos camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos e inoculados com *V. harveyi* apresentarem maior número de hemócitos circulantes em relação aos camarões do controle injetados com a mesma bactéria pode estar relacionado à reposição mais rápida destas células pelo tecido hematopoiético, mostrando o estímulo na resposta imunológica.

Nos animais controle, houve tendência de aumento na atividade aglutinante do soro após a injeção com *V. harveyi*, porém não significativamente ($p \geq 0,05$) diferente dos camarões injetados com solução salina. Já nos camarões que foram alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* e inoculados com *V. harveyi*, a atividade aglutinante do soro foi significativamente ($p < 0,05$) superior a dos demais grupos. Esta resposta pode estar relacionada com uma maior produção de lectinas nos camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos, em resposta a infecção, indicando um possível efeito imunoestimulante do *L. plantarum*. Camarões da espécie *P. monodon* apresentaram um aumento do título aglutinante de sua hemolinfa quando infectados com *V. vulnificus* (Ratanapo e Chulavatnatol, 1992).

As lectinas funcionam como proteínas de reconhecimento de padrões moleculares específicos (PRP) ligando-se a carboidratos específicos presentes na superfície de patógenos, dando início às respostas imunes efectoras, como a aglutinação dos microrganismos invasores e/ou a fagocitose facilitada destes patógenos (Marques e Barracco, 2000). Lectinas isoladas de *L. vannamei* mostraram atividade aglutinante contra bactérias do gênero *Vibrio* (Sun et al., 2007). A eliminação mais eficiente das bactérias da hemolinfa e do hepatopâncreas pelos camarões alimentados com a dieta suplementada com probiótico poderia estar relacionada com a maior atividade aglutinante do soro observada nestes camarões.

Alguns trabalhos vêm relatando alterações na atividade da enzima PO de camarões tratados com probióticos, como em *L. vannamei* (Gullian et al., 2004) e *P. monodon* (Rengpipat et al., 2000). A enzima fenoloxidase catalisa a oxidação de compostos fenólicos, como tirosina e DOPA, que dão origem a uma complexa cascata molecular que culmina com a formação do pigmento escuro melanina (Sritunyalucksana e Söderhäll, 2000). Durante esta cascata, formam-se diversos compostos intermediários tóxicos, como as quinonas e espécies reativas de oxigênio que são altamente microbicidas (Nappi e Vass, 1993). No presente estudo, embora sem uma alteração significativa da atividade da PO em camarões tratados com o probiótico *L. plantarum* e desafiados com *V. harveyi*, houve uma tendência evidente de aumento da atividade da enzima (valor cerca 2x maior), em relação aos valores da PO em animais alimentados com a dieta padrão. Esta tendência de aumento pode ter contribuído para a eliminação mais eficiente das bactérias da hemolinfa nos animais alimentados com a dieta suplementada com o *L. plantarum* e injetados com *V. harveyi* em relação aos camarões do controle.

A confirmação do efeito imunoestimulante do probiótico utilizado neste estudo, permite recomendar a sua utilização em dietas comerciais, especialmente em áreas afetadas por enfermidades, para reforçar as condições de defesa dos camarões e minimizar os efeitos dos agentes com potencial de patogenicidade na carcinicultura.

30 CONCLUSÃO

A suplementação da dieta com *L. plantarum* modificou a microbiota bacteriana intestinal dos camarões e aumentou sua resistência ao desafio com *V. harveyi* caracterizada por um aumento na

contagem total de hemócitos e título aglutinante do soro dos camarões após o desafio.

31 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUM, S.; DELNESTE, Y.; ALVAREZ, S. et al. Interactions between commensal bacteria and mucosal immunocompetent cells, *Int. Dairy. J.*, v.9, p.63-68, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Rome: SOFIA, 2002, 150p.

GATESOUPÉ, F. J. Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v. 14, n.1, p.107-114, 2008.

GATESOUPÉ, F.J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic Liv Resour*, v.7, p.277-282, 1994.

GATESOUPÉ, F.J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, v.212, p.347-360, 2002.

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

GILL, H.S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroentero.*, v.17, p.755-73, 2003.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, v.191, p.259-270, 2000.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.233, p.1-14, 2004.

HOLMSTRÖM, K.; GRÄSLUND, S.; WAHSTRÖM, A. et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.38, p.255-266, 2003.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, v.211, p.213-236, 2006.

- KARUNASAGAR, I.; PAI, R.; MALATHI, G.R. et al. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, v.128, p.203-209, 1994.
- LEAÑO, E.M.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; PANER, M.G. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture*, v.164, p.367-374, 1998.
- LORENZON, S.; PASQUAL, P.; FERRERO, A. Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish Immunol.*, v.13, p.27-45, 2002.
- MAGGIONI, D.S.; ANDREATTA, E.R.; HERMES, E.M. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture*, v.241, p.501-515, 2004.
- MARQUES, M.R.F.; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, v.191, p.23-44, 2000.
- MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; JIAN, R. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective, *Br. J. Nutr.*, v.88, p.S51-S57, 2002.
- MARTIN, G.G.; QUINTERO, M.; QUIGLEY, M. et al. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. *J. Crustacean Biol.*, v.20, p.209-217, 2000.
- NAPPI, A.J.; Vass, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment. Cell. Res.*, v.6, p.117-126, 2003.
- PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, v.243, p.241-254, 2005.
- PERAZZOLO, L.M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, v.214, p.19-33, 2002.
- RATANAPO, S., CHULAVATNATOL, M. Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem Physiol.*, v.102B, p.855-859, 1992.
- RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, v.167, p.301-313, 1998.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11), *Aquaculture*, v.191, p.271-288, 2000.

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

ROBERTSON, P., O.; DOWD, C.; BURRELLS, C. et al. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Aquaculture*, v.185, p.235-243, 2000.

SALINAS, I; DIAZ-ROSALES, P.; CUESTA, A. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.), *Vet Immunol. Immuno.*, v.111, p.279-286, 2006.

SCHULZE, A.D.; ALABI, A.O.; TATTERSALL-SHELDRAK, A.R. et al. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains, *Aquaculture*, v.256, p.50-73, 2006.

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

SÖDERHÄLL, K.; HALL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *BBA-Bioenergetics*, v.797, p.99-104, 1984.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, v.191, p.53-69, 2000.

SUN, J.; WANG, L.; WANG, B. et al. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Fish Shellfish Immunol.*, v.23, n.2, 292-299, 2007.

VAN DE BRAAK, C.B.T.; BOTTERBLOM, M.H.A.; TAVERNE, N. et al. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish Shellfish Immunol.*, v.13, p.293-309, 2002.

VENKAT, H.K.; SAHU, N.P.; JAIN, K.K. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac. Res.*, v.35, p.501-507, 2004.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. et al. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, v.64, p.655-671, 2000.

VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE, C.C. et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz. J. Oceanogr.*, v.55, p.251-255, 2007.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.30, p.404–427, 2006.

YASUDA, K.; KITAO, T.. Bacterial flora in the digestive tract on prawns *Penaeus japonicus*. *Bate. Aquaculture*, v.19, p.229-234, 1980.

ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. 1984. 718p.

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

CAPÍTULO 5

USO DE DIETA SUPLEMENTADA COM *Lactobacillus plantarum* NA ENGORDA COMERCIAL DE CAMARÕES MARINHOS

Felipe do Nascimento Vieira, Adolfo Jatobá; José Luiz Mouriño;
Bruno Correa da Silva, Celso Carlos Buglione Neto; Jairo Silva, Walter
Quadros Seiffert, Maurício Laterça Martins, Luis Vinatea

Artigo formatado segundo as normas da revista “Aquaculture Research”

32 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* na engorda comercial de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) sobre parâmetros zootécnicos, imunológicos e da microbiota bacteriana do trato digestório. Foram utilizados seis tanques de terra escavados de 1,2 ha povoados com 14 camarões/m² com peso médio de 3 g, dos quais três foram alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* e três mantidos como controle. O experimento foi conduzido até os camarões apresentarem tamanho médio de cerca de 11g, sendo realizadas avaliações imunológicas e da microbiota bacteriana do trato digestório dos animais 30 e 60 dias após o povoamento. A sobrevivência e a eficiência alimentar dos camarões alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* foram superiores ($p < 0,05$) em relação ao controle, com valores respectivos de $83,02 \pm 6,12\%$ e $74,65 \pm 9,07\%$ para sobrevivência e $117,97 \pm 4,45$ e $104,46 \pm 7,30$ para eficiência alimentar. Contudo, não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) quanto ao ganho de peso e tempo de cultivo. Nas duas avaliações, foi observada contagem inferior ($p < 0,05$) de *Vibrio* spp. no trato digestório dos camarões alimentados com probióticos e maior contagem de bactérias ácido lácticas ($p < 0,05$) em relação aos camarões do controle. Não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) para contagem total de hemócitos, atividade da enzima fenoloxidase e atividade antimicrobiana da hemolinfa dos camarões. O uso de dieta suplementada com *L. plantarum* modificou a microbiota bacteriana intestinal dos camarões, diminuindo a população de *Vibrio* spp. e aumentando a de bactérias ácido lácticas, resultando em maior sobrevivência e eficiência alimentar dos camarões ao final do cultivo.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, probiótico, microbiota bacteriana.

33 ABSTRACT

The goal of this work was to evaluate the use of a diet supplemented with *Lactobacillus plantarum* in commercial culture of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the zootechnical and immunological parameters and the bacterial microbiota of the intestinal tract of marine shrimp. Six 6 excavated earthen ponds (1.2 ha) stocked with 14 shrimp/m² (3 g average weight) were used. Three ponds were fed a diet supplemented with *L. plantarum* and three were maintained as a control. The experiment was finished when the shrimp achieved an average weight of about 12 g. Immunological evaluations and of the bacterial microbiota of the shrimp digestive tract were performed after 30 and 60 days. The survival and feed efficiency of the shrimp fed supplemented diet were greater ($p < 0.05$) than that the shrimp fed unsupplemented diet, with survival values of $83.02 \pm 6.12\%$ and $74.65 \pm 9.07\%$ and feed efficiencies of 117.97 ± 4.45 and 104.46 ± 7.30 , respectively. However, it was not observed differences ($p \geq 0.05$) in weight gain or length during the whole period. Lower counts ($p < 0.05$) of *Vibrio* spp. and higher counts of lactic acid bacteria ($p < 0.05$) in the intestines of supplemented shrimp compared to unsupplemented ones were observed. There were no significant differences ($p \geq 0.05$) in the total haemocyte count, phenoloxidase enzymatic activity and antimicrobial activity of shrimp haemolymph between the supplemented and unsupplemented shrimp. *Lactobacillus plantarum* supplemented diet did alter the shrimp intestinal bacterial microbiota, resulting in increased survival and feed efficiency at the end of the culture period.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, probiotic, bacterial microbiota.

34 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem crescendo o interesse na utilização de probióticos na aquicultura como medida preventiva ao aparecimento de enfermidades (Kesarcodi-Watson et al., 2008). Gatesoupe (1999) definiu probiótico como: “micro-organismo vivo que ao ser ministrado ao cultivo coloniza o trato digestório dos animais com o objetivo de melhorar seu estado de saúde”. O uso de probióticos gera diversos benefícios para camarões marinhos por meio da melhora no balanço da microbiota intestinal (Vieira et al., 2008, Ling et al., 2009), sobrevivência (Vieira et al., 2007), resistência a infecção por patógenos (Rengpipat et al., 1998, 2000, Chiu et al., 2007, Vieira et al., 2007, 2008), imunoestimulação (Gullian et al., 2004, Chiu et al., 2007, Tseng et al., 2009) e digestibilidade da dieta (Lin et al., 2004, Buglione-Neto, 2009). Além de não deixar resíduo na carne do camarão, diferentemente dos antibióticos (Boyd & Massaut, 1999).

As bactérias ácido lácticas estão entre as mais utilizadas como probióticos na aquicultura (Gatesoupe, 2008), por serem de fácil multiplicação, produzirem compostos antimicrobianos (ácidos orgânicos, ácido láctico, bacteriocinas, e peróxido de hidrogênio) além de estimularem a resposta imune não específica nos hospedeiros (Ringo & Gatesoupe, 1998).

A maior parte dos estudos realizados com probióticos na carcinicultura marinha são efetuados em pequena escala em condições controladas de laboratório (Rengpipat et al., 1998, 2000, Venkat et al., 2004, Gullian et al., 2004, Wang, 2007, Vieira et al., 2007, 2008, Chiu et al., 2007, Tseng et al., 2009), que nem sempre condizem com as condições das fazendas de engorda a campo. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos do uso de probióticos em fazendas comerciais de engorda.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* na engorda comercial de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) sobre os parâmetros zootécnicos, imunológicos e da microbiota bacteriana do trato digestório de camarões cultivados em fazenda comercial no Estado de Santa Catarina, Brasil.

35 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Fazenda experimental Yakult da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizada no

município de Barra do Sul, Estado de Santa Catarina, Brasil (Latitude 26°32'S e longitude 48°39'O) entre os meses de fevereiro e abril de 2008 (Anexo III).

35.1 Material Biológico

A cepa de probiótico utilizada foi *Lactobacillus plantarum*, isolada de camarões adultos de *L. vannamei* (Vieira et al., 2007) e mantida na coleção de micro-organismos da Universidade Estadual de Campinas sob o número de acesso CPQBA 007 07 DRM01. As pós-larvas de 20 dias (PL20) foram provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC.

35.2 Suplementação na dieta

L. plantarum foi multiplicado em meio de cultura MRS líquido (de Man, Rogosa e Sharpe, 1960, Difco®) sob agitação contínua por 24h, atingindo a concentração de 10^9 UFC/mL. A inoculação do probiótico na ração comercial (Tabela 10) era realizado 30 minutos antes do fornecimento do alimento aos camarões na proporção de 100mL/kg de ração.

Tabela 10: Composição da ração utilizada.

Ingredientes	Porcentagem de inclusão (%)
Farelo de soja	19,40
Farinha de peixe	21,00
Carne 43%	8,80
Trigo farelo	10,00
Levedura 33 cana seca	10,00
Arroz solvente	5,00
Melaço líquido	4,00
Quirera arroz	8,30
Farinha de vísceras	0,00
Lecitina gordura	0,00
Farinha de penas hidrolisada	4,00
Gordura peixe	1,50
Saborizante de atum	4,00
Fosfato monobicálcico	1,35
Sal refinado	0,50
Premix mineral e vitamínico	2,15
Total	100,00

35.3 Condições experimentais

As PL20 foram cultivadas em berçário intensivo (100 camarões/m²) até atingirem o peso médio de 3g e transferidos para seis viveiros de engorda de 1,20 ha e densidade de 14 camarões/m². Foi utilizado o delineamento em blocos completos casualizados, com três blocos compostos por dois viveiros povoados com camarões do início, meio e fim da despesca do tanque berçário. Um viveiro de cada bloco foi alimentado com dieta suplementada com *L. plantarum* e o outro com ração controle. A ração (32% de proteína) foi fornecida duas vezes ao dia em bandejas (9:00h e 16:00h) na proporção aproximada de 3% da biomassa.

Os parâmetros de qualidade de água, temperatura e oxigênio dissolvido de superfície e fundo foram mensurados diariamente em três períodos (0:00, 5:00 e 17:00) com oxímetro (Alfakit® AT-150). Já as concentrações de amônia, nitrato, nitrito, ortofosfato (segundo Grasshoff et al., 1983) e pH (Alfakit® AT-300).

As biometrias dos camarões (30 camarões de três pontos do viveiro) foram realizadas a cada 15 dias. No final do cultivo também a

sobrevivência e a eficiência alimentar foram avaliadas. Passados 30 e 60 dias do povoamento, foram coletados 20 camarões (2 *pools* de 10 animais) por tanque para avaliação dos parâmetros imunológicos (contagem total de hemócitos, atividade da enzima fenoloxidase e atividade antimicrobiana do soro), presença de bactérias na hemolinfa e hepatopâncreas e a microbiota bacteriana do trato digestório. Foram coletados pleópodos de 150 camarões por viveiro para verificar a presença do vírus da mancha branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*). Nestes dias também foi coletada água dos viveiros para avaliação da microbiota bacteriana.

35.4 Avaliação da microbiota bacteriana na água

As amostras de água foram diluídas serialmente cinco vezes (fator 10) e as diluições semeadas em meio de cultura ágar Marine (Difco[®]), ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose ágar (TCBS, Difco[®]) e ágar MRS para quantificação de bactérias totais, vibriónaceas e bactérias ácido lácticas, respectivamente. As leituras das unidades formadoras de colônias foram realizadas 24h após incubação das placas nos meios de cultura ágar Marine e ágar TCBS e 48h em ágar MRS.

35.5 Coleta da hemolinfa, hepatopâncreas e trato digestório

Dos camarões coletados, um volume de 300 µL de hemolinfa foi obtido do sinus ventral com seringas estéreis de 1mL, acopladas a agulhas 21G e previamente resfriadas a 4°C, para evitar a coagulação. Uma amostra de 10µL da hemolinfa coletada foi fixada solução anticoagulante MAS com 4% de formol (27 mM citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7.0) para contagem total de hemócitos (THC). Outros 10µL de hemolinfa foram utilizados para avaliação microbiológica e o restante deixado coagular a 4°C. O coágulo foi então congelado (-20°C) e descongelado, para permitir a ruptura celular e a liberação do conteúdo dos grânulos, centrifugado sob refrigeração de 4°C repetidamente (2.000 x *g* por 10 min) e o sobrenadante ou soro alíquotado e estocado a -20°C para análises posteriores.

Após a extração da hemolinfa, a carapaça do cefalotórax dos camarões foi aberta com o auxílio de tesoura e bisturi para retirada de uma amostra do hepatopâncreas, cuidadosamente para não haver o rompimento do trato digestório, e consequente contaminação da

amostra. Finalmente, os intestinos dos camarões foram extirpados e pesados em *pools* de cinco animais.

35.6 Análises microbiológicas da hemolinfa, hepatopâncreas e trato digestório

A hemolinfa coletada (10 µL) foi semeada em condições de esterilidade em placas de Petri contendo meio de cultura ágar TCBS. As amostras de hepatopâncreas foram maceradas em SSE e semeadas também em placas de Petri contendo meio de cultura ágar TCBS, em condições de esterilidade. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24h para detectar a presença de *Vibrio* spp.

Os intestinos foram macerados em solução salina estéril na proporção de 1:1 (p/v) e realizadas cinco diluições seriadas (fator 10) em tubos contendo salina para posterior semeadura em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Marine, ágar TCBS e ágar MRS. As leituras de UFC das placas foram realizadas após 24h de incubação nos meios de cultura ágar Marine e ágar TCBS e após 48h no meio ágar MRS. Das colônias crescidas em MRS, foi feita a coloração de Gram para verificação de similaridade da morfologia das bactérias com a utilizada como probiótica.

35.7 Análises imunológicas

A contagem total de hemócitos (THC) foi estimada em câmara de Neubauer e a concentração de proteínas totais do soro estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão.

A atividade da PO foi determinada por colorimetria pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato enzimático L-diidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma). Amostras de 50 µL de soro (quatro *pools* de cinco animais por tratamento) previamente diluído (10x) em TBS-1 (50 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7.4) foram incubadas com um volume igual de tripsina (Sigma, 1mg/mL), indutor enzimático, em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 min a 25°C. Após a incubação, foi adicionado um volume de 50 µL de L-DOPA (3mg/mL) em cada poço. Nos controles, o soro ou a tripsina foram substituídos por TBS-1. A formação do DOPA-cromo foi monitorada em Leitora de Microplaca (490 nm) após 5, 10, 20 e 30 min.. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na

absorbância/minuto/miligrama de proteína (Söderhäll & Häll, 1984). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Para análise de concentração mínima inibitória do soro, foram utilizadas as cepas bacterianas *Vibrio alginolyticus* ATCC 14126 (patogênica para camarões marinhos), *Escherichia coli* D363 (padrão Gram negativo) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (padrão Gram positivo). O *V. harveyi* foi cultivado em meio de cultura PWS (do inglês *peptone water saline*, 1,5% de peptona, 1,5% de NaCl, pH 7,2) e as demais em meio de cultura Lúria Bertani (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,2) por 24h a 30°C. Os ensaios foram realizados diluindo serialmente 50µL de soro em PWS no caso do *V. harveyi* ou PB (do inglês *poor broth*, 1% de peptona, 0,5% de NaCl, pH 7,4) para as demais bactérias, em microplacas de 96 poços de fundo chato. Cada poço recebeu 10µL de uma suspensão bacteriana em crescimento logaritmo de 10^3 UFC/mL. Nos controles o soro foi substituído por salina. O crescimento bacteriano foi determinado em leitora de microplacas (DO_{630nm}). A atividade antimicrobiana foi estimada como recíproco do último poço capaz de inibir o crescimento bacteriano e padronizada para a concentração de proteína da amostra.

35.8 Análise da presença do vírus da mancha branca

A presença do WSSV foi investigada por meio de *Nested* PCR, utilizando-se os iniciadores e as condições descritas por Lo et al.(1996), no laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática-UFSC.

35.9 Análises estatísticas

Os valores das contagens totais de hemócitos e contagens bacterianas foram transformados para $\log(x+1)$ para normalização e homogeneização das variâncias. Os valores da atividade antimicrobiana foram transformados para $\log_2(x)$. Foi utilizada análise de variância em blocos completos casualizados ($\alpha < 0,05$) para os índices zootécnicos e análise de variância em blocos completos casualizados com parcelas subdivididas no tempo ($\alpha < 0,05$) para as demais análises (Zar, 1984).

36 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura de fundo (23,2–30,2°C), temperatura de superfície (24,5–31,3°C), oxigênio dissolvido de fundo (2,5–6,7 mg/L), oxigênio de superfície (3,1–8,9 mg/L), pH (7,8–8,6), amônia (0,018–0,023 mg/L),

nitrito (0-0,01 mg/L), nitrato (0,66-0,89 mg/L), ortofosfato (0,007-0,019 mg/L) permaneceram dentro dos limites recomendados para o cultivo de *L. vannamei* (Boyd, 1989).

A contagem de bactérias totais ($1,51 \pm 0,74 \times 10^4$ UFC/mL) e de *Vibrio* spp. ($1,22 \pm 0,52 \times 10^2$ UFC/mL) na água de cultivo não variaram entre os tratamentos ou entre as coletas ($p \geq 0,05$), valores semelhantes aos observados por Sung et al. (1999, 2001). Não foi observada a presença de bactérias ácido lácticas na água de cultivo. As bactérias ácido lácticas estão normalmente associadas à microbiota do trato digestório dos animais (Hagi et al., 2004), sendo esperado que elas não fossem encontradas nem que interferissem na população de bactérias na coluna de água.

A contagem de bactérias ácido lácticas no trato digestório dos camarões alimentados com ração suplementada com *L. plantarum* foi superior ($p < 0,05$) a dos camarões não suplementados nas duas coletas. Assim como inferior ($p < 0,05$) para *Vibrio* spp. no trato digestório dos camarões alimentados com ração suplementada com *L. plantarum* em relação ao controle. Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) na contagem total de bactérias no trato digestório dos camarões entre os tratamentos nas duas coletas (Tabela 11).

Os resultados obtidos neste estudo de campo demonstraram que dietas suplementadas com *L. plantarum* alteraram a microbiota nos animais em viveiros comerciais. Esta mudança na microbiota bacteriana no trato digestório foi semelhante à observada por Vieira et al., (2010) em camarões alimentados com ração suplementada com *L. plantarum*, em condições controladas de laboratório. Neste estudo, foi demonstrado que os animais alimentados com dieta suplementada com probióticos apresentaram maior resistência ao desafio com *V. harveyi*. Portanto, a presença das bactérias ácido lácticas no trato digestório pode sugerir que os animais tratados com *L. plantarum* estariam com sistema imune mais resistentes contra o surgimento de uma enfermidade no ambiente de cultivo.

Tabela 11: Microbiota bacteriana do trato digestório de camarões cultivados na fazenda experimental Yakult-UFSC provenientes de viveiros alimentados com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* e controle após 30 e 60 dias de cultivo.

Coleta	Tratamento	Avaliação microbiológica do trato digestório (UFC/g)		
		Total de bactérias	Vibrio spp. total	Ácido lácticos totais
30 dias	Probiótico	$1,56 \pm 0,21 \times 10^7$	$4,98 \pm 0,08 \times 10^4^*$	$5,64 \pm 1,50 \times 10^4^*$
	Controle	$2,36 \pm 0,28 \times 10^7$	$11,02 \pm 4,81 \times 10^4$	$1,67 \pm 0,24 \times 10^1$
60 dias	Probiótico	$2,75 \pm 1,51 \times 10^5$	$1,33 \pm 0,81 \times 10^3^*$	$2,15 \pm 1,02 \times 10^4^*$
	Controle	$8,83 \pm 1,21 \times 10^5$	$11,73 \pm 0,33 \times 10^3$	0

* Diferença significativa pela análise de variância ($p < 0,05$).

A sobrevivência dos camarões foi superior ($p \geq 0,05$) nos viveiros alimentados com ração suplementada com *L. plantarum* (Tabela 12). Bactérias do gênero *Vibrio*, são patógenos conhecidos de camarões marinhos (Karunasagar et al., 1994; Abrahama e Palaniappan, 2004; Goarant et al., 2006; Austin e Zhang, 2006; Buglione-Neto et al., 2009). Assim, a maior sobrevivência dos camarões dos viveiros alimentados com ração suplementada com *L. plantarum* pode estar relacionada com a menor população de *Vibrio* spp. no trato digestório destes camarões. Em *Litopenaeus stylirostris*, a suplementação da ração com *Pediococcus acidilactici* também resultou em aumento da sobrevivência e diminuição na população de *Vibrio* spp. no trato digestório dos camarões em condições de campo (Castex et al., 2008). Wang et al., (2005) também relataram aumento na sobrevivência de *L. vannamei* alimentado com probiótico comercial *Bacillus* sp em tanques de cultivo comerciais.

Tabela 12: Sobrevivência, eficiência alimentar, peso final e dias de cultivo de viveiros de camarões alimentados com ração suplementada ou não com *Lactobacillus plantarum*.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Eficiência alimentar (%)	Peso final (g)	Dias de cultivo
Probiótico	83,02±6,12*	117,97±4,45*	11,2±0,62	77,00±6,42
Controle	74,65±9,07	104,46±7,30	11,96±0,35	72,33±9,7

* Diferença significativa pela análise de variância ($p < 0,05$).

A eficiência alimentar foi superior ($p < 0,05$) nos animais alimentados com ração suplementada com *L. plantarum* (Tabela 12). Neste sentido, bactérias probióticas podem produzir e/ou estimular a produção de enzimas digestivas pelo hospedeiro (Lin et al., 2004). Buglione-Neto (2009) demonstrou que a suplementação de dieta comercial com *L. plantarum* para *L. vannamei* aumentou a digestibilidade aparente da proteína bruta, o que explica a melhor eficiência alimentar observada neste estudo. Resultado semelhante de melhoria na eficiência alimentar também já foi relatado por Wang et al., (2005) no cultivo comercial de *L. vannamei* na China com o uso de probióticos comerciais.

Por outro lado, não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) no peso final dos camarões e dias de cultivo entre os tratamentos (Tabela 12).

As bactérias ácido lácticas presentes no trato digestório do hospedeiro podem ainda produzir substâncias imunoestimulantes (Marteau et al., 2002; Gill, 2003). Em *L. vannamei*, a estimulação da resposta imunológica pelo uso de *L. plantarum* suplementado na ração

já foi relatado por Chiu et al., (2007) e Vieira et al., (2008). Contudo, não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) nos parâmetros imunológicos analisados nos camarões de ambos os tratamentos neste estudo (Tabela 13).

Nos estudos de Vieira et al., (2008), os parâmetros imunológicos dos camarões alimentados com ração suplementada com *L. plantarum* somente sofreram alteração em relação ao controle após a infecção experimental com *V. harveyi*. Não foi observada a presença de *Vibrio* spp. na hemolinfa e no hepatopâncreas nos camarões nem a presença de WSSV em nenhuma das avaliações nos dois tratamentos, demonstrando que os camarões amostrados estavam sadios, explicando a não alteração dos parâmetros imunológicos avaliados por outro patógeno.

37 CONCLUSÃO

O uso de dieta suplementada com *L. plantarum* modificou a microbiota bacteriana intestinal dos camarões em condições de fazenda comercial, diminuindo a população de *Vibrio* spp. e aumentando a de bactérias ácido lácticas, resultando em maior sobrevivência e eficiência alimentar dos camarões ao final do cultivo.

Tabela 13: Atividade da enzima fenoloxidase (PO), contagem total de hemócitos (THC) e concentração mínima inibitória (CMI) contra *Vibrio alginolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* da hemolinfa de camarões cultivados na fazenda experimental Yakult-UFSC provenientes de viveiros alimentados com dieta suplementada com *L Lactobacillus plantarum* e controle após 30 e 60 dias de cultivo.

Coleta	Tratamento	Parâmetros imunológicos		Concentração mínima inibitória (mg de proteína/mL)		
		PO (U/min/mg)	THC ($\times 10^6$ /mL)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
30 dias	Probiótico	71,37 $\pm$ 9,93	36,26 $\pm$ 8,58	8,44 $\pm$ 1,81	9,05 $\pm$ 0,18	10,84 $\pm$ 1,22
	Controle	80,95 $\pm$ 3,92	35,60 $\pm$ 11,77	15,38 $\pm$ 7,55	8,02 $\pm$ 1,69	13,31 $\pm$ 0,98
Coleta	Tratamento	Parâmetros imunológicos		Concentração mínima inibitória (mg de proteína/mL)		
		PO (U/min/mg)	THC ($\times 10^6$ /mL)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
60 dias	Probiótico	82,46 $\pm$ 4,67	41,67 $\pm$ 28,66	8,71 $\pm$ 1,30	13,89 $\pm$ 5,66	13,43 $\pm$ 3,20
	Controle	78,16 $\pm$ 13,30	40,93 $\pm$ 13,53	11,02 $\pm$ 3,94	10,66 $\pm$ 2,59	10,63 $\pm$ 1,50

38 REFERENCIAS

- Abrahama, T.J. & Palaniappan, R. (2004) Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture* 232, 81–90.
- Austin, B. & Zhang, X.H. (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43, 119–124.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. & Girones, O. (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278, 188–191.
- Boyd, C.E. & Massaut, L. (1999) Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture* 20, 13–132.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248–254.
- Buglione Neto, C.C. Avaliação do coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca em ração comercial suplementada com probiótico para *Litopenaeus vannamei*, 2009. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.N., Schmidely, P. & Mariojouis, C. (2008) Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia, *Aquaculture* 275, 182–193.
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M. & Cheng, W. (2007) Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 364–377.
- Gatesoupe, F. J. (2008) Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14, 107–114.
- Gatesoupe, F.J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- Gill, H.S. (2003) Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research: Clinical gastroenterology* 17, p.70–73.

- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F. & Decker, S. (2006) Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105-113.
- Grasshoff, K.M., Ehrhardt, K. & Kremling, K. (1983) *Methods of seawater analysis*. 2. Ed. Basel: Verlag Chemie, 419pp.
- Gullian, M., Thompson, F. & Rodriguez, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1-14.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. & Hoshino, T. (2004) Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234, 335-346.
- Hernández, D., Cardell, E. & Zárate, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711, *Journal of Applied Microbiology* 99, 77-84.
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R. & Karunasagar, I. (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128, 203-209.
- Kesarcodi-Watson, K., Kaspar, H., Lategan, M.J. & Gibson, L. (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.
- Lin, H.Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W. & Li, Z.J. (2004) Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture Research* 35, 1441-1447.
- Ling, Z., Kangsen, M., Beiping, T., Qinghui, A., Chengzhen, Q., Wei, X., Wenbing, Z., Zhiguo, L., Xiaojie, W. & Hongming, M. (2009) Effects of Dietary Administration of Probiotic *Halomonas* sp. B12 on the Intestinal Microflora, Immunological Parameters, and Midgut Histological Structure of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 40, 58-66.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H. & Kou, G.H. (1996) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 133-141

- Marteau, P., Seksik, P. & Jian, R. (2002) Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition* 88, S51–S57.
- 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.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. & Menasaveta, P. (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271–288.
- Ringo, E. & Gatesoupe, F.O.J. (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177–203.
- Söderhäll, K. & HALL, L. (1984) Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 797, 99–104.
- Sugita, H., Ohta, K., Kuruma, A. & Sagesaka, T. (2007) Antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus*, Linnaeus. *Aquaculture Research* 38, 1002–1004.
- Suma, K., Misra, M.C. & Varadaraj, M.C. (1998) Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology* 40, 17–25.
- Sung, H.H., Hsu, S.F., Chen, C.K., Ting, Y.Y. & Chao, W.L. (2001) Relationship between disease outbreaks in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture* 192, 101–110.
- Sung, H.H., Li, H.C., Tsai, F.M., Ting, Y.Y. & Chão, W.L. (1999) Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 236, 261–271.
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S. & Liu, C.H. (2009) Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 339–344.
- Vázquez, J.A., González, M.P. & Murado, M.A. (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245, 149–161.

- Venkat, H.K., Sahu, N.P. & Jain, K.K. (2004) Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35, 501-507.
- Vieira, F. N. , Buglione, C.C., Mouriño, J. L., Jatobá, A., Toro, C. R., Martins, M., L., Barracco, M. & Vinatea, L. A. (2008) Time related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43, 796-769.
- Vieira, F.N., Pedrotti, F.S., Buglione, C.C., Mouriño, J.L.P., Beltrame, E., Martins, M.L., Ramirez, C. & Vinatea, L.A. (2007) Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography* 55, 251-255.
- Vieira, F.N., Buglione, C.C.; Mouriño, J.P.; Jatobá, A., Pedrotti, F., Scheleder, D., Andreatta, E., Barracco, M.A., Martins, M., Vinatea, L. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*, *Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, in press.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. & Kaiser, H. (2006) Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 404–427.
- Wang, Y.B. (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259–264.
- Wang, Y.B., Xu, Z.R. & Xia, M.S. (2005) The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. *Fisheries Science* 71, 1034–1039.
- ZAR, J. H. (1984) *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. 718p.

39 CONCLUSÕES GERAIS

- a) Das cepas bacterianas isoladas do trato digestório de *L. vannamei*, o *Lactobacillus plantarum* apresentou o maior potencial para ser utilizado como probiótico para camarões marinhos.
- b) A suplementação da dieta com *L. plantarum* melhora sobrevivência da larvicultura de *L. vannamei*, diminuiu a população de *Vibrio* spp. nas larvas e aumenta sua resistência ao desafio com *V. harveyi*.
- c) A suplementação da dieta com *L. plantarum* modifica a microbiota bacteriana intestinal dos camarões, diminuindo a população de *Vibrio* spp., aumentando sua resistência ao desafio com *V. harveyi*, bem como a contagem total de hemócitos e título aglutinante do soro dos camarões após o desafio.
- d) No teste a campo em fazenda de cultivo, o uso de dieta suplementada com *L. plantarum* modificou a microbiota bacteriana intestinal dos camarões, diminuindo a população de *Vibrio* spp. e aumentando a de bactérias ácido lácticas. Resultou também em maior taxa de sobrevivência e eficiência alimentar dos camarões ao final do cultivo.
- e) Este estudo comprovou a viabilidade e a eficiência da suplementação dietaria com *L. plantarum* isolado do próprio camarão marinho cultivado no Estado de Santa Catarina.

40 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cepa de *L. plantarum* isolada do trato digestório dos camarões mostrou potencial para ser utilizada como probiótico na carcinicultura marinha. Contudo, alguns outros ensaios ainda podem ser realizados visando maximizar os resultados positivos do probiótico, como a inclusão de prebióticos na dieta. A suplementação da dieta com prebióticos, substâncias indigeríveis que servem de substrato para o crescimento da bactéria, poderia melhorar a colonização do probiótico nos camarões.

Ensaio de laboratório sobre um possível efeito protetor dos camarões contra infecções virais, como WSSV, também seriam de grande valia. Adicionalmente, a realização de ensaios a campo, em viveiros localizados em áreas atingidas por enfermidades (WSSV em Santa Catarina e NIM no nordeste), também seriam importantes. Nestas condições poder-se-ia avaliar o real efeito do probiótico frente as enfermidades em condição de cultivo.

Finalmente, uma metodologia de inoculação dos probióticos eficiente e barata na ração, deve ser desenvolvida para que o probiótico atinja a cadeia produtiva como um todo. Atualmente, a equipe do LCM está em contato com alguns fabricantes de ração, buscando as melhores formas desta inclusão em rações de forma industrial.

41 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ABRAHAM, T. J.; PALANIAPPAN, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 81-90, Apr 2004.
- ALAVANDI, S. V. et al. Evaluation of *Pseudomonas* sp PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, n. 2, p. 115-120, Aug 2004.
- ALY, S. M. et al. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. **Aquaculture**, v. 277, n. 1-2, p. 1-6, May 2008.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish**. Chichester, UK: Praxis Publishing Ltd, 2007. 552 p.
- BAIRAGI, A. et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, n. 2, p. 109-121, Feb 2002.
- BALCAZAR, J. L.; ROJAS-LUNA, T. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Current Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 409-412, Nov 2007.
- BALCAZAR, J. L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, D. P. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 147-150, Oct 2007.
- BALCAZAR, J. L. et al. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, n. 1-4, p. 188-191, Jun 2008.
- BARRACCO, M. A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M., et al (Ed.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.49-72.
- BARUAH, K. et al. In vivo effects of single or combined N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals on the performance of *Macrobrachium rosenbergii* larvae. **Aquaculture**, v. 288, n. 3-4, p. 233-238, Mar 2009.
- BOYER, M.; WISNIEWSKI-DYE, F. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. **Fems Microbiology Ecology**, v. 70, n. 1, p. 1-19, Oct 2009.
- BUGLIONE-NETO, C. C. Efeito da adição do probiótico sobre a digestibilidade aparente da proteína, energia e matéria seca em ração

comercial para *Litopenaeus vannamei*. 2009. 42f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Pos-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BUGLIONE-NETO, C. C. et al. Experimental infection with different bacterial strains in larvae and juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in Santa Catarina, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Science**, in press.

CASTEX, M. et al. Probiotic *P.-acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. **Aquaculture**, v. 275, n. 1-4, p. 182-193, Mar 2008.

CASTEX, M. et al. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture**, v. 294, n. 3-4, p. 306-313, Sep 2009.

CHEN, S. C. et al. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 45, n. 1, p. 45-52, May 2001.

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

COSTA, R.; et al., Isolation and characterization of bacteria associated with *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia, **Aquaculture**, v.164, p.297-309, mai 1998

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

DECAMP, O.; MORIARTY, D. J. W.; LAVENS, P. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 4, p. 334-338, Mar 2008.

DEFOIRDT, T. et al. Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. **Isme Journal**, v. 2, n. 1, p. 19-26, Jan 2008.

EL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A. E.; SHALABY, A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 175-180, Aug 2009.

EL-SERSY, N. A.; ABDELRAZEK, F. A.; TAHA, S. M. Evaluation of various probiotic bacteria for the survival of *Penaeus japonicus* larvae. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 15, n. 12A, p. 1506-1511, Abr 2006.

ERASMUS, J. H.; COOK, P. A.; COYNE, V. E. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v. 155, n. 1-4, p. 377-386, Sep 1997.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: Sofia, 2008. 170 p.

FAR, H. Z. et al. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 14, p. 3369-3376, Jul 2009

FULLER, R. Probiotics in Man and Animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, May 1989.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum Sensing in Bacteria - the Luxr-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269-275, Jan 1994.

GATESOUPÉ, F. J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. **Aquatic Living Resources**, v. 10, n. 4, p. 239-246, Mar 1997.

GATESOUPÉ, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, Oct 1999

GATESOUPÉ, F. J. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. **Aquaculture**, v. 212, n. 1-4, p. 347-360, Sep 2002.

GEORGE, M. R. et al. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 369-372, Dez 2005.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 755-773, Oct 2003.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 591-606, Dec 2008

GOARANT, C. et al. "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 105-113, Mar 2006.

GOMEZ-GIL, B. et al. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 163, n. 1-2, p. 1-9, Apr 1998.

GRAM, L. et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens*

AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 969-973, Mar 1999.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 1-14, Apr 2004.

GUO, J. J. et al. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 5, p. 609-618, Mar 2009.

HAGI, T. et al. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 335-346, May 2004.

HAMID, A.; SAKATA, T.; KAKIMOTO, D. Microflora in the Alimentary-Tract of Gray Mullet .4. Estimation of Enzymic Activities of the Intestinal Bacteria. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 45, n. 1, p. 99-106, Agt 1979.

HILL, J. E.; BAIANO, J. C. F.; BARNES, A. C. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1007-1016, Dec 2009.

HOLMSTROM, K. et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 255-266, Mar 2003.

JAYAPRAKASH, N. S. et al. A marine bacterium, *Micrococcus* MCCB 104, antagonistic to vibrios in prawn larval rearing systems. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n. 1, p. 39-45, Dec 2005.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213-236, Jun 2006.

KARUNASAGAR, I. et al. Mass Mortality of *Penaeus-Monodon* Larvae Due to Antibiotic-Resistant *Vibrio-Harveyi* Infection. **Aquaculture**, v. 128, n. 3-4, p. 203-209, Dec 1994.

KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 600-607, Dec 2008

KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1-14, Jan 2008.

LEANO, E. M.; LAVILLA-PITOGO, C. R.; PANER, M. G. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 367-374, May 1998.

- LI, J. Q. et al. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 140-147, Mar 2006.
- LI, J. Q.; TAN, B. P.; MAI, K. S. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 291, n. 1-2, p. 35-40, Jun 2009.
- LI, J. Q. et al. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 4, p. 477-489, Aug 2008.
- LI, K. et al. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 4, p. 525-530, Apr 2007.
- LIGHTNER, D. V. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 229-248, Sep 2005.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R.H. Probiotics - Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-8, Jan 1965.
- LIN, H. Z. et al. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 15, p. 1441-1447, Dec 2004.
- LIU, C. H. et al. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 1031-1041, Sep 2009.
- MAASSEN, C. B. M. et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. **Vaccine**, v. 18, n. 23, p. 2613-2623, May 2000.
- MACDONALD, N. L.; STARK, J. R.; AUSTIN, B. Bacterial Microflora in the Gastrointestinal-Tract of Dover Sole (*Solea-Solea* L), with Emphasis on the Possible Role of Bacteria in the Nutrition of the Host. **FEMS Microbiology Letters**, v. 35, n. 1, p. 107-111, Jun 1986.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, 2000. 991 p.
- MAEDA, M. et al. The concept of biological control methods in aquaculture. **Hydrobiologia**, v. 358, p. 285-290, Dec 1997.
- MCINTOSH, D. et al. The effect of a commercial bacterial supplement on the

high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. **Aquacultural Engineering**, v. 21, n. 3, p. 215-227, Jan 2000.

MEUNPOL, O.; LOPINYOSIRI, K.; MENASVETA, P. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 437-448, Apr 2003.

MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 351-358, May 1998.

MUKHERJEE, S. et al. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 281-288, Mar 2009

NG, W. L.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 197-222, 2009.

OCHOA-SOLANO, J. L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* spp. for shrimp feeds. **Food Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 519-525, Sep 2006.

PASHARAWIPAS, T. et al. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand. **Virus Research**, v. 114, n. 1-2, p. 63-69, Dec 2005.

PATEL, A. K. et al. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 505-510, May 2009.

PERAZA-GOMEZ, V. et al. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 13, p. 1481-1489, Sep 2009.

PERDIGON, G. et al. Role of yoghurt in the prevention of colon cancer. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S65-S68, Aug 2002.

PHIANPHAK, W. et al. Probiotic Use of *Lactobacillus* spp. for Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. **The Journal of Scientific Research of Chulalongkorn University**, v. 24, n. 1, p. 16, Out 1999.

RAMIREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. 2006. 173 Teses (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Pós-graduação em processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

RATTANACHUAY, P. et al. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp W3.

Electronic Journal of Biotechnology, v. 13, n. 1, p. -, Jan 2010.

RENGPIPAT, S. et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v. 167, n. 3-4, p. 301-313, Sep 1998.

RENGPIPAT, S. et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). **Aquaculture**, v. 191, n. 4, p. 271-288, Dec 2000.

RINGO, E.; GATESOUPPE, F. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, n. 3-4, p. 177-203, Jan 1998

RINGO, E. et al. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 4, p. 451-467, Mar 2009.

ROBERTSON, P. A. W. et al. Use of *Carnobacterium* sp as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Aquaculture**, v. 185, n. 3-4, p. 235-243, May 2000.

RODRIGUEZ, J. et al. Exposure to probiotics and beta-1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 405-415, Dec 2007.

SALINAS, I. et al. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 3-4, p. 279-286, Jun 2006.

SANSAWAT, A.; THIRABUNYANON, M. Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 77-87, Jan-Apr 2009.

SCHULZE, A. D. et al. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 50-73, Jun 2006.

SKJERMO, J.; VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**, v. 177, n. 1-4, p. 333-343, Jul 1999. ISSN 0044-8486.

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

SOUNDARAPANDIAN, P.; SANKAR, S. Effect of probiotics on the survival and production of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius).

International Journal of Zoological Research, v. 4, n. 1, p. 6, Feb 2008.

SUGITA, H. et al. An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 9, p. 1002-1004, Jun 2007.

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

SWAIN, S. M.; SINGH, C.; ARUL, V. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against *Vibriosis* in shrimp *Penaeus monodon*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 697-703, Apr 2009.

TALARICO, T. L. et al. Production and Isolation of Reuterin, a Growth Inhibitor Produced by *Lactobacillus-Reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 12, p. 1854-1858, Dec 1988.

TINH, N. T. N. et al. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-12, Jan 2008.

TSENG, D. Y. et al. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 2, p. 339-344, Feb 2009.

VANDENBERGHE, J. et al. *Vibrios* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea : Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. **Aquaculture**, v. 169, n. 1-2, p. 121-132, Nov 1998.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 83-87, Set 2003.

VAZQUEZ, J. A.; GONZALEZ, M. P.; MURADO, M. A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v. 245, n. 1-4, p. 149-161, Mar 2005.

VENKAT, H. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 5, p. 501-507, Apr 2004.

VERSCHUER, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-+, Dec 2000.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of

five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. **Fems Microbiology Letters**, v. 231, n. 1, p. 145-152, Feb 9 2004.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **Fems Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 404-427, May 2006.

WANG, Y. B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimps *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 259-264, Sep 14 2007.

WANG, Y. B.; XU, Z. R.; XIA, M. S. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fisheries Science**, v. 71, n. 5, p. 1036-1041, Oct 2005.

WANG, Y. G. et al. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 41, n. 1, p. 9-18, May 2000.

YASUDA, K.; KITAO, T. Bacterial-Flora in the Digestive-Tract of Prawns, *Penaeus-Japonicus* Bate. **Aquaculture**, v. 19, n. 3, p. 229-234, Aug 1980.

ZHANG, L. et al. Effects of Dietary Administration of Probiotic *Halomonas* sp B12 on the Intestinal Microflora, Immunological Parameters, and Midgut Histological Structure of Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 1, p. 58-66, Feb 2009.

ZHOU, X. X.; WANG, Y. B.; LI, W. F. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3-4, p. 349-353, Feb 2009.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 516-524, Mar 2006.

ANEXO I:

Halo de inibição formado pelo *Lactobacillus plantarum* contra *Vibrio harveyi*.



ANEXO II:

Parâmetros utilizados para avaliação do índice de qualidade larval adaptado de FAO (2003).

Parâmetros	Avaliação	Pontuação*
Atividade Natatória	Acima de 90%	1
	Entre 70 e 90%	0,5
	Abaixo de 90%	0
Homogeneidade de estádio	Acima de 80% no mesmo estádio	1
	Entre 70 e 80% no mesmo estádio	0,5
	Menos de 70% no mesmo estádio	0
Hepatopâncreas, reserva de lipídios.	Acima de 90% dos animais amostrados	1
	Entre 70 e 90% dos animais amostrados	0,5
	Abaixo de 70% dos animais amostrados	0
Hepatopâncreas, coloração relativa a dieta utilizada	Animais com hepatopâncreas amarelo escuro a marrom	1
	Hepatopâncreas amarelo claro	0,5
	Hepatopâncreas com pouco coloração e áreas vazias	0
Conteúdo intestinal	Acima de 70% dos animais amostrados	1
	Entre 20 e 70% dos animais amostrados	0,5
	Abaixo de 20% dos animais amostrados	0
Necroses, indicação de contaminação bacteriana ou canibalismo	Não encontrados nos animais	1
	Quando até 15% dos animais amostrados apresentarem necrose	0,5
	Quando acima de 15% dos animais apresentarem necrose	0
Deformidades	Não encontrado nos animais	1
	Abaixo de 10% dos animais amostrados	0,5
	Acima de 10% dos animais amostrados	0
Epibiontes	Não encontrado nos animais amostrados	1
	Epibiontes temporais, abaixo de 15% dos animais amostrados	0,5
	Epibiontes permanentes, acima de 15% dos animais amostrados	0
Partículas aderidas	Larvas limpas com poucas partículas aderidas nas pontas dos apêndices(<5%); ou entre 5 a 10% dos organismos, abaixo de 25% dos animais amostrados	1
	Larvas com poucas partículas aderidas, entre 10 a 40% dos apêndices dos organismos, entre 25 a 60% dos animais amostrados	0,5
	Larvas com partículas aderidas, acima de 40% dos apêndices ou do organismo, superior a 60% dos animais	0
Cromatóforos	Apresentam nível normal de cromatóforos expandidos	1
	Nível moderado de cromatóforos expandidos (somente nos apêndices)	0,5
	Alto nível de cromatóforos expandidos (em todo o animal)	0

Síndrome de “Bollitas”	Nenhuma célula epitelial do Hepatopâncreas ou do intestino dentro do trato digestório.	1
	Células epiteliais do Hepatopâncreas ou do intestino dentro do trato digestório	0,5
	Células epiteliais do Hepatopâncreas ou do intestino dentro do trato digestório(numero de células superior a 3)	0
Luminescência, contaminação bacteriana	Não encontrado nos animais	1
	15% dos animais apresentam luminescência	0,5
	Acima de 15% dos animais apresentam luminescência	0

*A soma total da pontuação dos parâmetros avaliados foi considerada de ótimo (superior a 8,5 pontos), bom (de 6,5 a 8,5 pontos), satisfatório (de 5,0 a 6,5 pontos) a ruim (abaixo de 5,0 pontos).

ANEXO III:

Foto aérea da Fazenda Experimental Yakult, localizada no município de Barra do Sul-SC

