

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA**

**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO EM SISTEMAS DE POLICULTIVO DE TILÁPIAS COM
CAMARÕES MARINHOS**

ADOLFO JATOBÁ MEDEIROS BEZERRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Aqüicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em aqüicultura.

Orientador: Edemar Roberto Andreatta, Dr.

Coorientador: Walter Quadros Seiffert, Dr.

**FLORIANÓPOLIS
2008**

Jatobá, Adolfo,

Utilização de probiótico em sistema de policultivo de tilápias com camarões marinhos / Adolfo Jatobá Medeiros Bezerra. – 2008.

43 f : grafs., tabs.

Orientador: Edegar Roberto Andreatta
Co-orientador: Walter Quadros Seiffert

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

1.*Oreochromis niloticus*; 2.*Litopenaeus vannamei*; 3.*Lactobacillus plantarum*; 4.Microbiota bacteriana; 5.Hematologia; 6.Crescimento.

Utilização de probiótico em sistema de policultivo de tilápias com camarões marinhos.

Por

ADOLFO JATOBÁ MEDEIROS BEZERRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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. Edeimar Roberto Andreatta - *Orientador*

Dr. Maurício Laterça Martins

Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

AGRADECIMENTOS

Ao professor Edegar Roberto Andreatta pela orientação e apoio durante a realização do mestrado;

Ao professor Walter Quadros Seiffert pelos ensinamentos nas práticas aquícolas a campo;

Ao técnico da Fazenda Experimental Yakult Jairo Silva, pela companhia, paciência, parceria e amizade;

Ao Jaco, funcionário da Fazenda Experimental Yakult, que me auxiliou durante as biometrias;

Ao professor e amigo Mauricio Laterça Martins por todos os ensinamentos e empréstimos de material para realização das avaliações hematológicas;

Ao meu pai, Silvino Adonias Bezerra Neto e minhas irmãs Juliana Jatobá Medeiros Bezerra e Gabriela Jatobá Medeiros Bezerra por todo amor e apoio demonstrado;

A minha mãe, Mauricea Medeiros, pelo carinho, amor, saudade, paciência e compreensão durante o período do mestrado que não pude dar a atenção e presença merecida;

Ao Luizão (Luiz Nunes) e família pelos momentos de descontração;

Ao amigo e chefe, José Luiz P. Mouriño por toda dedicação e “pepinos” resolvidos para realização deste trabalho;

Aos meus amigos e parceiros do setor de microbiologia Bruninho (Bruno Correa da Silva) e Celsinho (Celso Carlos Buglione Neto) por tudo;

Ao amigo, conselheiro e parceiro de trabalho Pipi (Felipe do Nascimento Vieira) por todas as correções, finais de semanas, ensinamentos culinários, e “quartas do futebol”;

Em fim, a todos que de alguma forma participaram na elaboração e execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Introdução	9
Perdas econômicas causadas por enfermidades na carcinicultura.....	10
Policultivo de camarões marinhos e Tilápias	10
Hematologia	11
Definição de probióticos	12
Microorganismos probióticos.....	12
Isolamento de bactérias probióticas	13
Uso de Probióticos na Aqüicultura.....	16
INTRODUÇÃO.....	21
METODOLOGIA	21
Material Biológico	22
Preparo da dieta experimental.....	22
Delineamento experimental.....	22
Manejo alimentar e parâmetros de qualidade de água	22
Avaliação dos índices zootécnicos.....	23
Avaliação microbiológica	23
Hematologia	23
Título de aglutinação	23
Atividade Fagocitária	24
Contagem total de hemócitos (THC)	24
Análise Estatística	24
RESULTADOS	24
Parâmetros de qualidade de água	24
Avaliação dos índices zootécnicos.....	24
Avaliação microbiológica	25
Hematologia	25
Título de aglutinação	25
Taxa fagocitária	25
Contagem total de hemócitos (THC)	25
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	32
AGRADECIMENTOS	32
Referências ARTIGO	32

Referências da introdução	36
Anexo I	43

RESUMO

A aquicultura é um dos ramos do agronegócio que mais cresce mundialmente. O cultivo de camarões contribui para este aumento através da intensificação e ampliação das áreas cultivadas. Uma das consequências desta intensificação é o surgimento de enfermidades que impossibilitam o cultivo de camarões nas áreas atingidas pelas enfermidades. Como alternativa para a continuidade da atividade, a prática de policultivos em busca de sistemas mais equilibrados a utilização de probióticos tem sido avaliada, porém não sabemos o efeito dos probióticos em sistemas de policultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com probiótico (*Lactobacillus plantarum*) em dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em sistema de policultivo com camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*). Foram utilizados dez cercados de 20 m² dentro de um mesmo viveiro, estocados com 2 tilápias/m² (41,9g) e 10 camarões/m² (2,3 g), totalizando 200 camarões e 40 tilápias por unidade experimental. As tilápias de 5 unidades experimentais foram alimentadas com ração comercial suplementada com *L. plantarum* e as demais unidades com ração comercial controle. Após 12 semanas de cultivo as tilápias que receberam a dieta suplementada com probiótico (*L. plantarum*) obtiveram valores 13,6%, 7,5% e 7,1% maiores ($p<0,05$) para eficiência alimentar, produtividade e peso final, respectivamente. Nos animais tratados com probiótico houve redução na população de bactérias totais no trato intestinal e um acréscimo na população de bactérias ácido-lácticas no trato intestinal de peixes e camarões. No trato intestinal dos camarões também houve diminuição na população de *Vibrio* ssp. A avaliação hematológica mostrou maior número de trombócitos e leucócitos nas tilápias que receberam a ração suplementada com probiótico, assim como o de linfócitos na contagem diferencial dos leucócitos. Não foram observadas diferenças significativas no título de aglutinação do soro e taxa de fagocitose. O *L. plantarum* utilizada colonizou o trato intestinal das tilápias e camarões, diminuindo a população de bactérias totais, aumentando o peso final e eficiência alimentar das tilápias.

Palavras chaves: 1. *Oreochromis niloticus*, 2. *Litopenaeus vannamei*, 3. *Lactobacillus plantarum*, 4. microbiota bacteriana, 5. hematologia, 6. crescimento.

ABSTRACT

The aquaculture is an arm of agribusiness that fastest-growing worldwide. The shrimp culture contributing to this increase by intensifying and expansion of cultivated areas. One of the consequences of this intensifying is the emergence of diseases that hamper the cultivation of shrimps in the areas affected by diseases. As an alternative to the continuation of the activity, the practice of polyculture in search of systems more balanced and the use of probiotics has been assessed. But we do not know the effect of probiotics in polyculture systems.

This work evaluated the effect of the probiotic supplementation (*Lactobacillus plantarum*) in fed of tilapias (*Oreochromis niloticus*) in policulture system with marine shrimps (*Litopenaeus vannamei*). Ten cages of 20 m² have been used inside one excavated pond, stored with 2 tilápias/m² (41,9g) and 10 camarões/m² (2,3g), in total 200 shrimps and 40 tilápias for experimental unit. Fish from 5 experimental units were fed with supplemented diet with *L. plantarum* and others cages experimental units with control diet. After 12 weeks culture tilapias that received probiotic diet (*L. plantarum*) showed values 13.6%, 7.5% and 7.1% greater ($p > 0,05$) of food efficiency, productivity and final weight, respectively. Fish supplemented with probiotic showed a reduction in the total bacteria population in the intestinal treatment and an addition in the population of acid lactic bacteria in the intestinal tract fish and shrimps. In the shrimps also had a reduction in the population of *Vibrio* ssp. Shrimp also had reduced in the *Vibrio* ssp. population. In the treatment with probiotic reduced the intestinal total bacteria population and an addition in the acid lactic bacteria population in the fish and shrimp intestinal tract. The hematological evaluation was observed bigger number of trombocytes and leukocytes from tilapia that received the probiotic, as well as the number of lymphocytes in the distinguishing counting of the leukocytes. No significant differences was showed in immunology parameter to shrimp as well as fagocitose rate to fish. The *Lactobacillus plantarum* used in this work colonized tilapia and shrimp intestinal tract, reduced total bacteria population, increased the tilapia final weight and its food efficiency.

Key words: 1. *Oreochromis niloticus*, 2. *Litopenaeus vannamei*, 3. *Litopenaeus vannamei*, 4. bacteria microbiota, 5. hematology, 6. growth.

INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos ramos do agronegócio que mais cresce mundialmente. Do ano de 2000 a 2004 sua produção aumentou em 32,4%, atingindo a marca de 47,8 milhões de toneladas, representando 43% do pescado consumido no mundo. Este aumento pode ser exemplificado através do cultivo de camarões que apresentou um crescimento de 28,7% entre 2002 e 2004 (FAO, 2006), este obtido através da intensificação e aumento das áreas cultivadas.

Uma das conseqüências desta intensificação é o surgimento de enfermidades que causam problemas para a indústria camaroneira em vários países. Em Taiwan, nos anos 1987 e 1988, a produção de camarões caiu 60% devido a mortalidades (WYBAN et al., 1992). Os vírus são os causadores das maiores perdas econômicas nos principais produtores como China, Tailândia, Equador (GRIMÓN, 2003) e Brasil (LIGHTNER & PANTOJA, 2004; MELO & FARIAS, 2007).

Para o controle de enfermidades, vários recursos são utilizados, em especial, agentes químicos com funções antimicrobianas. Porém, o uso inapropriado de alguns produtos com atividades bactericidas e bacteriostáticas no ambiente de cultivo, como antibióticos, pode provocar seleção de cepas patogênicas resistentes (FULLER, 1992; GÓNGORA, 1998; KLAENHAMMER & KULLEN, 1999), além de ser uma fonte de poluição ambiental (BOYD & MASSAUT, 1999).

No ecossistema aquático a população de bactérias presente encontrasse naturalmente em equilíbrio (MAEDA et al., 1997), incluindo as patogênicas. Em tanques ou viveiros de aquicultura há uma tendência do mesmo processo ocorrer. Normalmente, o surgimento de uma enfermidade é a conseqüência da quebra deste equilíbrio, tornando o ambiente favorável para a proliferação de organismos patogênicos e oportunistas como vírus, bactérias e parasitos (BIAO & KAIJIN, 2007). Leung & Tran (2000) sugerem que a solução para o controle das enfermidades se baseia na prevenção. Outra opção seria a obtenção do equilíbrio entre os organismos do sistema de cultivo, incluindo os patogênicos.

Para manutenção do equilíbrio dos sistemas em fazendas de camarões marinhos há possibilidade da prática do policultivo com tilápias, devido sua capacidade de melhorar a qualidade de água (TORRANS & LOWELL 1987). Junto ao policultivo, pode ser adicionadas cepas de bactérias benéficas (probióticas) para competir e inibir o crescimento de bactérias patogênicas (VERSCHUERE et al., 2000), contribuindo para o maior equilíbrio do sistema de cultivo.

Os probióticos podem ter potencial benéfico de atuar na água dos tanques de aquicultura (BOYD & MASSAUT, 1999) ou nos animais de cultivos, onde a adição de cepas de bactérias compete ou inibe o crescimento de microorganismos patogênicos (GATESOUBE, 2008), não trazendo prejuízos aos animais cultivados nem ao meio ambiente (BOYD & MASSAUT, 1999). Para Irano & Austin (2002), os probióticos favorecem o crescimento dos animais cultivados e a redução de agentes patogênicos, minimizando o uso de agentes químicos, como antibióticos, favorecendo a prática de uma aquicultura sustentável.

Assim, a aplicação dos probióticos em sistemas de policultivo pode ser uma alternativa, principalmente para áreas atingidas por enfermidades, pois ambas as práticas podem contribuir

para a manutenção do equilíbrio no cultivo. Contudo, pouco se conhece sobre o efeito dos probióticos em sistemas de policultivo.

Perdas econômicas causadas por enfermidades na carcinicultura

A aquicultura, como qualquer outra atividade, corre uma série de riscos e um dos principais encontrados nos sistemas de cultivo é o surgimento de enfermidades. Os animais aquáticos convivem com seus patógenos no mesmo meio, facilitando a contaminação por sua exposição contínua e adversidades encontradas.

Enfermidades podem ser causadas por parasitos, bactérias ou vírus. As bactérias, em especial as do gênero *Vibrio* são conhecidas por serem patógenos secundários e oportunistas causando mortalidade em camarões em condições de estresse (LIU et al., 2004). Seu aparecimento está estreitamente relacionado à interação entre o hospedeiro, distúrbios ambientais e a população de espécies potencialmente patogênicas (LIGHTNER & REDMAN, 1998).

Entre as bactérias, pode-se destacar o *Vibrio harveyi* responsável pelo aparecimento da “síndrome de gaivota” no Equador onde causou perda de 15% na produção. Em larvas de camarão marinho também é responsável pela doença conhecida como “síndrome de *bolitas*” (ROBERTSON et al., 1998) e “síndrome de Protozooea” (AUSTIN & AUSTIN, 2007) que estão entre as maiores causadoras de perdas na larvicultura de camarões. Já Mouriño et al. (2008) registrou perdas de 60% em mysis 3 e pós-larva 1 de *Litopenaeus vannamei* em larviculturas no Estado de Santa Catarina, causado pela bactéria filamentosa, *Flexibacter maritimus*.

Assim como as bactérias os vírus também são responsáveis por grandes perdas, porém mais catastróficas. Na Tailândia em 1995 o vírus da cabeça amarela (YHV, do inglês *Yellow-Head Virus*) provocou perdas de 40 milhões de dólares. Em 1996 e 1997 o vírus da mancha branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*) provocou perda estimada em um bilhão de dólares. Este mesmo vírus reduziu as exportações de camarão da China em aproximadamente 70% de 1992 para 1993 (FLEGEL, 2006).

No Equador ocorreu uma redução de 65% da produção de camarão no ano de 2000, em consequência do aparecimento do WSSV (ROSENBERRY, 1998), considerado um dos vírus de maior patogenicidade para camarões peneideos (LINDBERG & NYLANDER, 2001). No Brasil não foi diferente, grandes perdas ocorreram após a confirmação do WSSV em Santa Catarina, sul do Brasil (MELLO & FARIAS, 2007) reduzindo o número de fazendas em atividade. Já no nordeste Brasil, a identificação do vírus nomeado mionecrose infecciosa muscular (IMN, do inglês *Infectious myonecrosis*) (LIGHTNER & PANTOJA, 2004) reduziu em 40% a produção entre 2003 e 2005 (ANDRADE et al., 2007).

Policultivo de camarões marinhos e Tilápias

O termo “policultivo” significa o cultivo de várias espécies. Na aquicultura, a maioria dos empreendimentos trabalha em sistemas de monocultivo, no qual todo o manejo é realizado com o objetivo de obter um único organismo como produto final. Porém, no viveiro existem diversos organismos secundários de vital importância como fitoplâncton, zooplâncton e zoobentos. Sendo

assim, quaisquer cultivos podem ser nomeados de policultivo. Contudo, este termo é utilizado quando mais de uma espécie é cultivada como produto final. Como exemplos, podem ser citados o policultivo de tilápias e camarões (CANDIDO et al., 2005; TENDENCIA et al., 2006a,b; 2007; UDDIN et al., 2007); entre carpas, *Amblypharyngodon mola* e *Puntius sophore* (KADIR et al., 2007), o mexilhão, *Mytilopsis trautwineana* e o camarão, *Litopenaeus vannamei* (ALDRIDGE et al., 2008), entre outros.

Os camarões podem ser cultivados juntamente a quaisquer espécies de organismos aquáticos filtradores ou detritívoros, como peixes e moluscos. Entre os peixes, a tilápia tem se destacado por ser considerado um “peixe sanitário” (TORRANS & LOWELL, 1987) sendo capaz de reduzir as contagens de *Vibrio harveyi* na água (TENDENCIA et al., 2006b), bactéria patogênica para camarões marinhos (VIEIRA et al., 2007; 2008). Este peixe ainda suporta variações de salinidade, tem um bom crescimento em água salobra (WANG et al., 2000), resiste a baixos teores de oxigênio e à enfermidades. Além disso, já possui um pacote tecnológico desenvolvido, de maturação, alevinagem e engorda.

A presença da tilápia no policultivo com camarões marinhos pode ser utilizada como alternativa contra as enfermidades virais. Grimón (2003) detectou menores prevalências de WSSV em policultivos de tilápias e camarões marinhos comparado com monocultivos de camarões. Isto foi justificado pela tilápia reduzir a transmissão horizontal dentro do viveiro ao se alimentar de camarões moribundos, evitando o canibalismo entre eles. Porém, não foi observada a presença de camarões no estômago das tilápias demonstrando que estes não faziam parte de sua dieta.

Esta técnica foi empregada em ambientes continentais (ROUSE et al., 1987; CANDIDO et al., 2005; UDDIN et al., 2007), estuarinos e marinhos (WANG et al., 1998; TENDENCIA et al., 2006a,b; 2007). Seu desenvolvimento em ambientes com água salobra é uma alternativa para viabilizar a produção em fazendas camaroneiras atingidas por enfermidades, aonde vem sendo preconizada no Equador (GRIMÓN, 2003) e Brasil (MELLO & FARIAS, 2007).

Alguns trabalhos (CANDIDO et al., 2005; MUANGKEOW et al., 2007) tem demonstrado rendimentos superiores para camarões cultivados em sistemas integrados com tilápia à monocultivos. Isto pode estar associado aos efeitos benéficos produzidos pela tilápia nos sistemas nos viveiros aquícolas, o qual reduz o acúmulo de matéria orgânica em suspensão e abundância do fitoplâncton (LEVENTER, 1981; DRENNER et al., 1987; TIAN et al., 2001; GRIMÓN, 2003), tornando o ambiente mais equilibrado.

Hematologia

A pele e o muco dos peixes são as primeiras barreiras enfrentadas pelos microorganismos patogênicos, entretanto ao invadir o corpo do hospedeiro ativam o sistema de defesa inato humoral e celular (MAGNADÓTTIR, 2006). Entre os mecanismos de defesa, os hematológicos são considerados como uma importante ferramenta para determinar o estado de saúde dos peixes (TAVARES-DIAS & FAUSTINO, 1998). O estudo destes parâmetros em pesquisa com animais é bem aceito e considerada procedimento de rotina em métodos de diagnóstico de sanidade animal (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

Em peixes, a presença, a quantidade e a proporção das diferentes células no sangue refletem o estado fisiológico do organismo em um dado momento ou durante uma determinada fase da vida (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004). A variação entre as células vermelhas são importantes nos processos anemiantes (SOPINSKA, 1985) enquanto o leucograma pode ser empregado em diagnósticos de processos infecciosos (SOPINSKA, 1995; SERPUNIN & LIKHATCHYOVA, 1998).

Além da hematologia, alguns parâmetros como a atividade fagocítica, atividade da lisozima e atividade hemolítica são bons indicadores da influência de efeitos externos sobre o sistema imune dos animais, assim como sua resistência a enfermidades (MAGNADÓTTIR, 2006).

As alterações nos parâmetros hematológicos podem ser resultado de variações genéticas (LUND et al., 1995; FJALSTAD et al., 2003), variações sazonais (ZAPATA et al., 1992; COLLAZOS et al., 1995), temperatura da água (ALCORN et al., 2002; NIKOSKELAINEN et al., 2004), estresse e manejo (GARBI, 1996; DAVIS et al., 2002), dieta e aditivos alimentares (DUNCAN & KLESIOUS, 1996; ORTUÑO et al., 2001), doenças e vacinas (ANDERSON, 1992; HOOLE, et al., 2003) bem como imunostimulantes e probióticos (GATESOUBE, 1999; JATOBÁ et al. 2008; WANG et al. 2008).

Microorganismos probióticos

Diversos microorganismos têm sido utilizados como probióticos. Alguns autores (AVENDÃO & RIQUELME, 1999; GOMES-GIL et al., 2002; MARQUES et al., 2006) utilizaram misturas de microalgas e bactérias com intuito de melhorar as culturas de algas a serem oferecidas a outros organismos. Já Abdel-Tawwab et al. (2008) utilizaram um produto comercial à base de leveduras com componentes imunostimulantes como β -glucanos, ácidos nucleicos e oligossacarídeos com a capacidade de melhorar a resposta imune (ORTUÑO et al., 2002) e promover o crescimento dos animais (LARA-FLORES et al., 2003). Sakai (1999) reconheceu que as leveduras podem desempenhar importante papel imunológico nos animais. Porém, as leveduras não se enquadram na definição de probióticos utilizada neste trabalho. Ao tratar-mos de microorganismos probióticos as bactérias são as mais utilizadas (vide revisão de BALCÁZAR et al., 2006).

Lin et al., (2004) utilizaram *Bacillus* sp. na dieta de *Litopenaeus vannamei* melhorando os índices de digestibilidade da ração. Em *Fenneropenaeus indicus*, Ziaei-nejad et al. (2006) observaram aumento da atividade das enzimas digestivas com *Bacillus* sp. Lategan et al (2006) verificaram o potencial probiótico de *Aeromonas media* devido a sua capacidade de produção de substâncias inibitórias. Algumas espécies de vibrios têm demonstrado potencial probiótico em *L. vannamei* (GULLIAN, 2004).

Entre as bactérias, há o interesse no uso das bactérias ácido lácticas como probióticos por sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas pela produção de compostos antibacterianos (FULLER, 1989) e sua ação imunostimulante (VIEIRA et al., 2008). Entre os compostos produzidos destacam-se o ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, reuterina e bacteriocinas (VÁSQUEZ et al., 2005).

As bactérias lácticas são caracterizadas por serem gram-positivas, anaeróbicas ou anaeróbicas aerotolerantes, imóveis, não esporuladas, catalase negativas, carência de citocromos e produzem ácido láctico como maior produto final do seu metabolismo (RINGO & GATESOUBE, 1999). Diferentes gêneros de bactérias lácticas (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*) se adaptaram a crescer em diferentes condições ambientais (FARZANFAR, 2006). Contudo, elas não são dominantes na microbiota intestinal de organismos aquáticos, e muitas tentativas têm sido realizadas no intuito de induzir uma dominância artificial destas bactérias (GATESOUBE, 1999).

O *Lactobacillus plantarum* teve seu efeito probiótico registrado em tilápias (JATOBÁ et al., 2008) e camarões (VIEIRA et al., 2007; 2008). Os autores trabalharam com cepas isoladas do trato digestório dos animais em estudo, aumentando a especificidade entre microorganismos e hospedeiro.

Definição de probióticos

Os probióticos são estudados a mais de 50 anos, e a primeira definição provém de Lilly & Stillwell (1965), “substância produzida por um protozoário que estimula o crescimento de outro”. Esta definição foi modificada por Fuller (1989) para “microorganismo vivo utilizado na alimentação que afeta benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de microorganismos da flora intestinal”. Porém esta definição pode ser insuficiente para a aquicultura, pois em ambientes aquáticos há uma constante interação entre os organismos cultivados e os microorganismos presentes no ambiente.

Verschuere et al. (2000) define probióticos como “microorganismos vivos que ao serem ministrados a tanques de cultivo atuam benéficamente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, balanço de bactérias no trato digestivo ou o ambiente de cultivo (viveiro)”. Esta definição não restringe a atuação dos probióticos independente da sua via de aplicação, seja na água ou na alimentação, aos organismos cultivados. Porém para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o conceito de Gatesoupe (1999) que definiu probiótico como “células microbianas que são adicionadas de maneira que entrem no trato digestivo dos animais, mantendo-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal”. Este mesmo autor desconsidera como probióticos microorganismos que aplicados no meio melhorem a qualidade do ambiente de cultivo (biorremediação) e diminuam a carga de bactérias patogênicas na água (biocontrole).

Isolamento de bactérias probióticas

Não existe consenso sobre a utilização de bactérias benéficas como probióticos na aquicultura. São inúmeros relatos positivos em camarões (LI et al., 2006; VIEIRA et al., 2007, 2008) e peixes (LARA-FLORES et al., 2003; EL-HAROUN et al., 2006; WANG et al., 2008). Porém, também há resultados negativos (ALAVANDI, et al. 2004; PADILHA, 2005) sendo que estes normalmente estão associados a produtos comerciais no qual não se conhece a origem do material microbiológico utilizado, o qual não foi isolado do trato digestório do animal em estudo.

Na escolha de bactérias probióticas deve-se dar prioridade a microorganismos isolados do animal que se pretende trabalhar. Segundo Vieira (2006), o isolamento e seleção de uma bactéria probiótica pode seguir um protocolo (Figura 1). O primeiro passo é isolá-la do trato digestório de animais saudáveis. Deve-se utilizar meio seletivo para selecionar bactérias de interesse, meio de cultura Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sucrose) para o isolamento de *Vibrio* ssp. (GULLIAN et al., 2004), Agar Cetrimide para *Pseudomonas* ssp. (VIJAYAN et al., 2006), Agar MRS (DE MAN et al., 1960) para bactérias lácticas (RAMIREZ, 2005).

Depois de isoladas as cepas devem passar por um processo seletivo *in vitro*. Estes testes incluem tolerância a cloreto de sódio para garantir a aplicação em animais que habitem ambientes marinhos e estuarinos, resistência a sais biliares para garantir melhor passagem da bactéria pelo trato intestinal (RAMIREZ, 2005), curva de crescimento ideal em diferentes pH e temperaturas (VIJAYAN et al., 2006), capacidade da cepa de produção de compostos inibitórios (VINE et al., 2004; RAMIREZ, et al. 2006) e de exclusão competitiva diferentes patógenos (VASEEHARAN & RAMASAMY, 2003).

Cepas que destacarem-se nos testes *in vitro*, deve-se proceder um teste *in vivo* para avaliar a capacidade destas de recolonização do trato digestivo do animal (GULLIAN et al., 2004; JATOBÁ et al., 2008) e se as mesmas não são patogênicas (VIJAYAN et al., 2006). Este teste deve ser feito de maneira que permita que a cepa candidata a probiótica colonize o trato digestório, seja através da aplicação do probiótico na água (LI et al., 2006), na ração (JATOBÁ et al., 2008; VIEIRA et al., 2007; 2008) ou no alimento vivo.

Contudo, os testes de seleção *in vitro* não garantem os resultados positivos *in vivo*. Alavandi et al., (2004) relatam que o uso das bactérias candidatas a probiótico como *Pseudomonas* sp. PM11 e *Vibrio fluviales* PM17, selecionadas *in vitro* pela capacidade de inibir patógenos, baixaram os índices imunitários em *Penaeus monodon*.

Após as bacterianas serem aprovadas nos testes *in vitro*, *in vivo* e não demonstraram patogenicidade, devem ser submetidas à avaliar os efeitos na resistência a infecção por patógenos (GULLIAN et al., 2004; JATOBÁ et al., 2008) ou na melhoria de índices zootécnicos (VENKAT et al., 2004).

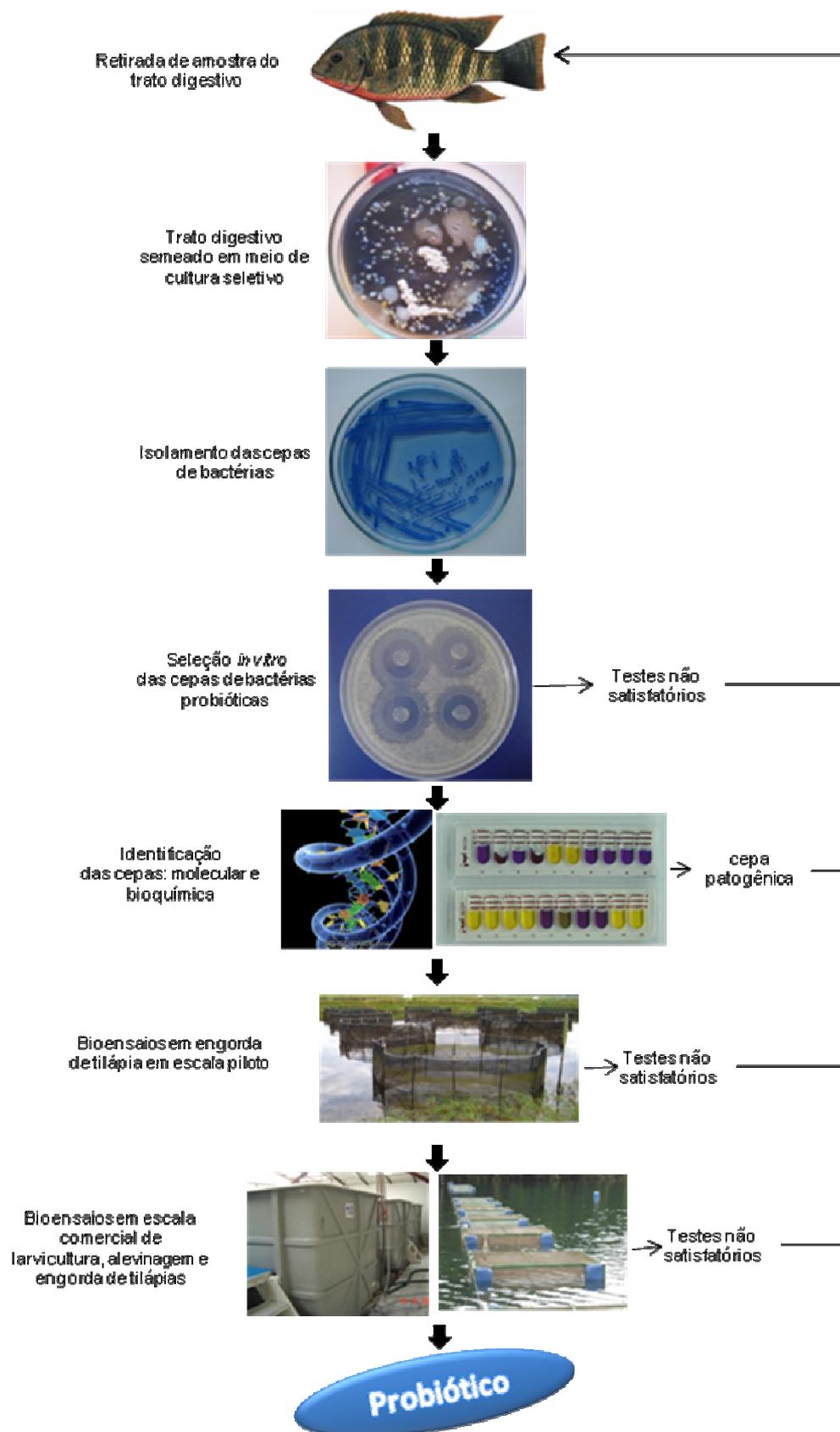


Figura 1. Isolamento e seleção de bactérias probióticas do trato de tilápias (adaptado de VIEIRA, 2006).

Uso de Probióticos na Aqüicultura

A utilização de probióticos vem crescendo rapidamente na aqüicultura, inúmeros trabalhos tentam demonstrar seus efeitos benéficos, como a redução do uso de antibióticos pelos sistemas de produção aqüícolas. Griffith (1995) relatou que após a introdução do uso de probióticos na indústria camaroneira equatoriana houve redução em 94% na utilização de antibióticos, além de um incremento na produção de 35%.

Em camarões ressalta-se a melhora da sobrevivência, eficiência alimentar, parâmetros de qualidade de água para, *Penaeus monodon* (SHARIFF et al., 2001), *Penaeus vannamei* (WANG et al., 2005) e *Litopenaeus stylirostris* (CASTEX et al., 2008). Para tilápias, Lara-Flores et al. (2003), El-Haroun et al. (2006) e Wang et al. (2008) observaram resultados positivos para crescimento com a utilização de probióticos. Porém estes autores divergiram quanto a método de aplicação (água ou ração), além dos microorganismos e produtos utilizados como probióticos. Já Meurer et al. (2006) não observaram ganho em peso nem melhora no sistema imune de tilápias alimentadas com *Saccharomyces cerevisiae*. Suzer et al. (2008) também não observaram maior atividade enzimática e ganho em peso em *Sparus aurata* alimentados com *Lactobacillus* ssp.

Kesarcodi-Watson et al. (2008) acreditam que o sucesso na aplicação de probióticos na aqüicultura depende da maior compreensão da ecologia microbiana e da interação entre a cepa probiótica e seu hospedeiro. Carnevali et al. (2006) utilizaram *Lactobacillus* ssp. isolado de robalo europeu como probiótico desta espécie, resultando em maior ganho em peso, destacando a especificidade entre a bactéria e o hospedeiro. Jatobá et al. (2008) observaram alterações hematológicas como aumento no número de leucócitos e trombócitos em tilápias alimentadas com dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* isolado do mesmo peixe. Para camarões, Vieira et al. (2007) confirmaram o efeito probiótico da bactéria ácido-láctica B6 em larviculturas de *L. Vannamei* com aumento na sobrevivência. A cepa B6 foi identificada molecularmente como *L. plantarum* demonstrando seu efeito probiótico em juvenis de *L. vannamei* através da alteração da microbiota bacteriana e melhorando da resposta imune, frente infecção experimental por *Vibrio harveyi* (VIEIRA et al., 2008).

Entre os microorganismos utilizados como probióticos para peixes destacam-se as bactérias ácido-láticas que tem seus efeitos registrados em maturação, alevinos, juvenis e adultos, para diversas espécies (vide revisão de RINGO & GATESOUBE, 1998). Nos últimos anos diversos trabalhos demonstram sua capacidade de melhorar o sistema imune e desempenho zootécnico para uma única espécie cultivada (GILL & RUTHERFURD, 2001; NEWAJ-FYZUL et al., 2006; ALY et al., 2008; JATOBÁ et al., 2008; KUMAR et al., 2008). Porém, não conhecemos o efeito dos probióticos em sistemas integrados com mais de uma espécie, como nos policultivos de tilápias e camarões marinhos.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de probiótico (*Lactobacillus plantarum*) na dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em sistema de policultivo com camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) em relação a parâmetros zootécnicos, hematológicos e microbiota bacteriana do trato intestinal.

UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO EM SISTEMAS DE POLICULTIVO DE TILÁPIAS COM
CAMARÕES MARINHOS

Adolfo Jatobá^a, Felipe N. Vieira^a, Celso C. Buglione^a, José L.P. Mouriño^a, Bruno C. Silva^a,
Walter Q. Seiffter^a, Edemar R. Andreatta^a

^a Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal
de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis -SC, CEP:88062-601, Brasil.
fone: 554832313400, fax: 554832313434, e-mail: adjatoba@yahoo.com.br.

Artigo dentro das normas da revista *Aquaculture*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de probiótico (*Lactobacillus plantarum*) na dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em sistema de policultivo com camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) em relação a parâmetros zootécnicos, hematológicos e microbiota bacteriana do trato intestinal. Foram utilizados dez cercados de 20 m² dentro de um mesmo viveiro de terra escavada, estocados com 2 tilápias/m² (41,9 g) e 10 camarões/m² (2,3 g), totalizando 200 camarões e 40 tilápias por unidade experimental. As tilápias de 5 unidades experimentais foram alimentadas com ração comercial suplementada com *L. plantarum* e as demais unidades experimentais cercados com ração comercial sem probiótico (controle). Após 12 semanas de cultivo as tilápias que receberam a dieta suplementada com probiótico (*L. plantarum*) apresentaram valores 13,6%, 7,5% e 7,1% maiores ($p < 0,05$) para eficiência alimentar, produtividade e peso final, respectivamente. Nos animais alimentados com probiótico houve redução na população de bactérias totais no trato intestinal e aumento na população de bactérias ácido lácticas no trato intestinal de peixes e camarões. Nos camarões também houve diminuição na população de *Vibrio* ssp. A avaliação hematológica mostrou maior número de trombócitos e leucócitos nas tilápias que receberam a ração suplementada com probiótico, assim como o número de linfócitos na contagem diferencial de leucócitos. Não foram observadas diferenças significativas no título de aglutinação do soro e taxa de fagocitose. O *L. plantarum* utilizado neste trabalho colonizou o trato intestinal das tilápias e camarões, diminuindo a população de bactérias totais, aumentando o peso final e sua eficiência alimentar das tilápias.

Palavras chaves: 1. *Oreochromis niloticus*, 2. *Litopenaeus vannamei*, 3. hematologia, 4. microbiota bacteriana, 5. imunologia, 6. crescimento.

ABSTRACT

This work evaluated the effect of the probiotic supplementation (*Lactobacillus plantarum*) in fed of tilapias (*Oreochromis niloticus*) in policulture system with marine shrimps (*Litopenaeus vannamei*). Ten cages of 20 m² have been used inside one excavated pond, stored with 2 tilápias/m² (41,9g) and 10 camarões/m² (2,3g), in total 200 shrimps and 40 tilápias for experimental unit. Fish from 5 experimental units were fed with supplemented diet with *L. plantarum* and others cages experimental units with control diet. After 12 weeks culture tilapias that received probiotic diet (*L. plantarum*) showed values 13.6%, 7.5% and 7.1% greater ($p > 0,05$) of food efficiency, productivity and final weight, respectively. Fish supplemented with probiotic showed a reduction in the total bacteria population in the intestinal treatment and an addition in the population of acid lactic bacteria in the intestinal tract fish and shrimps. In the shrimps also had a reduction in the population of *Vibrio* ssp. The hematological evaluation was observed bigger number of trombocytes and leukocytes from tilapia that received the probiotic, as well as the number of lymphocytes in the distinguishing counting of the leukocytes. Significant differences in the antimicrobiana activity, heading of aglutinação and rate of fagocitose had not been observed.

The *Lactobacillus plantarum* used in this work colonized tilapia and shrimp intestinal tract, reduced total bacteria population, increased the tilapia final weight and its food efficiency.

Key words: 1. *Oreochromis niloticus*, 2. *Litopenaeus vannamei*, 3. hematology, 4. bacteria microbiota, 5. imunology, 6. growth.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas enfrentados pela carcinicultura são as enfermidades. Países como Taiwan (Tsai et al., 2000), Equador (Grimón, 2003), Tailândia (Flegel, 2006), China (Biao & Kaijin, 2007) e Brasil (Mello & Farias, 2007) já sofreram grandes perdas em suas produções. Para o controle de enfermidades vários recursos são utilizados, em especial, agentes químicos com funções antimicrobianas. Porém, o uso inapropriado destes antimicrobianos, em especial os antibióticos, provocam a seleção de cepas bacterianas patogênicas resistentes (Klaenhammer & Kullen, 1999), além de ser uma fonte de poluição ambiental (Boyd & Massaut, 1999). Leung & Tran (2000) sugerem que a solução para as enfermidades se baseia na prevenção. Jatobá et al. (2008) confirmaram a utilização de probióticos (*L. plantarum*) como importante medida preventiva para tilápias do Nilo.

Probiótico na aqüicultura é definido por Gatesoupe (1999) como “microorganismo vivo que ao ser ministrado coloniza o trato digestivo dos animais de cultivo com o objetivo de melhorar a saúde destes animais”. O interesse na utilização de bactérias ácido-láticas como probióticos se deve a sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas pela produção de compostos antibacterianos como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácido láctico e reuterim (Fuller, 1989). Robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*, L.) alimentado com dieta suplementada com *Lactobacillus* sp apresentaram melhora da resposta imunológica, além de melhor desempenho zootécnico (Carnevali et al., 2006). Vieira et al. (2007; 2008) demonstraram que o uso de *L. plantarum* isolada de *Litopenaeus vannamei* melhorou a resistência dos camarões a infecção por *Vibrio harveyi*.

Outra opção no combate às enfermidades é manter o equilíbrio entre todos os organismos e microorganismos do sistema de cultivo, incluindo os potencialmente patogênicos. Para manutenção deste equilíbrio há possibilidade da prática do policultivo de camarões marinhos com tilápias que tem a capacidade de melhorar a qualidade da água nos viveiros de cultivo estabelecendo controle sobre a proliferação de fitoplâncton, acúmulo de matéria orgânica e redução da prevalência de vírus (Grimón, 2003). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos dos probióticos em sistemas integrado com mais de uma espécie.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de probiótico (*Lactobacillus plantarum*) na dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em sistema de policultivo com camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) em relação a parâmetros zootécnicos, hematológicos e microbiota bacteriana do trato intestinal.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado na fazenda experimental Yakult da Universidade Federal de Santa Catarina, localizada no estuário do Itapocu no município de Barra do Sul (latitude 26°32' sul e longitude 48°39' oeste) entre fevereiro e abril de 2008.

Material Biológico

Os alevinos de tilápia do Nilo foram fornecidos pela Estação Piscicultura Acqua Sul, localizada no município de Ilhota, Santa Catarina. Os peixes com peso médio de $15,4 \pm 2,7$ g e estocados em tanques-rede de 1m^3 durante 34 dias até atingirem o peso médio de $41,9 \pm 10,3$ g. Os juvenis de camarões marinhos com peso médio de $2,3 \pm 0,4$ g eram provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC) estavam estocadas em sistema de berçário intensivo na fazenda experimental Yakult/UFSC. A cepa de bactéria probiótica utilizada foi o *L. plantarum* (CPQBA 227-08 DRM) identificada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrárias da Universidade Estadual de Campinas. Esta foi isolada do trato intestinal de tilápias, passando por uma série de testes *in vitro* e *in vivo* (Jatobá et al., 2008).

Preparo da dieta experimental

A ração foi aspergida com *L. plantarum* crescida em meio de cultura MRS, na concentração de 1×10^{11} unidade formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} , na proporção de 100 mL kg^{-1} de ração comercial (Guabi 32% de proteína bruta, extrusada). A mistura foi incubada durante 24h a 35°C em recipiente hermeticamente fechado. Após este período, a ração foi seca em estufa por 24h a 35°C . A ração do tratamento controle foi aspergida apenas com meio de cultura MRS estéril. Para a quantificação de bactérias ácido-lácticas na ração foram realizadas cinco diluições seriadas fator 1:10. As diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram semeadas em meio de cultura Agar MRS modificado (Ramirez et al., 2006). A contagem final de bactérias ácido-lácticas na ração suplementada com *L. plantarum* foi de 1×10^8 UFC g^{-1} .

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso. Foram utilizados dez cercados (20 m^2 de área) dentro de um mesmo viveiro de terra escavada da fazenda experimental Yakult /UFSC, e povoados com 10 camarões/ m^2 e 2 tilápias/ m^2 , totalizando 200 camarões e 40 tilápias por unidade experimental.

As unidades experimentais foram divididas em dois tratamentos com cinco repetições cada. No primeiro (probiótico) as tilápias foram alimentadas com ração comercial suplementada com *L. plantarum*. No segundo tratamento (controle), os peixes foram alimentados com a mesma ração comercial sem bactérias probióticas.

Manejo alimentar e parâmetros de qualidade de água

As tilápias foram alimentadas de 5% à 3,5% da biomassa ao dia sofrendo reduções quinzenais de 0,5%. A ração era oferecido quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00h), diariamente. Para os camarões não foi oferecido ração.

A temperatura e oxigênio dissolvido do fundo e superfície do viveiro foram mensurados três vezes ao dia (00:00, 05:00 e 17:00h). Quinzenalmente foi realizada uma coleta de água em

três pontos dentro do viveiro para detectar a presença de bactérias ácido-lácticas, mensura de salinidade e pH.

Avaliação dos índices zootécnicos

Foram realizadas biometrias quinzenais para avaliação do ganho em peso. No final do experimento foram avaliadas a sobrevivência, produtividade, peso final e eficiência alimentar.

Avaliação microbiológica

No final do experimento, foram dissecados o trato intestinal de um “pool” de 3 camarões e 3 tilápias, por unidade experimental. Os tratos foram macerados e diluídos serialmente em fator 1:10 em solução salina estéril 0,65%. As amostras de cada diluição foram semeadas em meio TSA, Agar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS), Agar Centrimide e Agar MRS, e incubados por 48h a 30°C, para contagem de bactérias totais, vibrionáceas, *Pseudomonas* e ácido-lácticas, respectivamente.

Hematologia

Cinco peixes por unidade experimental (25 por tratamento) foram anestesiados com benzocaína (50mg/L) e cerca de 1,0mL de sangue coletado para confecção de duplicatas de extensões sangüíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald (Rosenfeld, 1947), para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito (Goldenfarb et al., 1971), glicose (Accu-Chek Advantage 2 Roche) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para quantificar o número total de eritrócitos em hemocítômetro. Os números totais de trombócitos e leucócitos foram obtidos na extensão sangüínea pelo método indireto (Martins et al., 2004).

Título de aglutinação

Os títulos de aglutinação foram feitos segundo o método descrito por Yildirim et al. (2003), individualmente para as bactérias *Enterococcus durans* ATCC 19492 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para inativação das bactérias, as cepas de *E. durans* e de *P. aeruginosa*, foram ativadas e isoladas pela técnica de esgotamento em meio de cultura TSA, incubadas a 25°C durante 48 horas e preparadas segundo Klesius et al. (2000). As colônias foram inoculadas individualmente em meio de cultura caldo de cérebro-coração (BHI) e incubadas a 30°C durante 24 horas.

Após o crescimento das bactérias, as culturas foram acrescidas de formalina 3%, e incubadas a 30°C durante 24 horas sob agitação contínua para inativação e centrifugação a 1800 g por 30 minutos. O sobrenadante, contendo a formalina, foi descartado e o “pellet” ressuspense em solução salina estéril (SSE) a 0,65% de NaCl. Para confirmação da inocuidade do processo, 100 µL das culturas ressuspensas em solução salina foram semeadas em meio de cultura TSA e incubadas a 30°C por 72 horas. Não havendo crescimento de colônias, as suspensões foram usadas para os testes de aglutinação. A concentração das células inativadas utilizadas no teste foi de 0.8 no comprimento de onda de 550 nm (DO_{500nm}).

O teste de aglutinação foi feito com uma microplaca de 96 poços de fundo U, onde o soro foi diluído na proporção de 1:1 em solução tampão fosfato salino (PBS; 0,2M de Fosfato monobásico, 0,2M de Fosfato dibásico, 0,11M de Cloreto de Sódio, pH 7,4) no 1° poço (50 µL de solução PBS : 50 µL do soro), sendo diluído serialmente em fator 2 para os demais poços até o 12°. Depois disso, foram adicionados 50 µL da bactéria inativada em todos os poços. A microplaca foi incubada a 25°C durante 18 horas em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada com a observação de um “bottom” no fundo do poço a olho nu. O título aglutinante foi considerado como o recíproco da última diluição que apresentou aglutinação.

Atividade Fagocitária

A atividade fagocitária dos leucócitos foi adaptada segundo Cai et al. (2004). Após a coleta de sangue, 0,5 mL, formado por um “pool” de cinco peixes, de sangue foi transferido para um tubo de ensaio e adicionado de 0,25 mL de *E. durans* (1×10^6 UFC mL⁻¹ ressuspensão em SSE a 0,65% de NaCl). Os tubos foram armazenados na estufa a 28°C por 30 min. Uma alíquota de sangue foi retirada para confecção de duplicatas de extensões sangüíneas coradas com Giemsa/MayGrunwald (Rosenfeld, 1947). A taxa de fagocitose foi a relação entre o número leucócitos que fagocitaram dividido pelo número total de leucócitos.

Contagem total de hemócitos (THC)

Foram coletados um “pool” de 3 camarões por unidade experimental. A hemolinfa foi coletada do sinus ventral, com uma seringa de 1mL previamente resfriada para fixação em solução de 4% de formol-MAS (10 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7.0) para contagem total de hemócitos em hemocitômetro.

Análise Estatística

Os dados microbiológicos foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ e os dados de aglutinação em $\log_2(x+1)$. Todos os dados obtidos foram avaliados pela realização de um teste t com 5% significância.

RESULTADOS

Parâmetros de qualidade de água

A temperatura de fundo (24,2 – 29,9 °C), temperatura de superfície (24,0 – 30,3 °C), oxigênio dissolvido de fundo (2,3 – 6,1 mg/L), oxigênio de superfície (2,9 – 8,1 mg/L), pH (7,67 - 8,64) e salinidade (9 – 12 ‰) permaneceram dentro de limites aceitáveis. Não foi detectada presença de bactérias ácido-lácticas na água em todo o experimento.

Avaliação dos índices zootécnicos

Após as 12 semanas de cultivo, as tilápias do tratamento alimentado com dieta suplementada com *L. plantarum* obtiveram valores 13,6%, 7,5% e 7,1% superiores ($p < 0,05$) para eficiência alimentar, produtividade e peso final, respectivamente (Tabela 1). Contudo, não foram

observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos índices zootécnicos dos camarões entre os tratamentos (Tabela 1).

Avaliação microbiológica

Nas contagens bacterianas do trato intestinal, foram observados valores inferiores ($p < 0,05$) nas tilápias alimentadas com probiótico para bactérias totais e *Pseudomonas* ssp., e superiores para bactérias ácido-lácticas (Figura 1). No trato intestinal dos camarões alimentados com probiótico, houve redução ($p < 0,05$) na contagem de bactérias totais e vibrionáceas; e aumento da contagem de bactérias ácido-lácticas em relação aos camarões do controle. Não foi observada diferença para *Pseudomonas* ssp. (Figura 2).

Hematologia

As tilápias alimentadas com ração suplementada com probiótico apresentaram mais trombócitos, leucócitos e linfócitos ($p < 0,05$) (Tabela 2) circulantes em relação ao controle. Enquanto para glicose, hematócrito, eritrócitos, neutrófilos e monócitos não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2).

Título de aglutinação

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) no título de aglutinação entre o tratamento probiótico e o controle, com valores de $1,6 \pm 0,5$ e $1,4 \pm 0,5$, respectivamente.

Atividade fagocitária

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) na taxa de fagocitose entre o tratamento probiótico e o controle, com $4,3 \pm 1,2\%$ e $3,2 \pm 1,4\%$, respectivamente.

Contagem total de hemócitos (THC)

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) no THC dos camarões do tratamento probiótico e o controle, com 17000 ± 3000 e 15000 ± 2000 células/mm³, respectivamente.

Tabela 1. Peso final, sobrevivência, produtividade e eficiência alimentar de tilápias e camarões em sistema de policultivo alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* e controle.

		Peso final (g)	Sobrevivência (%)	Produtividade (kg/ha)	Eficiência Alimentar
Camarões	Controle	10,7 ± 0,6 ^{a*}	79,8 ± 5,5 ^a	850 ± 67,3 ^a	na
	Probiótico	10,5 ± 0,3 ^a	81,3 ± 5,0 ^a	853 ± 53,3 ^a	na
Tilápias	Controle	205,9 ± 34,6 ^a	97,7 ± 1,0 ^a	4.020 ± 250 ^b	0,66 ± 0,07 ^a
	Probiótico	220,4 ± 46,5 ^b	98,1 ± 1,0 ^a	4.330 ± 150 ^a	0,75 ± 0,03 ^b

Dados expressos em média±desvio padrão.

*Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no t-teste entre os tratamentos.

Na: não avaliado

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo em sistema de policultivo com camarão alimentadas com ração comercial (controle) e ração suplementada com *Lactobacillus plantarum* (probiótico).

Parâmetros hematológicos	Tratamento	
	Controle	Probiótico
Glicose (mg dL ⁻¹)	67,6 ± 8,5 ^{a*}	57,0 ± 11,8 ^a
Hematócrito (%)	28,4 ± 2,9 ^a	24,6 ± 2,8 ^a
Eritrócito (x10 ⁶ µL ⁻¹)	2,1 ± 0,5 ^a	1,8 ± 0,3 ^a
Trombócito (x10 ³ µL ⁻¹)	2,1 ± 0,6 ^b	5,1 ± 0,9 ^a
Leucócito (x10 ³ µL ⁻¹)	3,2 ± 1,2 ^b	6,3 ± 1,3 ^a
Linfócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	6,0 ± 1,4 ^b	8,6 ± 2,3 ^a
Neutrófilos (x10 ³ µL ⁻¹)	2,2 ± 0,9 ^a	1,3 ± 0,5 ^a
Monócitos (x10 ³ µL ⁻¹)	0,3 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,4 ^a

Dados expressos em média±desvio padrão.

*Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no t-teste entre os tratamentos

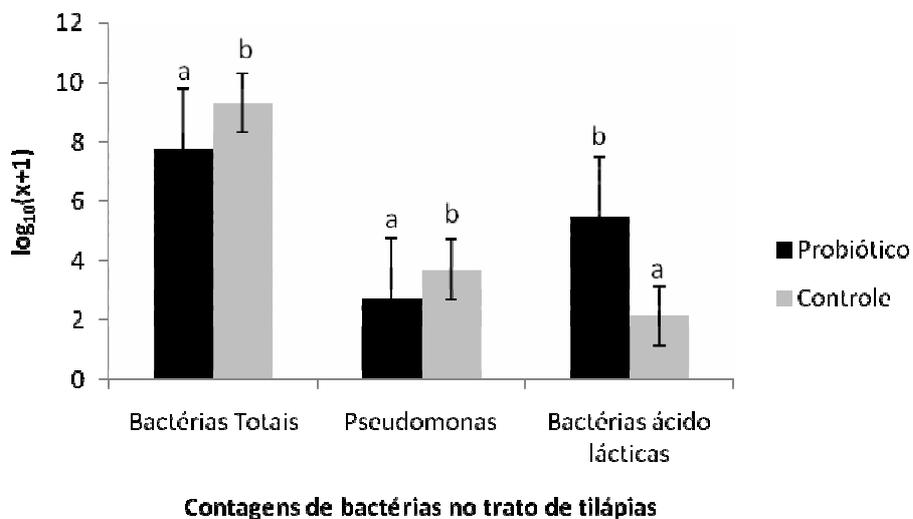


Figura 1. Contagens bacterianas do trato intestinal de tilápias do Nilo em sistema de policultivo com camarões alimentados com ração suplementada com *Lactobacillus plantarum* e controle. Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no t-teste entre os tratamentos.

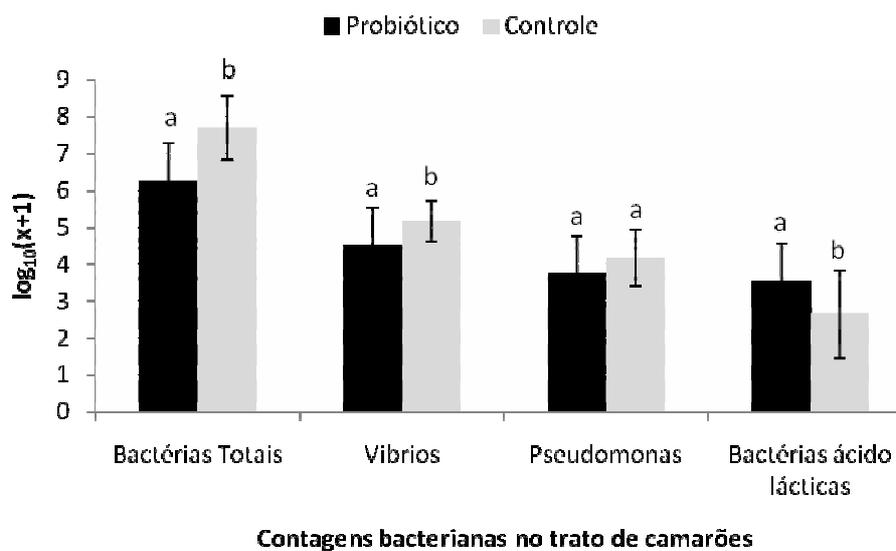


Figura 2. Contagens bacterianas no intestino dos camarões em sistema de policultivo com camarões alimentados com ração suplementada com *Lactobacillus plantarum* e controle. Diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no t-teste entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

A microbiota bacteriana intestinal de organismos aquáticos, ao contrário dos organismos terrestres, é constituída predominantemente por bactérias Gram negativas, podendo variar de acordo com o ambiente, escassez de algum nutriente ou pelo uso de bactérias probióticas (Gatesoupe, 2008).

Nas contagens bacterianas do trato intestinal dos camarões e tilápias alimentados com ração suplementada com probiótico houve redução nas bactérias totais, além da redução de *Vibrios* ssp. para os camarões e *Pseudomonas* ssp. para as tilápias. Isto pode estar relacionado com a capacidade das bactérias ácido-lácticas produzirem substâncias inibitórias (Vieira et al., 2007, Ramirez et al., 2006), tais como substâncias bactericidas de alto (bacteriocinas) e baixo peso molecular (reuterinas), ácido láctico, ácido acético e peróxido de hidrogênio (Fuller, 1989). Outro possível mecanismo de inibição pode ser a exclusão competitiva por espaço e nutrientes ou alteração do metabolismo microbiano no intestino (Gatesoupe, 2008).

As alterações na microbiota intestinal deste trabalho corroboraram com os resultados obtidos por Jatobá et al. (2008), utilizando a mesma cepa probiótica em tilápias. Além da alteração na microbiota bacteriana estes autores observaram melhora na resposta inespecífica das tilápias contra a infecção experimental com *Enterococcus durans*. Assim, a presença das bactérias ácido-lácticas no trato intestinal das tilápias alimentadas com probiótico sugere que os peixes podem estar mais imunocompetentes para combater uma enfermidade.

Apesar de não ter sido oferecido ração aos camarões no policultivo, no tratamento probiótico houve alteração na microbiota bacteriana intestinal dos camarões semelhante à encontrada por Vieira et al. (2008), observando acréscimo na população de bactérias ácido-lácticas na microbiota bacteriana intestinal. Este fato pode estar relacionado com o hábito detritívoro do camarão *Litopenaeus vannamei*. Como as bactérias ácido-lácticas não foram detectadas na água de cultivo, possivelmente se mantiveram viáveis nas fezes da tilápia, e foram consumidas pelos camarões. Demonstrando que neste sistema de cultivo integrado o *L. plantarum* pode atuar como probiótico para os camarões apesar de não ter sido oferecido aos mesmos de forma direta.

Chiu et al. (2007) e Vieira et al. (2008) utilizaram cepas de *L. plantarum* para *Litopenaeus vannamei* e observaram uma melhora na resposta imune frente a infecções com *V. harveyi*. A presença de bactérias ácido-lácticas no trato intestinal dos camarões sugere que os animais tratados com probiótico podem estar mais imunocompetentes, apesar de não ter sido observada diferenças significativas na sobrevivência dos camarões neste estudo. Estas sobrevivências foram boas para condições de cultivo normais, sugerindo a ausência de enfermidade durante o experimento.

A THC (contagem total de hemócitos) dos camarões não divergiu entre os tratamentos, corroborando com Vieira et al. (2008) que utilizou dieta suplementada com *L. plantarum* isolado de camarões. Estes autores não observou diferença no THC entre camarões não infectados alimentados com ou sem o probiótico.

A porcentagem de hematócrito, a glicose e eritrócitos não sofreram alterações entre os tratamentos. Os valores foram semelhantes aos relatados em tilápia por Welker et al. (2007) e Aly et al. (2008). Já Harikrishnan et al. (2003) observaram que peixes alimentados com *Azadirachta indica* apresentaram maior número de eritrócitos 30 dias após infecção com *Aeromonas hydrophila*.

Jatobá et al. (2008) em tilápias alimentadas com a mesma cepa probiótica e infectados com *Enterococcus durans*, Kumar et al. (2008) em *Labeo rohita* alimentado com *Bacillus subtilis* após uma infecção com *Aeromonas hydrophila* e Aly et al. (2008) em tilápias alimentados com dieta suplementadas com *Lactobacillus acidophilus* observaram incremento no número de monócitos. Diferentemente, neste trabalho não foi observado diferença no número de monócitos circulantes. Esta divergência pode estar relacionada com ausência de um desafio, como uma infecção experimental.

As contagens de trombócitos foram maiores nos peixes alimentados com probiótico. Além do seu papel de homeostasia, estas células têm relevante participação no mecanismo de defesa orgânica, demonstrada pela presença nos processos de coagulação e inflamação, além da atividade fagocitária durante infecções (Tavares-Dias, 2003).

Nas tilápias alimentadas com ração suplementada com probiótico observou-se um maior leucocitose e linfocitose. Assim, o probiótico pode ter induzido à uma maior produção ou liberação de linfócitos e trombócitos, fato que pode ser interessante para a resposta frente a infecções, já que estas células possuem funções importantes no sistema imunológico do animal (Secombes, 1996).

Mesmo sem entrar em contato com o sistema sangüíneo do hospedeiro, as bactérias ácido-lácticas podem interagir diretamente com as células imunes, através de células especializadas do epitélio do intestino como as células-M, induzindo sua ativação e multiplicação (Gill, 2003). Galdeano & Perdigon (2004) detectaram produtos do metabolismo das bactérias ácido-lácticas no interior de células-M e de células imunes do epitélio intestinal. Isto demonstra que os probióticos ou seus produtos podem acessar as células imunes do sistema intestinal, fazendo a comunicação com os leucócitos nos vasos sangüíneos, melhorando a resposta imunológica do animal (Delcenserie et al., 2008).

A modulação da resposta imune com bactérias probióticas tem demonstrado seus efeitos benéficos em mamíferos e peixes, com a proliferação de citocinas, estimulando atividade dos linfócitos NK (do inglês, "natural killer"), aumentando a produção de anticorpos, taxa de fagocitose e atividade da lisozima (Matsuzaki & Chin, 2000; Panigrahi et al., 2004). Wang et al. (2008) observaram aumento da taxa de fagocitose, atividade da lisozima e do "burst" respiratório em tilápias alimentadas com o probiótico, *E. faecium*. Diferentemente do observado neste trabalho, onde os animais tratados com probiótico (*L. plantarum*) não diferiram do controle quanto a taxa de fagocitose e título de aglutinação.

Meurer et al. (2006) e Suzer et al. (2008) não observaram incremento no ganho em peso para tilápias alimentadas durante 30 dias com *Saccharomyces cerevisiae* e *Sparus aurata* alimentados com *Lactobacillus* ssp., respectivamente. Já Lara-Flores et al. (2003) e Wang et al.

(2008) observaram melhora do desempenho zootécnico das tilápias resultante do uso de probióticos, porém divergiram quando o modo de aplicação do probiótico, na água e ração, repectivamente. Ambos utilizaram cepas isoladas de animais terrestres, diferentemente do realizado neste estudo dificultando comparações.

O maior crescimento e produtividade observado nos animais alimentados com probiótico pode estar relacionado com a melhor eficiência alimentar resultante da presença do *Lactobacillus plantarum* na dieta. Skrede et al. (2002) observaram melhora na digestibilidade do salmão do atlântico alimentado com *Lactobacillus* ssp.

Os melhores resultados zootécnicos obtidos com o *L. plantarum* isolados de tilápia são semelhantes aos obsevados por Carnevali et al. (2006) utilizando *Lactobacillus* ssp. isoladas do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) registrando maior ganho em peso. Isto, desmonstra o potencial zootécnico do probiótico utilizado. Este resultado foi associado com ao aumento na expressão de um gene do crescimento muscular nos animais tratados com probiótico, demonstrando a especificidade entre as bactérias probióticas e hospedeiro.

CONCLUSÕES

A suplementação de *L. plantarum* na dieta melhorou a microbioata bacteriana intestinal das tilápias do Nilo e camarões, aumentando o número de trombócitos, leucócitos e linfócitos circulantes nos peixes

O *L. plantarum* suplementado na dieta provocou maior ganho de peso e melhora na eficiência alimentar de tilápia do Nilo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Elpidio Beltrame (*in memorian*) por toda dedicação na elaboração deste projeto. A Guabi pelo fornecimento da ração para realização deste experimento. Ao laboratório Aqua Sul pelo fornecimento dos alevinos de tilápias. Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida e a Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS ARTIGO

Aly, S. M.; Ahmed, W. A.; Ghareeb, 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.

Biao, X. & Kaijin, Y. 2007. Shrimp farming in China: Operating characteristics, environmental impact and perspectives, *Ocean & Coastal Management*, 50, 538–550.

Boyd, C.E. & Massaut, L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture, *Aquaculture*, 20, 13-132.

Cai W-Q, Li S-F, Ma J-Y. 2004. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*, *Aquaculture*, 229, 79-87.

Carnevali, O.; Vivo, L.; Sulpizio, R.; Gioacchini, G.; Olivotto, I.; Silvi, S.; Cresci, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression, *Aquaculture*, 258, 430–438.

Chiu, C.; Guu, Y.; Liu, C.; Pan, T.; Cheng, W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 364-377.

Delcenserie, V.; Martel, D.; Lamoureux, M.; Amiot, J.; Boutin, Y.; Roy, D. 2008. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10, 37-54.

Flegel, T.W. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand, *Aquaculture*, 258, 1–33.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals, a review, *Journal. Appl. Bacteriol*, 66, 365–378.

Galdeano C.M. & Perdigón G. 2004. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 673–681.

Gatesoupe, F. J. 2008. Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments, *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, 14 (1), 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(5), 755–773.

Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosius, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination, *American Journal of Clinical Pathology*, 56, 35-39.

Grimón, R.O.R. 2003. “La tilapia y su efecto em La prevalência del vírus de La mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón”, Tesis de Grado (Magister em ciencias), Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil – Ecuador.

Harikrishnan, R.; Rani, M.N.; Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection, *Aquaculture*, 221, 41-50.

Jatobá, A.; Vieira, F.N.; Buglione, C.; Silva, B.C.; Mouriño, J.L.P.; Jerônimo, G.T.; Dotta, G.; Martins, M.L. 2008. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-donilo como probiótico Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43 (9), 1201-1207.

Klaenhammer, T.D. & Kullen, M.J. 1999. Selection and design of probiotics, *Internacional Journal Food Microbiology*, 50, 45– 57.

Klesius P.H., Shoemaker C.A.; Evans J.J. 2000. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture*, 188, 237-246.

Kumar, R.; Mukherjee S.C.; Ranjan, R.; Nayak, S.K. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*, *Fish & Shellfish Immunology*, 24, 168-172.

Lara-Flores, M.; Olvera-Novoa, M.A.; Guzman-Méndez, B.E.; López- Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture*, 216, 193–201.

Leung, P. & Tran, L. 2000. Predicting shrimp disease occurrence: artificial neural networks vs. logistic regression, *Aquaculture*, 187, 35-490.

Martins, M.L.; Pilarsky, F.; Onaka, E.M.; Nomura, D.T.; Fenerick Jr.; Ribeiro, K.; Myiazaki, D.M.Y.; Castro, M.P.; Malheiros, E.B. 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (*Osteichthyes: Cichlidae*) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 30, 71-80.

Matsuzaki, T. & Chin, J, 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.* 78, 67–73.

Mello, G.L. & Farias, A.P. 2007. Policultivo de tilápias e camarões marinhos, *Panorama da Aqüicultura*, 102, 42–47.

Meurer, F.; Hayashi, C.; Costa, M.M.; Mauerwerk, V.L.; Freccia, A. 2006. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nylo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. *R. Bras. Zootec.*, 35 (5), 1881-1886.

Panigrahi, A.; Kiron,V.; Kobayashi, T.; Puangkaew, J.; Satoh, S.; Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 102, 379–388.

Ramírez, C.; Bolívar, A.; Ciffoni, G.A.; Pancheniak, E.M.G.; Soccol, E.F.R.C. 2006. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico, *La Alimentación Latino Americana*, 264, 70-78.

Rosenfeld, G. 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, 20, 329-334.

Secombes C.J. 1996. The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. *In: Iwana G. & Nakanishi T. The Fish Immune System*. London: Academic Press, 63-105.

Skrede, G.; Storebakken, T.; Skrede A.; Sahlstrøm, S.; Sørensen, M.; Shearer, K.D.; Slinde, E. 2002. Lactic acid fermentation of wheat and barley whole meal flours improves digestibility of nutrients and energy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets *Aquaculture*, 210, 305–321.

Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H.O.; Saka, A.; Firat, K.; Otgucuođlu, Ö.; Küçüksari, H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities, *Aquaculture*, 280, 140–145.

Tavares-Dias M. 2003. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal.

Torrans, L. & F. Lowell. 1987. Effects of blue tilapia/channel catfish polyculture on production, food conversion, water quality and channel catfish off-flavor. *Proceedings of the Arkansas Academy of Science*, 41, 82-86,

Tsai, M.; Yu, H.; Tzeng, H.; Leu, J.; Chou, C.; Huang, C.; Wang, C.; Lin, J.; Kou, G.; Lo, C. 2000. Identification and Characterization of a Shrimp White Spot Syndrome Virus (WSSV) Gene That Encodes a Novel Chimeric Polypeptide of Cellular-Type Thymidine Kinase and Thymidylate Kinase, *Virology*, 277 (1), 100-110.

Vieiria, F.N.; Pedrotti, F.S.; Buglione, C.C.; Mouriño, J.L.P.; Beltrame, E.; Martins, M.L.; Ramires, 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 (4), 251-255.

Vieiria, F.N.; Buglione, C.C.; Mouriño, J.L.P.; Jatobá, A.; Ramires, C.; Martins, M.L.; Barracco, M.A.A.M.; Vinatea, L.A. 2008. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulation, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43 (6), 763-769.

Wang, Y.; Tian, Z.; Yao, J.; Li, W. 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response, *Aquaculture*, 277, 203-207.

Welker, T.L.; Lim, C.; Yildirim-Aksoy, M.; Klesius, P.H. 2007. Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin *Aquaculture* 262, 156–162.

Yildirim M., Lim C., Wan P.; Klesius P.H. 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid, *Aquaculture*, 219, 751-768.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ABDEL-TAWWAB M.; ABDEL-RAHMAN M. A., ISMAEL N.E.M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*, **Aquaculture**, v.280, p.185-189, 2008.
- ALAVANDI, S.V.; VIJAYAN, K.K.; SANTIAGO, T.C.; POORNIMA, M.; JITHENDRAN, K.P.; ALI, S.A.; RAJAN, J.J.S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, p.115-120, 2004.
- ALCORN, S.W.; MURRAY, A.L.; PASCHO, R.J. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Fish & Shellfish Immunol**, v.12, p.303-334, 2002.
- ALDRIDGE, D.C.; SALAZAR, M.; SERNA, A.; COCK, J. Density-dependent effects of a new invasive false mussel, *Mytilopsis trautwineana* (Tryon 1866), on shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), **aquaculture in Colombia**, **Aquaculture**, v.281, p.34-42, 2008.
- ALY, S. M.; AHMED, W. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. 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**, v.25, p.128-136, 2008.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annu Rev Fish Dis**, v.2, p.281-307, 1992.
- ANDRADE, T.P.D.; SRISUVA.F.J.; LIGHTNER, V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV), **Aquaculture**, v.264, p.9–15, 2007.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**, John Wiley & Sons, West Sussex, 364 p., 1987.
- AVENDAÑO R. E.; RIQUELME C. E. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae, **Aquaculture**, v.30, p.893-900, 1999.
- BALCÁZAR J. L.; DE BLAS I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ J.L. The role of probiotics in aquaculture, **Veterinary Microbiology**, v.114 p.173–186, 2006.
- BIAO, X.; KAIJIN, Y. Shrimp farming in China: Operating characteristics, environmental impact and perspectives, **Ocean & Coastal Management**, v.50, p.538–550, 2007.
- BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture, **Aquaculture**, v.20, p.13-132, 1999.
- CANDIDO, A.S.; MELO A.P.J.; COSTA O. R.; HENRIQUE COSTA J.M.S.; IGARASHI, M.A. Efeito de diferentes densidades na conversão alimentar da tilápia *Oreochromis niloticus* com o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema de policultivo, **Revista Ciência Agrônômica**, v.36, n.3, p. 279-284, 2005.
- CARNEVALI, O.; VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression, **Aquaculture**, v.258, p.430–438, 2006.

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

COLLAZOS, M.E.; BARRIGA, C.; ORTEGA, E. Seasonal variations in the immune system of the cyprinid *Tinca tinca*. Phagocytic function. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.18, p.105-113, 1995.

DAVIS K.B.; GRIFFIN, B.R.; GRAY, W.L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* on *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, v.214, p.55-66, 2002.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the Cultivation of Lactobacilli, **J. Appl. Bact.**, v.23, p.130-135, 1960.

DRENNER, R.W., K.D. HAMBRIGHT, G.L. VINYARD, M. GOPHEN, Y U. POLLINGHES. Experimental study of size-selective phytoplankton grazing by a filter-feeding cichlid and cichlid's effects on plankton community structure, **American Society of Limnology and Oceanography** v.32, n.5, p.1138-1144, 1987.

DUNCAN, P.L.; KLESZIUS, P.H. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal Aquat Anim Health**, v8, p241-248, 1996.

EL-HAROON, R.E.; GODA, A.M.; CHOWDHURY, M.A.K. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) **Aquaculture Research**, v.37, p.1473-1480, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Roma:SOFIA, 2006, 180p.

FARZANFAR, A.; The use of probiotics in shrimp aquaculture, **Federation of European Microbiological Societies**, v.48, p.149-158, 2006.

FJALSTAD, K.T.; MOEN, T.; GOMEZ-RAYA, L. Prospects for the genetic technology in salmon breeding programmes, **Aquaculture Research** v.34, p.397-406, 2003.

FLEGEL, T.W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand, **Aquaculture**, v.258, p.1–33, 2006.

FULLER R., Probiotics in man and animals, a review, **J. Appl. Bacteriol**, v.66, p.365–378, 1989.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics: the Scientific Basis. Chapman & Hall, London, v. 232 p. 1 – 18, 1992.

GARBI, N.G. Stress and the innate defence system of salmonids. **Aquaculture News**, v.21, p25-26, 1996.

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

GATESOUBE, F. J. Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 14 (1), p.107-114, 2008.

GILL, H.S.; RUTHERFURD, K.J. Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) on leucocyte phagocytosis **Nutrition Research**,v.21, p.183–189, 2001.

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

GÓNGORA, C.M. Mecanismos de resistencia bacteriana ante la medicina actual McGraw-Hill, Barcelona, p. 456, 1998.

GRIFFITH, D.R.W. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: Lavens, P.; Jaspers, E.; Roelands, I., **Larvi '91 — fish and crustacean larviculture symposium**, Editors, European Aquaculture Society, Gent, p. 478 Special publication no. 24. 1995.

GRIMÓN, R.O.R. “**La tilapia y su efecto em La prevalência del vírus de La mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón**”, 2003, Tesis de Grado (Magister em ciencias), Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil – Ecuador, 2003.

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

HOOLE, D.; LEWIS, J.W.; SCHUWERACK, P.M.; CHAKRAVARTHY, C.; SHRIVE, A.K.; GREENHOU, G.H.. Inflammatory interaction in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. **Parasitology**, v.126, p.71-85, 2003.

IRIANTO A. & AUSTIN B., Probiotic in aquaculture, **Jornal of Fish Diseases**, v. 25, p. 640, 2002

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43 (9), p.1201-1207, 2008.

KADIR, A.; WAHAB M.A.; MILSTEIN, A.; HOSSAIN, M.A.; SERAJI, M.T.I. Effects of silver carp and the small indigenous fish mola *Amblypharyngodon mola* and punti *Puntius sophore* on fish polyculture production, **Aquaculture**, v.273, p.520–531, 2007.

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

KLAENHAMMER, T.D.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics, **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 50, p. 45– 57, 1999.

KUMAR, R.; MUKHERJEE S.C.; RANJAN, R.; NAYAK, S.K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*; **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p.168-172, 2008.

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

LATEGAN M.J.; BOOTH, W.; SHIMMON, R; GIBSON, L.F. An inhibitory substance produced by *Aeromonas media* A199, an aquatic probiotic, **Aquaculture**, v.254, p.115–124, 2006.

LÉSEL, R. Thermal effect on bacterial flora in the gut of rainbow trout and African catfish. In: Lésel, R. _Ed., Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam, pp. 33–38. 1990.

LEUNG, P.; TRAN, L. Predicting shrimp disease occurrence: artificial neural networks vs. logistic regression. **Aquaculture**, v 187 p.35-49, 2000.

LEVENTER, H. Biological control of reservoirs by fish, **Bamidgeh**, v.33, p3-33, 1981.

LI, J.; TAN, B.; MAI, K.; AI, Q.; ZHANG, W.; XU, W.; LIUFU, Z.; MA, H.; **Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter XE-7* and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios**, **Aquaculture**, v.253, p.140-147, 2006.

LIGHTNER, D.V., PANTOJA, C.R. Infectious Myonecrosis (IMV): current status report on the biology of etiological agent and development of diagnostic methods. Feira Nacional do Camarão (FENACAM), 3–7 February 2004. Anais, Rio Grande do Norte, Brazil, p. 22, 2004.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods, **Aquaculture**, v.164, p.201–220, 1998.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, **Science**, v.147, p.747–748, 1965.

LIN, H.Z.; GUO, Z.; YANG, Y.; ZHENG, W.; LI, Z.J. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, **Aquaculture Research**, v.35, p.1441-1447, 2004.

LINDBERG, T., NYLANDER, A.. Strategic environmental assessment on shrimp farms in the southeast of Thailand. Swedish University of Agricultural Sciences, Minor Field Studies No.176. Uppsala, Sweden. 2001.

LIU, C.H.; CHEN, J.C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*, **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, p.321-34, 2004.

LUND, T.; GJEDREM, T.; BENTSEN, H.B.; EIDE, D.M.; LARSEN, H.J.S.; ROED, K.H. Genetic variation in immune parameters and associations to survival in Atlantic salmon, **Journal Fish Biol**, v.46, p.748-758, 1995.

MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. The concept of biological control methods in aquaculture, **Hydrobiologia**, v.358, p.285–290, 1997.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immunol**, v.20, p. 137–151, 2006.

MARQUES A.; THANH, T. H.; SORGELOOS P.; BOSSIER P. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of notobiotic Artemia against different pathogens, **Aquaculture**, v. 258, p.116-126, 2006.

MELLO, G.L.; FARIAS, A.P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos. **Panorama da Aqüicultura**, v. 102, p. 42 – 47, 2007.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; MAUERWERK, V.L.; FRECCIA, A. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35 (5), 1881-1886, 2006.

MOURIÑO, J.L.P; VINATEA, L.; BUGLIONE-NETO, C.; RAMIREZ, C.T.; VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.; MARTINS, M.L.; DERNER, R.B.; AGUILAR, M.A.; BELTRAME, E. Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, **Brazilian Journal of Biology**, v.68(1), p.173-177, 2008.

MUANGKEOW B.; IKEJIMA K.; POWTONGSOOK, S.; YI, Y. Effects of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., stocking density on growth, nutrient conversion rate and economic return in integrated closed recirculation system, **Aquaculture**, v.269, p.363–376, 2007.

NEWAJ-FYZUL, A.; ADESIYUN, A.A.; MUTANI, A.; RAMSUBHAG, A.; BRUNT, J.; AUSTIN, B. Bacillus subtilis AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1699–1706, 2006.

NIKOSKELAINEN S.; BYLUND G.; LILIUS E-M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. **Dev Comp Immunol**, v.28, p.581-592, 2004.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Vet Immunol Immunopathol**, v.79, p.167-180, 2001.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Vet. Immunol. Immunopathol**, v.85, p.41–50, 2002.

PADILHA, P.J.M. Efeito da utilização de probiótico sobre aspectos microbiológicos e parâmetros de qualidade da água e produtividade aquática em viveiros de cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), 2005, Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G.A.; PANCHENIAK, E.M.G.; SOCCOL, E.F.R.C. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v.264, p.70-78, 2006.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: **Sanidade de Organismos Aquáticos** / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

RINGO, E.; STROM, E. Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. **Aquacult. Fish. Manage**, v.25, p.623–629, 1994.

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

ROBERTSON, P.A.W.; CALDERON, J.; CARRERA, L.; STARK, J.R.; ZHERDMANT, M.; AUSTIN, B. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae, **Dis Aquat Org**, v.32, p.151–155, 1998.

ROSENBERRY, R. World Shrimp Farming., 1998. Annual Report, Shrimp News International, 1998.

ROUSE, D. B.; EL NAGGARA, G.O.; MULLA, M.A. Effects of Stocking Size and Density of Tilapia on *Macrobrachium rosenbergii* in Polyculture, **Journal of the World Aquaculture Society**, v.18, p.2, 1987.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture** v.172, p.63–92, 1999.

SAKATA, T., 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish. In: Lésel, R._Ed..., Microbiology in Poecilotherms. Elsevier, Amsterdam, pp. 171–176.

SERPUNIN, G.G.; LIKHATCHYOVA, O.A. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of reservoirs. **Acta Veterinária Brno**, Budapest, v.67, p.339-345, 1998.

SHARIFF, M.; YUSOFF, F.M.; DEVARAJA, T.N.; SRINIVASA RAO, P.S. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds, **Aquaculture Research**, v.32, p.181-187, 2001.

SOPINSKA, A. Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte pattern. III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. **Acta Ichthyol Piscat.**, Szczecin, v.15, p. 141-165, 1995.

SUZER, C.; ÇOBAN, D.; KAMACI, H.O.; SAKA, S.; FIRAT, K.; OTGUCUOĞLU, O.; KÜÇÜKSARI, H. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities, **Aquaculture**, v.280, p.140-145, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTO, C.D. Parâmetros hematológicos da Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **ARS veterinária**, Jaboticabal, v.14, n.3, p. 254-263, 1998.

TENDENCIA, E.A. Polyculture of green mussels, brown mussels and oysters with shrimp control luminous bacterial disease in a simulated culture system, **Aquaculture**, v.272, p.188-191, 2007.

TENDENCIA, E.A.; FERMIN, A.C.; PEÑA, M.R.; CHORESCA C.H. J Effect of *Epinephelus coioides*, *Chanos chanos*, and GIFT tilapia in polyculture with *Penaeus monodon* on the growth of the luminous bacteria *Vibrio harveyi*, **Aquaculture**, V.253, P. 48-56, 2006a.

TENDENCIA, E.A.; PEÑA, M.R.; CHORESCA C.H. J. Effect of shrimp biomass and feeding on the anti-*Vibrio harveyi* activity of *Tilapia* sp. in a simulated shrimp-tilapia polyculture system, **Aquaculture**, v.253, p.154-162, 2006b.

TIAN, X.; LI, S.; DONG, S.; YAN, X.; QI, Z.; LIU, G.; LU, J. An experimental study on closed-polyculture of penaeid shrimp with tilapia and constricted tagelus, **Aquaculture**, v.202, p.57-71, 2001.

TORRANS, L.,; F. LOWELL. Effects of blue tilapia/channel catfish polyculture on production, food conversion, water quality and channel catfish off-flavor. **Proceedings of the Arkansas Academy of Science**, v.41, p.82-86, 1987.

UDDIN, M.S.; FARZANA, A.; FATEMA, M.K.; AZIM, M.E.; WAHAB, M.A.; VERDEGEM, M.C.J. Technical evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) monoculture and tilapia-prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture in earthen ponds with or without substrates for periphyton development, **Aquaculture**, v.269, p.232-240, 2007.

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

VAZQUEZ, J.A.; GONZALEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish, **Aquaculture**, v.245, p.149-161, 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, p.501-507, 2004.

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

VIEIRIA, F. N. Avaliação do tempo de permanência de *Lactobacillus* B6 no trato intestinal de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e sua relação com a resposta imunológica,

2006, Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

VIEIRIA, F.N.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; BELTRAME, E.; MARTINS, M.L.; RAMIRES, C.; VINATEA, L.A. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*, **Brazilian Journal of Oceanography**, ed.55, v.4, p.251-255, 2007.

VIEIRIA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JATOBÁ, A.; RAMIRES, C.; MARTINS, M.L.; BARRACCO, M.A.A.M.; VINATEA, L.A. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulation, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43 (6), p. 763-769, 2008.

VIJAYAN, K. K.; BRIGHT SINGH, I. S.; JAYAPRAKASH, N. S.; ALAVANDI, S.V.; SOMNATH-PAI, S.; PREETHA, R.; RAJAN, J.J.S.; SANTIAGO, T.C. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems, **Aquaculture**, v.251, p.192-200, 2006.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of fish candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus, **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.145-152, 2004.

WANG J.; LI, D.; DONG, S.; WANG, K.; TIAN, X. Experimental studies on polyculture in closed shrimp ponds I. Intensive polyculture of Chinese shrimp (*Penaeus chinensis*) with tilapia hybrids, **Aquaculture**, v.163, p.11–27, 1998.

WANG, Y., Y. CUI, Y. YANG, Y F. CAI. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mosambicus* x *O. niloticus*, reared in seawater. **Aquaculture**, v.189, p.101-108, 2000.

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, p.1036–1041, 2005.

WANG, Y.; TIAN, Z.; YAO, J.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response, **Aquaculture**, v.277, p.203-207, 2008.

WELKER, T.L.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIOUS, P.H. Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin **Aquaculture**, v.262, p.156–162, 2007.

WYBAN, J.A.; SWINGLE, J.S.; SWEENEY, J.N.; PRUDER, G.D. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. **Aquaculture** p. 92, 1992.

ZAPATA, A.G.; VARAS, A.; TORROBA, M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. **Immunol Today**, v.13, p142-147, 1992.

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

ANEXO I



Figura 3. A: biometria; B: unidades experimentais; C: tilápias nos “ninhos”; D: coleta de camarões na despesca; E: Fazenda Yakult, em destaque viveiro utilizado; e F: camarões na despesca.