

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA NO CULTIVO DO CAMARÃO *Litopenaeus*  
*vannamei* E AÇÃO *in vitro* DO PROBIÓTICO *EM* – 4**

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

Orientadora: Cleide Rosana Vieira Batista, Ph. D

**SARA FABIANA BITTENCOURT DE AGUIAR**

**FLORIANÓPOLIS - SC**

2005

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA NO CULTIVO DO CAMARÃO *Litopenaeus*  
*vannamei* E AÇÃO *in vitro* DO PROBIÓTICO EM – 4**

Por

**Sara Fabiana Bittencourt de Aguiar**

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Cleide Rosana Vieira Batista

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Edemar Roberto Andreatta

Membro: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Elane Schindlew Prudêncio

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rubem de Abreu Machado

Coordenador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

Florianópolis, 30 de março de 2005.

*A DEUS POR SEMPRE ILUMINAR MEU CAMINHO.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me acompanhar e iluminar meu caminho, durante todas as etapas da minha vida.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação, professor Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna, pela confiança e ajuda em um momento difícil do curso.

À minha orientadora, professora Dra. Cleide Rosana Vieira Batista, pelo apoio, amizade e dedicação durante todo o Curso.

Ao professor Dr. Edegar Roberto Andreatta, que muito auxiliou a realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Walter e a todos os funcionários da Fazenda Experimental Yakult, que muito colaboraram para a realização desta pesquisa.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial ao secretário do Programa de Pós-Graduação, Sérgio de Souza pela prestatividade e atenção dispensada.

Ao amigo e colega de pesquisa, Paulo José Mendonça Padilha, companheiro de laboratório, pela ajuda e amizade.

Aos colegas e amigos de mestrado, Eliana, Márcia, Isabelle, Gisele, Renata, Hiliana, Murilo, Denys, Noel, Gelso, Pedro (monitor) pela amizade e alegrias compartilhadas.

Às amigas Viviane, Maristela, Karine, Márcia, Micheline, Mariela, Eliane, Sandra pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos que mesmo bem distantes serão sempre lembrados com muito carinho.

Ao Luciano, pelo amor e incentivo em todos os momentos difíceis desta caminhada, minhas vitórias também são suas.

À minha avó Maria José, pelo apoio, atenção e carinho dispensados, não tenho palavras para agradecer.

Aos meus pais Neuvan e Gabriela, por mais uma vez terem acreditado em mim, minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos Mellissa e Gabriel, e ao meu cunhado Rodrigo por sempre estarem presentes quando precisei de auxílio, obrigada pela torcida.

Ao meu sobrinho Alexandre, por ter nos presenteado com o seu nascimento.

Ao povo brasileiro que, através do CNPq, financiou este trabalho.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte de mais esta etapa da minha vida, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1 Aspectos nutricionais do camarão .....	12
2.2 Microbiota do Camarão .....	13
2.2.1 Decomposição microbiana dos crustáceos .....	14
2.2.2 O consumo de crustáceos e a saúde pública.....	15
2.3 A carcinicultura marinha .....	17
2.3.1 O ciclo produtivo .....	17
2.3.2 Camarão branco do pacífico ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	19
2.4 Probióticos .....	19
2.4.1 Utilização de probióticos na aquicultura .....	21
2.4.2 O probiótico EM 4.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.1 Água de cultivo.....	23
3.2 Monitoramento da água de cultivo e do camarão.....	24
3.2.1 Coleta das amostras de água e camarão.....	24
3.2.2 Ensaio microbiológicos da água de cultivo.....	24
3.2.2.1 Coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> .....	24
3.2.3 Ensaio microbiológicos do camarão .....	25
3.2.5 Análise Estatística .....	27
3.3 Eficácia do probiótico EM4 in vitro .....	27
3.3.1 Ativação do probiótico .....	27
3.3.2 Ensaio do probiótico inativado e ativado .....	28
3.3.3 Preparo do inóculo de <i>Escherichia coli</i> .....	28
3.3.4 Água de cultivo.....	29
3.3.5 Aplicação do probiótico em tanques experimentais sob três diferentes tratamentos .....	29
3.3.6 Monitoramento da eficácia do probiótico.....	30
3.3.7 Análise estatística .....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1 Monitoramento da água de cultivo e do camarão.....	31
4.1.1 Água de cultivo.....	31
4.1.2 Camarão <i>in natura</i> .....	34
4.2 Eficácia do probiótico EM4 in vitro .....	40
4.2.1 Monitoramento da eficácia do probiótico.....	40
4.2.2 Ensaio do probiótico comercial inativado e ativado.....	45
5 CONCLUSÕES .....	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
7 ANEXOS.....	57

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Resultado da média das contagens de microrganismos coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* de camarões coletados no tanque 2 da Fazenda Yakult durante as 4 coletas realizadas na safra 2004/1.....36
- Figura 2. Resultado da média das contagens de microrganismos coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* de camarões coletados no tanque 9 da Fazenda Yakult durante as 4 coletas realizadas na safra 2004/1.....36
- Figura 3. Resultado da média das contagens de microrganismos coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* de camarões coletados no tanque 11 da Fazenda Yakult durante as 4 coletas realizadas na safra 2004/1.....37
- Figura 4. Comparação entre as contagens médias em meio TSA dos tratamentos 1, 2 e 3 durante as 48 horas do monitoramento *in vitro* do probiótico.....44
- Figura 5. Comparação entre as contagens médias em meio EAM dos tratamentos 1, 2 e 3 durante as 48 horas do monitoramento *in vitro* do probiótico.....44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> da água de cultivo de camarões coletados no tanque 2 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.....	31
Tabela 2 – Resultados dos ensaios de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> da água de cultivo de camarões coletados no tanque 9 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.....	32
Tabela 3 – Resultados dos ensaios de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> da água de cultivo de camarões coletados no tanque 11 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.....	32
Tabela 4 – Médias dos resultados dos ensaios de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> de camarões coletados nos tanques 2, 9 e 11 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.....	35
Tabela 5. Comparação dos parâmetros microbiológicos utilizados na Tailândia SUWANSONTHICHAH (2003) e no Brasil (Resolução – RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, ANVISA/MS) com os resultados obtidos nos ensaios realizados no camarão.....	39
Tabela 6: Resultado da média das contagens em meios TSA e EAM do monitoramento no tratamento 1 (água de cultivo esterilizada + <i>E.coli</i> ).....	40
Tabela 7: Resultado da média das contagens em meios TSA e EAM do monitoramento no tratamento 2 (água de cultivo esterilizada + <i>E.coli</i> + probiótico).....	41
Tabela 8: Resultado da média das contagens em meios TSA e EAM do monitoramento no tratamento 3 (água de cultivo não esterilizada + <i>E.coli</i> + probiótico).....	42
Tabela 9. Resultados médios das análises realizadas no probiótico inativado e ativado.....	46
Tabela 10 – Resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e <i>Escherichia coli</i> da água de captação da Fazenda Yakult na safra 2004/1.....	58

## RESUMO

Neste trabalho, realizou-se o monitoramento da água de cultivo e do camarão da espécie *L.vannamei* provenientes da Fazenda experimental Yakult, Barra do Sul – SC e avaliou-se a eficácia *in vitro* do probiótico EM4 (Effective Microorganisms 4) utilizado na carcinicultura. Durante a safra 2004/1 (de fevereiro a junho de 2004), foram coletadas aleatoriamente de três tanques de cultivo amostras de água e camarão a cada 15 dias durante o ciclo de desenvolvimento do camarão. Nas amostras de água e camarão realizou-se os ensaios de coliformes 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*. Adicionalmente, somente às amostras de camarão realizou-se os ensaios de contagem padrão em placas de mesófilos, Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* sp e *Vibrio parahaemolyticus*. Segundo análise estatística ANOVA com nível de confiança de 95%, verificou-se que houve diferença significativa na microbiota da água de cultivo e do camarão durante as coletas. No entanto, na etapa de despesca o camarão e a água estavam dentro dos limites microbiológicos permitidos pela Resolução nº12, 2001 – ANVISA/MS e pela Resolução nº20, 1986 – CONAMA/MMA para o beneficiamento e cultivo, respectivamente. O probiótico foi avaliado para *Bacillus* sp, bactérias ácido-láticas, bolores e leveduras e contagem padrão em placas de mesófilos, em triplicata, segundo AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA, 2001). Resultados desse estudo, mostraram a presença de leveduras ( $9,1 \times 10^4$  UFC/mL) e bactérias ácido-láticas ( $6,9 \times 10^5$  UFC/mL). *Bacillus* sp não foi encontrado em nenhum dos ensaios realizados no probiótico. A eficácia do probiótico *in vitro* foi testada utilizando-se 3 tratamentos experimentais: (1) água esterilizada + *Escherichia coli*; (2) água esterilizada + *Escherichia coli* + solução de probiótico ativado e o (3) água não esterilizada + *Escherichia coli* + solução de probiótico ativado. Dos tratamentos foram retiradas alíquotas a cada 6 horas e plaqueadas em meio Agar Triptona de Soja (TSA) e Eosina Azul de Metileno (EAM). Segundo os resultados o tratamento 2 apresentou a melhor performance quanto à substituição do patógeno pelo probiótico e eliminação de *Escherichia coli*, devido principalmente a água ser esterilizada e não possuir a microbiota indígena competidora; no entanto, esta é uma situação experimental e não reflete a realidade do campo, pois alguns fatores que influenciam o desenvolvimento microbiano, como salinidade, temperatura, concentração de oxigênio e quantidade de matéria orgânica foram mantidas constantes durante o experimento *in vitro*. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa a nível de 5 % entre os tratamentos 1 e 3 durante todo o experimento nos dois meios de cultura (TSA e EAM) testados; e que houve diferença significativa a nível de 5% comparando-se os tratamentos 1 e 2; e 2 e 3.

Palavras-chaves: camarão, água de cultivo, microrganismos, probióticos.



## ABSTRACT

In this work, we evaluated the water's shrimp culture ponds and aquacultured shrimp specie *L.vannamei* from the experimental aquacultured farmed shrimp Yakult, in Barra do Sul - SC and the effectively *in vitro* of the probiotic *EM4* (Effective Microorganisms 4) used in the aquaculture was performed. During the culture period 2004/1 (from February to June of 2004), samples of water and shrimp were collected every 15 days during the cycle of development of the shrimp aleatory from three shrimp culture ponds. In the samples of water and shrimp was performed the analyses of coliforms 35°C, coliforms 45°C and *Escherichia coli*. In addition, only with the shrimp samples we performed the rehearsals of Total Plate Count, Coagulase positive staphylococcus, *Salmonella* sp and *Vibrio parahaemoliticus*. According with statistical analysis ANOVA with level of trust of 95%, was verified that there was significant difference in the microflora of the cultivation water between the shrimp culture ponds during this culture period. However, in the final stage the shrimp and the water were below the microbiology limits allowed by the Resolution n°12, 2001 - ANVISA /MS and for the Resolution n°20, 1986 - CONAMA/MMA for the processing and cultivation, respectively. The probiotic was evaluated for *Bacillus* sp, acid lactic bacteria, mold and yeasts and Total Plate Count, three times, in agreement to AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA, 2001). Results of that study, showed the presence of yeasts ( $9,1 \times 10^4$  CFU/mL) and acid lactic bacteria ( $6,9 \times 10^5$  CFU/mL). *Bacillus* sp was not found in none of the samples analysed in the probiotic. The effectively of the probiotic *in vitro* was performed using 3 experimental treatments: 1<sup>st</sup> sterilized water + *Escherichia coli*; 2<sup>nd</sup> sterilized water + *Escherichia coli* + solution of activated probiotic and 3<sup>rd</sup> not sterilized water + *Escherichia coli* + solution of activated probiotic. From the treatments were retired aliquots every 6 hours and analysed in Trypton Soy Agar (TSA) and Eosin Methylene blue agar (EAM). According to the results the best performance with relationship to the substitution of the pathogenic microorganism for the probiotic and elimination of *Escherichia coli* was in the treatment 2, owed mainly the water be sterilized and not permit to found the microbiotic indigenous competitor; however, this is an experimental situation and it doesn't reflect the reality of the field, because some factors that influence the microbial development, as salinity, temperature, concentration of oxygen and amount of organic matter were maintained constant during the period of this experiment *in vitro*. The statistical analysis demonstrated that there was not significant difference at level of 5% among the treatments 1 and 3 during whole the experiment in the two culture medias tested (TSA and EAM); and that there was significant difference at level of 5% being compared the treatments 1 and 2; and 2 and 3.

**KEYWORDS:** shrimp aquacultured, water's shrimp culture ponds, microorganisms, probiotics.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de camarões atingiu cerca de 3.835.000 toneladas em janeiro de 2004. Em janeiro de 2005 esta quantidade diminuiu para 3.015.000 toneladas. Deste total, a maior parte são produzidas em viveiros (ABCC, 2005).

Os maiores produtores são os países asiáticos, detendo 75% da produção, destacando-se a Tailândia, a Indonésia, a China, Vietnã e a Índia. Os restantes 25% correspondem ao continente americano, sobressaindo-se o Brasil, México e Equador, bem à frente de todos os demais países, seguido por Honduras, Colômbia e Panamá (BRASIL, 2004; ANDREATTA, comunicação pessoal).

No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão - ABCC, a produção total no País, em 2004, foi em torno de 80.000 toneladas, e uma estimativa para 2005 é que a produção atinja cerca de 105.000 toneladas. Esta produtividade demonstra a posição de destaque no ocidente que o Brasil se encontra (ABCC, 2005).

Para atingir o atual estágio de desenvolvimento da atividade no Brasil, ROCHA, 1998, relatou como sendo imprescindível e decisiva a introdução do *Litopenaeus vannamei*, cuja capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo contribuiu para elevá-la à condição de principal espécie da carcinicultura brasileira. Projetando-se o crescimento ocorrido nos últimos quatro anos para o ano de 2003, alcançar-se-ia uma produção estimada de 29.000t em 7.500ha. Com a ação conjunta do setor público e iniciativa privada pretende-se dar um grande impulso à carcinicultura marinha, estimando-se para 2003 uma produção nacional de 105.000t em 35.000ha de viveiros. Essa produção corresponde a uma receita da ordem de US\$ 577,5 milhões (BRASIL, 2003).

As doenças que acometem o camarão são causadas por bactérias, fungos, leveduras, vírus e parasitas que durante o ciclo de cultivo podem encontrar condições favoráveis para o seu desenvolvimento e multiplicação, alterando os aspectos físico-químicos e microbiológicos afetando a qualidade e rendimento do produto final (VALENTI, 1996).

Os produtos marinhos são mais perecíveis se comparados com outros tipos de alimentos. Estes sofrem mudanças no *flavor*, odor, textura e cor, reflexos direto do baixo frescor e decomposição causados primariamente pela atividade microbiana e compostos do metabolismo de bactérias presentes. Devido a estas características o pescado é um importante veículo de microrganismos patógenos, sendo um agente epidemiológico causador de toxiinfecções alimentares. O número e o tipo de microrganismo encontrado

nos produtos marinhos depende de diversos fatores como: o local de captura, a estação do ano, a temperatura, a salinidade da água, a quantidade de matéria orgânica e a qualidade da água. (APHA, 2001).

Os probióticos têm sido utilizados na aqüicultura como um estratégico controle de microrganismos. Há vários tipos de probióticos comercializados utilizados para manter a boa qualidade da água de tanques de cultivo e conseqüentemente do camarão. (DEVARAJA, *et al.*, 2002).

Muitos estudos relacionados com o efeito dos probióticos no cultivo de animais em cativeiro têm sido relatado e vários efeitos benéficos podem ser afirmados como: redução na mortalidade de pós-larvas, aumento da resistência contra doenças, habilidade dos probióticos em aderir-se e colonizar o trato gastrintestinal dos animais causando um efeito antagonista contra patógenos e o desenvolvimento de sistema imune não específico. (IRIANTO, 2002). No entanto, poucos estudos foram realizados em relação à eficácia na eliminação ou substituição dos microrganismos patogênicos presentes nos viveiros; e por este motivo, muitos probióticos são utilizados empiricamente.

O probiótico EM 4, começou a ser utilizado primeiramente nas fazendas camaroneiras da região lagunar e posteriormente nas fazendas do litoral norte do estado. No entanto, sua utilização foi até o momento empírica, pois nenhum teste de eficácia havia sido feito no produto (ANDREATTA, comunicação pessoal).

A falta de dados na literatura a respeito da microbiologia no cultivo do camarão nos leva a pesquisar os microrganismos tanto da microbiota natural como da microbiota contaminante patogênica ao homem. A utilização empírica de probióticos na carcinicultura também é um problema preocupante, tanto pela falta de dados de certos produtos utilizados como pelo não conhecimento da composição do insumo; uma questão que gera polêmica e controvérsias.

Frente a esta realidade, o presente trabalho teve como objetivo:

1) Monitorar a microbiota da água e do camarão *Litopenaeus vannamei* em tanques de cultivo da Fazenda Yakult em Barra do Sul – SC;

2) Avaliar o efeito *in vitro* do probiótico comercial utilizado no cultivo do camarão frente à *Escherichia coli*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos nutricionais do camarão

A composição da parte comestível dos crustáceos varia entre espécies e em média é de 76,0 a 80,0% de água, 16,1 a 16,4% de proteínas, 0,5% de carboidratos, e 1,7 a 2,1% de minerais (HEU, 2003; JAY, 1999; ICMSF, 1985). Porém, é comum muitas espécies de peixes, crustáceos e moluscos apresentarem baixo conteúdo de gordura e elevado de proteínas (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

O conteúdo de lipídios, variável com a espécie, é caracterizado por triglicerídios e fosfolipídios, apresentando cadeias grandes e insaturadas; quimicamente são muito lábeis e se oxidam facilmente durante o armazenamento. O conteúdo de carboidratos é praticamente desprezível, no entanto o de minerais é formado por elementos essenciais (ICMSF, 1985).

A gordura dos produtos marinhos, que é altamente insaturada, constitui uma excelente fonte calórica e não acarreta elevação dos níveis de colesterol sanguíneo humano. Entretanto, o elevado índice de insaturação a deixa suscetível à oxidação, podendo se tornar rapidamente rançosa, especialmente quando se elaboram produtos salgados ou secos. Isso não apenas diminui a qualidade, mas expõe os consumidores a riscos, devido ao teor de peróxidos resultante da deterioração dos lipídios (BEIRÃO, *et al.*;2001).

Geralmente, a cabeça e a casca são removidas durante o processamento o que leva a uma diminuição de peso de cerca de 50% do produto. Estudos dos componentes nutricionais presentes em cabeças, cascas e caudas dos camarões indicaram significativas quantidades de aminoácidos e proteínas além de cálcio, fósforo, sódio e magnésio (HEU, 2003).

O pescado apresenta em sua musculatura uma grande quantidade de compostos nitrogenados não protéicos, principalmente moléculas pequenas dissolvidas nos líquidos teciduais que são rapidamente utilizadas pelas bactérias durante a deterioração do pescado. A musculatura do pescado fresco é um excelente substrato para o desenvolvimento bacteriano, devido a sua alta atividade de água, pH neutro e alta quantidade de nutrientes solúveis (ICMSF, 1985).

## 2.2 Microbiota do Camarão

A carne e os órgãos internos de peixes e frutos do mar, recém capturado, são normalmente estéreis, no entanto na pele, guelras e vísceras encontram-se bactérias (ICMSF, 1985).

No entanto, a microbiota do pescado vivo depende da carga microbiana das águas onde ele habita. Conseqüentemente após a captura o processamento e armazenamento são essenciais para que não se propicie condições para o crescimento bacteriano, garantindo assim, um produto sem riscos a saúde pública (FRAZIER, 1993; JAY, 1999; ICMSF, 1985).

A microbiota natural dos crustáceos marinhos de águas temperadas é composta predominantemente de bacilos Gram-negativos, no caso dos camarões tropicais, a microbiota é composta por *Micrococos*, corineformes e bacilos Gram-negativos (ICMSF, 1985).

Os produtos marinhos tropicais e subtropicais contêm em sua microbiota natural *Pseudomonas* em número insignificante em relação à população total. Existem várias possíveis razões para a deterioração subsequente por *Pseudomonas*, as quais envolvem uma ou mais das seguintes: (1) tempo de geração mais curto do que os outros organismos, (2) reações antagonísticas ou sinérgicas, (3) habilidade de atacar moléculas de proteínas com alto peso molecular, e (4) atividade bioquímica (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

Segundo HUSS e colaboradores (2000) existem dois grupos relevantes de bactérias que contaminam os produtos marinhos: o primeiro grupo compreende as que estão presentes naturalmente no ambiente como *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *Listeria monocytogenes*; enquanto o segundo grupo aquelas presentes devido à contaminação de resíduos humanos como *Salmonella* sp, *Shigella* sp e *Escherichia coli* (*Enterobacteriaceas*).

A cocção pode não destruir todas as bactérias presentes e, portanto águas marinhas e salobras que se encontram contaminadas com resíduos fecais humanos e de animais, ou com microrganismos patógenos, como *V.cholerae* deve ter a pesca proibida (ICMSF, 1985).

VANDENBERGHE (2003) relatou que os *Vibrios* são os microrganismos mais importantes na aqüicultura, por infectarem organismos marinhos como crustáceos, várias espécies de peixes e moluscos. Algumas espécies de *Vibrios* sp, como o *Vibrio*

*alginoliticus* e *V. fluvialis* são caracterizadas como microrganismos naturais de meios marinhos e camarões (HOSSEINI, 2003).

O *Vibrio vulnificus* é um patógeno de origem marinha, com potencial invasor, podendo ser letal. Tem sido relacionado com feridas infeccionadas e responsável por incontáveis casos de gastroenterites e septicemia primária. Sua frequência em organismos marinhos é considerada alta, principalmente em moluscos (NASCIMENTO, 2001).

Em camarões, caranguejos, lagostas e pescados em geral, tem-se encontrado espécies dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Acaligenes* e *Proteus* (ICMSF, 1985; JAY, 1999).

HANNINEN (1996) e colaboradores constataram que espécies de *Aeromonas* spp. isoladas de produtos marinhos estariam relacionadas com sintomas de diarreias em humanos.

A transmissão de bactérias patogênicas de origem entérica, procedentes de águas residuais humanas ou animais via produtos marinhos, incluindo *Salmonella* sp, têm sido relatada. É possível afirmar, que sorotipos desta bactéria encontrados em águas poluídas sejam provenientes de humanos (ICMSF, 1985).

A pesquisa de coliformes a 45°C e *Escherichia coli* fornece com maior segurança, informações sobre suas condições higiênico-sanitárias e indicam a presença de enterobactérias possivelmente patogênicas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A Comissão do CODEX ALIMENTARIUS dispõe de uma revisão do Código de Práticas para Produtos Pesqueiros que inclui os produtos da aquicultura. O texto recomenda uma atenção especial no controle de agentes patogênicos biológicos, como as bactérias (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp.) e parasitas (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis* spp.), contaminantes químicos (metais pesados, pesticidas, reagentes químicos industriais) e resíduos de medicamentos veterinários (antibióticos, parasiticidas).

### **2.2.1 Decomposição microbiana dos crustáceos**

Diversos fatores podem influenciar na velocidade de decomposição do pescado, tais como: (1) número inicial de bactéria, (2) condições de armazenagem (temperatura, umidade e atmosfera gasosa), (3) tipo de pescado (certos produtos marinhos contêm altos níveis de osmorreguladores na forma de nitrogênio não protéico, por exemplo, aminoácidos, óxido de trimetilamina ou uréia, que estão prontamente disponíveis para a

bactéria, (4) temperatura da água de captura do pescado (diversos peixes e crustáceos são capturados em águas frias, portanto a microbiota não é efetivamente inibida pela refrigeração como é a microbiota normal de animais de sangue quente), (5) local e método de processamento (a bordo do navio ou barcos, *versus* planta industrial) (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

As proteínas de produtos marinhos sofrem uma pronunciada decomposição pela ação das bactérias, com formação de compostos tóxicos e com odor pútrido. O músculo do animal vivo ou recém abatido normalmente é estéril, mas um grande número de bactérias está presente. Quando o animal morre, as bactérias gradualmente penetram nos músculos. A decomposição é particularmente intensa quando o produto sai do *rigor mortis*, e as bactérias têm como substrato os produtos hidrolisados formados como resultado da autólise, ou seja, aminoácidos, óxido de trimetilamina, histídina, uréia, etc., que ocorrem no músculo (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

A alteração microbiana da carne dos crustáceos é um processo proteolítico (ICMSF, 1985). Devido à anatomia destes organismos, supõe-se que as alterações iniciam-se na superfície externa. Os crustáceos apresentam 300mg de nitrogênio/100g de carne, em aminoácidos livres e substâncias nitrogenadas voláteis, o que os torna muito sensíveis aos microrganismos deteriorantes (JAY, 1999).

CAPRA (1994) realizou análises bacteriológicas quantitativas da microbiota heterotrófica total e vibrionácea em 5 larviculturas de produção de camarões *Penaeus paulensis*, do Laboratório de Peneídeos da Barra da Lagoa - UFSC. Na água do cultivo e nas larvas ocorreu um aumento gradual de ambas as microbiotas bacterianas ao longo do ciclo produtivo.

## **2.2.2 O consumo de crustáceos e a saúde pública**

O perigo de transmissão de microrganismos e parasitas ao homem pode ocorrer a partir de produtos marinhos cultivados em condições artificiais (aquicultura), especialmente em sistemas que utilizam excrementos humanos e animais para alimentação de peixes, moluscos e crustáceos (ICMSF, 1985).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o camarão *in natura* pós-depesca. HOSSEINI (2003) e colaboradores verificaram a incidência de *Vibrio* spp. em camarões capturados na costa do Irã, onde foram identificadas as espécies *V. parahaemolyticus*, *V. dansela*, *V. alginolyticus*, e *V. fluvialis*.

Intoxicações alimentares causadas por *V. parahaemolyticus* são comuns em muitos países asiáticos devido ao alto consumo de alimentos marinhos. Em Taiwan, este patógeno é responsável por mais da metade dos surtos ocorridos anualmente, como constataram WONG (1999) e seus colaboradores; analisando amostras de alimentos marinhos importados de outros países asiáticos para Taiwan. No Japão e em outros países do sudeste da Ásia, onde têm-se um alto consumo de pescado cru, este patógeno é causa corrente de enfermidades (ICMSF, 1985).

Algumas cepas do gênero *Aeromonas* spp. presentes naturalmente no meio aquático, como por exemplo a *Aeromonas hydrophila* pode desencadear sintomas de diarreia em humanos, comprovando que moluscos, peixes e crustáceos podem ser veículos de intoxicação alimentar (HANNINEM, 1997).

NASCIMENTO (2001) isolou e identificou cepas de *Vibrio vulnificus* a partir de 20 amostras de camarão sete - barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, comercializados na feira de pescados de Mucuripe, Fortaleza - CE. De 29 cepas, isoladas de 20 amostras, sete (35%), originadas de diferentes amostras, foram confirmadas como *Vibrio vulnificus*, significando alta percentagem de amostras contaminadas.

HATHA (2003) e colaboradores analisaram a qualidade microbiológica de camarões rapidamente congelados inteiros e descabeçados, descascados e cozidos. E observaram que a quantidade de microrganismos foi significativamente maior nos camarões inteiros não cozidos.

A aplicação do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) na aqüicultura sofre uma influência relacionada com a necessidade de se cumprir os requisitos sanitários impostos pelos principais países importadores destes produtos. Restrições de organismos oficiais, que regulam o consumo e estão envolvidos com o controle sanitário de alimentos no Japão, devido a uma importação de crustáceos contaminados com resíduos de pesticidas, forçaram o governo da Tailândia, Indonésia e Filipinas, à aplicarem um novo sistema de controle de qualidade. As mesmas restrições também foram impostas pela Europa e Estados Unidos (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

Os problemas sanitários que afetam os produtos da aqüicultura, incluindo aqueles que interessam particularmente aos países em desenvolvimento, foram analisados pela FAO/OMS na Tailândia em julho de 1997 e, associados com contaminação biológica e química que podem ocorrer durante o cultivo destes animais. O grupo identificou e avaliou a quantificação dos perigos potenciais como controlar, na prática, com programas aplicados no âmbito nacional e internacional (LUPIN, 1999). As toxinfecções alimentares



provocadas por parasitas (trematódeos), bactérias patogênicas, resíduos de agrotóxicos, medicamentos veterinários e metais pesados foram os principais perigos identificados. As razões para a preocupação são diversas, incluindo as más práticas de cultivo, a poluição ambiental e os hábitos culturais tradicionais de preparação e consumo destes alimentos (BEIRÃO, *et al.*; 2001).

### **2.3 A carcinicultura marinha**

A carcinicultura marinha refere-se à produção de camarões marinhos mediante técnicas de aqüicultura, isto é, criação destes organismos em ambientes controlados, os quais, convencionalmente, são constituídos por tanques de terra (0,1 – 100 hectares) (ARANA, 1999).

Segundo ROCHA (1998) no Brasil a produção de camarão marinho foi iniciada na década de 70. No entanto, a carcinicultura começou a adquirir caráter técnico-empresarial no final da década de 80, onde as improvisações até então praticadas começaram a ceder espaço ao profissionalismo e ao planejamento baseados em fundamentos tecnológicos.

De acordo com MARCHIORI (1996) o Brasil é detentor de uma alta potencialidade para a produção de camarão marinho, isto ocorre devido ao clima propício e a uma costa marítima com 8.000Km de extensão.

Os números de produção comprovam a importância econômica do setor. Nos cinco primeiros meses de 2003, as exportações de camarão atingiram a cifra de US\$ 87 milhões, devendo chegar a US\$ 240 milhões ao final deste ano (AGROPACTO, 2003).

A carcinicultura em Santa Catarina teve início em 1983, com a instalação de várias fazendas de cultivo de camarão no estado, porém devido a falta de tecnologia de cultivo para as espécies nativas, muitas fazendas deixaram de funcionar. Para a viabilização da atividade de cultivo comercial de camarão marinho, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), foram responsáveis pela introdução da espécie exótica *Litopenaeus vannamei* trazida de países produtores localizados na orla do Pacífico (Equador, Peru, Panamá, etc.) (ANDREATTA, *et al.*, 1999).

#### **2.3.1 O ciclo produtivo**

O cultivo de camarões em viveiros é realizado em fazendas aquícolas situadas em regiões litorâneas. As fazendas camaroneiras são constituídas por tanques de terra com área entre 0,5 e 10 hectares, com profundidade entre 1,0 e 1,5m, e preenchidos com água salobra, doce ou salgada dependendo da espécie a ser cultivada (LCM, 2000).

O ciclo produtivo do camarão marinho é dividido em três etapas principais: maturação ou reprodução, larvicultura e engorda (CARVALHO, 2002)

As etapas de maturação e larvicultura ocorrem nos laboratórios de produção de larvas. Na maturação, machos e fêmeas são colocados juntos em tanques de concreto ou fibra de vidro, com água em temperatura constante e com alimentação rica em proteínas e ácidos graxos (ARANA, 1999; SAINT-BRISSON, 1999).

As larvas são obtidas de reprodutores sexualmente maduros (matrizes reprodutoras), a partir dos quais são obtidos ovos fertilizados, que, após a eclosão, transformam-se em náuplios. A este estágio, seguem-se os de protozoëia, mysis e pós-larva (CARVALHO, 2002; LCM, 2000).

Os camarões são cultivados durante toda sua fase larval até o estágio de pós-larvas com 20 dias (PL – 20) onde podem ser transferidas para os tanques de engorda. Nos viveiros, o número de camarões por área pode variar de 6 a 50 camarões por m<sup>2</sup>, de acordo com o sistema de cultivo adotado pela fazenda (LCM, 2000).

A engorda é subdividida em duas fases, o berçário, etapa intermediária entre a larvicultura e a engorda, e a engorda propriamente dita, onde os camarões são cultivados até que atinjam o tamanho para comercialização (CARVALHO, 2002). Durante 3 a 4 meses os camarões recebem alimento balanceado com 35% de proteína bruta e troca diária de água em proporções de 2 a 5%, com a finalidade de eliminar os resíduos orgânicos acumulados, melhorar as taxas de oxigênio dissolvido, (ARANA, 1999) reduzir os metabólitos do próprio camarão, repor componentes orgânico e traços de elementos e manter parâmetros físico-químicos semelhantes aos da água do mar (salinidade e temperatura) (SAINT-BRISSON, 1999).

. A despesca ao final do cultivo, deve ser realizada preferencialmente a noite. A quantidade de gelo programada é de 1,2 - 1,5kg de gelo para cada 1,0kg de camarão a ser despescado. Todo camarão deve ser retirado vivo do viveiro e colocado imediatamente em tanques (500 ou 1000L) com bastante gelo e água (choque-térmico), após os camarões devem ser limpos (RÊGO, 2003).

### 2.3.2 Camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

A espécie de camarão *L. vannamei* pertence ao Filo *Arthropoda*, Classe *Crustacea*, Ordem *Decapoda*, Família *Penaeidae* e Gênero *Penaeus*. Requer temperaturas na faixa de 24 a 32°C, podendo tolerar de 12 a 38°C. Apresentam grande tolerância às variações de salinidade; de 0 a 60%, embora prefiram salinidades na faixa de 25 a 35%. É tolerante ao manuseio, apresenta boa taxa de conversão alimentar e o nível protéico da ração não precisa ser elevado (20 a 25%) (SAINT-BRISSON, 1999). Apresentam boa sobrevivência e boa taxa de crescimento. Em 100 dias atingem 17g, no entanto são de larvicultura difíceis e susceptíveis ao ataque por bactérias. São nativos do Oceano Pacífico, ocorrendo naturalmente desde a costa do Peru até a Califórnia em profundidades que variam de 0 a 72 metros (ARANA, 1999).

Por ser uma espécie exótica, seu processo de adaptação, consolidação e disseminação, necessitou ser profundamente pesquisada, desde a produção de pós-larvas, tipo de ração a ser fornecida para este animal, e transformações dos processos tecnológicos envolvidos desde o manejo até o processamento do produto final (ANDREATTA, *et al.*, 1999).

Segundo o Laboratório de Camarão Marinho (LCM, 2000) da Universidade Federal de Santa Catarina, a espécie *L. vannamei* está sendo atualmente empregada para o cultivo intensivo em fazendas, pois esta apresenta uma melhor produtividade se comparado as espécies nativas. O LCM e a EPAGRI foram os responsáveis pela introdução do *L. vannamei* em Santa Catarina e através de suas pesquisas, ficou constatada a viabilidade econômica do cultivo da espécie em cativeiro.

De acordo com a Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC), em julho de 1997 foram catalogados 40 laboratórios de larvicultura em sete estados brasileiros (PI, CE, RN, PB, PE, BA e SC) (ABCC, 2004).

## 2.4 Probióticos

Para ser um probiótico a bactéria deve preencher requisitos como não ser patogêna, ser resistente ao ácido e a bile, aderir-se às células epiteliais, ser capaz de resistir por um tempo hábil no trato digestivo, produzir substâncias antimicrobianas, modular a resposta imune e resistir a processos tecnológicos industriais. Os microrganismos mais utilizados

como probióticos na indústria de alimentos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, outros microrganismos como *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium butyricum* e *Enterococcus faecium* também são de grande interesse (HEYMAN, 2002).

Os probióticos têm sido utilizados na aquicultura para controlar doenças, suplementar a alimentação e em alguns casos substituir a utilização de substâncias antimicrobianas principalmente antibióticos. Uma variedade de microalgas (*Tetraselmis*), leveduras (*Debaryomyces*, *Phaffia* e *Saccharomyces*), bactérias Gram-positivas (*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*) e bactérias Gram-negativas (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photorhodobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio*) têm sido estudadas e testadas como probióticos na aquicultura (IRIANTO, 2002).

Alguns produtos comerciais atribuem o nome probiótico a produtos para tratar o meio e não para suplementar a dieta dos animais. Esta extensão é pertinente visto que a microbiota gastrintestinal de peixes, moluscos e crustáceos é dependente do meio externo, devido à circulação de água por seu trato digestivo. Por outro lado, os probióticos administrados recebem termos relacionados a sua função como biocontrole, para o tratamento contra patógenos ou bioremediação para o tratamento qualidade da água (GATESOUBE, 1999).

Muitos estudos relacionados com o efeito dos probióticos no cultivo de animais em cativeiro têm sido relatados e vários efeitos benéficos podem ser afirmados como: redução na mortalidade de pós-larvas, aumento da resistência contra doenças, habilidade dos probióticos em aderir-se e colonizar o trato gastrintestinal dos animais causando um efeito antagonista contra patógenos e o desenvolvimento de sistema imune não específico (IRIANTO, 2002).

Existe a urgente necessidade de controlar a microbiota em viveiros para minimizar a utilização de agentes antimicrobianos. De fato, sabe-se que o uso de antibióticos pode gerar uma alteração desfavorável da microbiota, por isso a necessidade de um sistema efetivo de controle microbiológico (VERSCHUERE, *et al.*, 2000). Outra questão importante em relação ao uso de antibióticos é devido a constatação e o abuso da quantidade utilizada, que pode ser detectada e assim condenar o produto para comercialização em muitos mercados como Ásia, Europa e Estados Unidos. (ANDREATTA, comunicação pessoal).

### 2.4.1 Utilização de probióticos na aqüicultura

A aplicação de probióticos em aqüicultura têm sido um estratégico controle de microrganismos. Há vários tipos de probióticos comercializados utilizados para manter a boa qualidade da água de tanques de cultivo e conseqüentemente do camarão (DEVARAJA, *et al.*, 2002).

Durante a fase de engorda é utilizada uma mistura de antibióticos na ração. Muitas vezes esta mistura é incorporada numa dosagem exagerada e sem nenhum tipo de conhecimento quanto ao seu poder bactericida (ARANA, 1999).

DEVARAJA (2002) e colaboradores relataram que a aplicação de probióticos em tanques de cultivo, no entanto seu efeito benéfico e eficiência ainda não foram elucidados.

RENGIPIPAT (2000) relatou o isolamento de uma bactéria probiótica o *Bacillus* S11, que quando fornecido juntamente com a ração, reduzia a mortalidade do camarão *Penaeus monodon* quando este estava exposto a uma bactéria luminescente o *Vibrio harveyi*. Os estudos demonstraram a proteção probiótica, mas não relata sobre o mecanismo desta proteção e sobre a resposta defensiva dos crustáceos.

QUEIROZ & BOYD (1998) utilizaram preparações comerciais contendo *Bacillus* spp. em tanques de cultivo de camarão. Com este experimento, os autores verificaram a maior sobrevivência das larvas, o aumento da absorção de alimentos e a melhora no crescimento. Outra vantagem da utilização do probiótico foi o decréscimo de bactérias patogênicas no intestino dos animais.

CHUNTAPA (2003) e colaboradores utilizaram a alga *Spirulina platensis* para manter a qualidade da água de cultivo de camarões.

MAEDA (1994) e colaboradores relataram o uso de um probiótico comercial o PM4 (Probiotic Microorganism 4). O produto demonstrou atividade inibitória *in vitro* contra *Vibrio anguillarum* (inoculado para fins experimentais) e quando adicionado a tanques de cultivo de camarões, obteve-se uma maior sobrevivência das larvas (57%), enquanto que nos tanques sem o probiótico houve uma morte significativa das larvas.

Outros estudos demonstraram que as células de *Bacillus* sp têm uma atividade antibacteriana na prevenção de infecções por *vibrio* sp que é um dos maiores problemas no cultivo do camarão, e uma redução na quantidade de *vibrio* sp presentes (MORIARTY, 1998; VASEEHARAM & RAMASAMY, 2003).

Na Tailândia, cerca de 86% das fazendas de cultivo de camarão utilizam probióticos na água, no sedimento ou diretamente na ração. O microrganismo mais

utilizado para este fim é o *Bacillus* sp, pois quando adicionado diretamente na ração promove um aumento da resposta imune do camarão (GRASLUND, et al. 2003).

GARRIQUES & AREVALO (1995) relataram a utilização de *Vibrio alginolyticus*, inoculada diariamente em um tanque de pós-larvas de *L.vannamei*. Outro tanque recebeu doses profiláticas de oxytetraciclina e um outro foi designado como tanque controle. No tanque que recebeu doses de *Vibrio alginolyticus* não foi detectado a presença de *V.parahaemolyticus*, no entanto nos outros dois tanques, foi encontrado o microrganismo em aproximadamente 10% das amostras.

#### **2.4.2 O probiótico EM 4**

O probiótico comercial testado foi o *EM4* (Effective Microorganisms 4), uma mistura de culturas consistindo primariamente de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*) e bactérias fototróficas (*Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*). Este probiótico estava sendo utilizado empiricamente nas fazendas aquícolas camaroneiras das regiões de Laguna e Barra do Sul, litoral sul e norte de Santa Catarina respectivamente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Água de cultivo

Foi utilizado a água captada em profundidade de tanques de cultivo de camarão da Fazenda Yakult, Barra do Sul – SC durante todo o cultivo do camarão. Cada amostra era coletada em um frasco de vidro esterilizado, sendo coletados cerca de 1L de água de cultivo. As amostras de água foram coletadas por funcionários da fazenda e transportadas em caixas de isopor com gelo seco ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSC para realização dos ensaios.

##### 3.1.2 Camarão

Cada amostra era composta por 150g de camarão *Litopenaeus vannamei* capturados diretamente do tanque de cultivo da Fazenda Yakult, Barra do Sul – SC. O camarão foi analisado somente a partir do 3º mês de cultivo (5ª coleta de água, 1ª coleta do camarão), pois neste estágio o camarão apresentava o peso de 9g, pois ao início do cultivo o camarão encontrava-se com peso em torno de 3 a 4 g, portanto, seria inviável a coleta de 150g por amostra. As amostras de camarão foram coletadas por funcionários da fazenda em frascos de vidro esterilizado e transportadas em caixas de isopor com gelo seco ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSC para realização dos ensaios.

##### 3.1.3 EM 4 (Effective Microorganisms 4)

O probiótico comercial testado foi o EM4 (Effective Microorganisms 4), uma mistura de culturas consistindo primariamente de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*) e bactérias fototróficas (*Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*). O probiótico EM4 foi doado pela Fazenda Yakult.

##### 3.1.4 Material de Laboratório

Foram utilizados os equipamentos necessários para a realização dos ensaios de microbiologia de alimentos do laboratório de microbiologia do Departamento de Ciência e

Tecnologia de Alimentos da UFSC, como vidraria, autoclaves, estufas, homogenizadores, meios de cultura e reagentes necessários aos ensaios descritos na metodologia.

### **3.2 Monitoramento da água de cultivo e do camarão**

#### **3.2.1 Coleta das amostras de água e camarão**

Durante a primeira safra de cultivo de camarão (de fevereiro a junho de 2004), foram analisadas 24 (3 repetições x 8 coletas) amostras de água, e 12 (3 repetições x 4 coletas) amostras de camarão (*L.vannamei*) por tanque (Tanques 2,9 e 11), proveniente da Fazenda Experimental Yakult, localizada no município de Barra do Sul, litoral norte de Santa Catarina. As coletas foram realizadas a cada 2 semanas, durante o cultivo, sendo coletadas aleatoriamente em três diferentes áreas do tanque, sendo uma na área central do tanque (próximo ao aerador), e as outras duas nas extremidades (entrada e saída de água).

A água de cultivo do camarão nos três tanques foi analisada do início (povoamento) ao fim (despesca) do ciclo de cultivo.

#### **3.2.2 Ensaios microbiológicos da água de cultivo**

Nas amostras de água realizou-se os ensaios de coliformes 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* em atendimento à Resolução nº20, 1986 – CONAMA/MMA. Todos os ensaios foram realizados segundo metodologia oficial APHA (2001).

##### **3.2.2.1 Coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli***

Para a análise de coliformes 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* na água de cultivo foi realizado a técnica do Número Mais Provável (NMP), com 10 tubos de meio Lauril Sulfato Triptose (LST) dupla concentração e adicionado de 3% de NaCl. Aos tubos contendo o meio inoculou-se 10mL da água de cultivo e incubou-se a 35°C por 48 horas.

Selecionou-se todos os tubos com turvação e produção de gás, transferindo-se 0,1mL dos tubos positivos para tubos com Caldo Verde Brilhante (BVB) e para tubos de Caldo *Escherichia coli* (EC), incubando-se o BVB a 35°C por 48 horas e o EC em banho-maria a 45,5°C por 48 horas. Tubos com turvação e produção de gás no BVB e no EC foram quantificados de acordo com a tabela do Número Mais Provável (NMP). A partir



dos tubos de EC positivos, foi realizada a inoculação por esgotamento em placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EAM), incubando-se a 35°C por 48 horas. Colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas a série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila, Vogues Proskauer e Citrato (IMViC).

### 3.2.3 Ensaios microbiológicos do camarão

Nas amostras de camarão realizou-se os ensaios de Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* sp em atendimento à Resolução nº12, 2001 – ANVISA/MS. E adicionalmente foram realizados os ensaios de coliformes 35°C, coliformes a 45°C, *E. coli*, Contagem padrão em placa de mesófilos e *Vibrio parahaemolyticus*. Todos os ensaios foram realizados segundo metodologia oficial APHA, 2001.

Pesou-se 25g da amostra de camarão *in natura*, com casca e sem cefalotórax (cabeça), em condições assépticas, adicionou-se 225mL de água peptonada 0,1% e, posteriormente desintegrou-se em *Bagmixer*. A partir dessa diluição, efetuaram-se as demais diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) e as análises de Estafilococos coagulase positiva, Coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, *Escherichia coli* e contagem de mesófilos totais.

#### 3.2.3.1 Estafilococos coagulase positiva

Foram distribuídos 0,1mL de cada uma das três primeiras diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) na superfície de 3 placas de Ágar Baird Parker (BP) e incubadas a 35°C por 48 horas. Selecionaram-se três colônias típicas para os testes de catalase e coagulase. Para a interpretação de cálculo dos resultados, foram considerados como estafilococos coagulase positiva as culturas com reação típica. Quando a reação de coagulase era negativa, o resultado foi expresso como <100 UFC/g.

#### 3.2.3.2 Coliformes a 35° C, coliformes a 45 ° C e *Escherichia coli*

Foram distribuídos 1mL em cada tubo de uma série de três tubos para cada diluição contendo o meio Lauril Sulfato Triptose (LST) e incubou-se a 35°C por 48 horas. Selecionou-se todos os tubos com turvação e produção de gás, e procedeu-se conforme descrito no item 3.1.2.1.

### 3.2.3.3 Contagem padrão em placa de mesófilos

Foram distribuídos 1mL em cada placa de uma série de duas placas para cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) para a semeadura em profundidade. Ao inóculo, foi adicionado o meio fundido Agar para contagem padrão (PCA) com corante trifenil-tetrazolium (TTC) a 45°C, homogenizou-se, e após solidificação do meio as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o resultado foi expresso em UFC/g.

### 3.2.3.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Foram utilizadas 50g de amostra onde adicionou-se 450mL de água peptonada 0,1% suplementada com 3% de NaCl. Posteriormente desintegrou-se em *Bagmixer*. A partir dessa diluição efetuaram-se diluições decimais até  $10^{-3}$ , e inoculou-se 1mL em cada tubo de uma série de três tubos para cada diluição contendo água peptonada 0,1%, suplementada com 3% de NaCl, sendo incubado a 35°C por 48 horas. Os tubos com turvação e sem gás (tubos positivos) foram semeados por esgotamento em placas de Agar Tiosulfato Citrato Sacarose Sais Biliares (TCBS). As placas foram incubadas a 35°C por 24/48 horas e as colônias típicas foram submetidas à triagem bioquímica em Agar Ferro Três Açúcares (TSI), Agar Ferro Lisina (LIA) e Uréia, suplementados com 3% de NaCl.

### 3.2.3.5 *Salmonella* sp

Para o pré-enriquecimento no ensaio de *Salmonella* sp, pesou-se 25g da amostra, adicionou-se 225mL de água peptonada tamponada, desintegrou-se em *Bagmixer* e incubou-se 35°C por 48 horas.

Após o pré-enriquecimento, transferiu-se uma alíquota, simultaneamente, para o caldo tetrionato (TTB) e caldo Rappaport Vassiliadis (RV), incubando-se a 35°C e 42°C por 24 horas, respectivamente. A partir dos tubos de enriquecimento seletivo, foi realizada semeadura por esgotamento em placas de Agar Entérico de Hektoen (HEA), Agar Salmonella-Shigella (SSA) e Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), incubadas a 35°C por 24 horas. Colônias típicas de *Salmonella* sp foram submetidas a triagem bioquímica em Agar Ferro Três Açúcares (TSI), Agar Ferro Lisina (LIA) e Agar Uréia. Colônias suspeitas

de *Salmonella* sp foram submetidas a testes sorológicos e bioquímicos complementares: Dulcitol, Indol, Malonato, Vermelho de Metila e Vogues Prouker e Citrato.

### 3.2.5 Análise Estatística

Foi aplicado para a análise estatística dos resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* nas amostras de água de cultivo e camarão, o teste ANOVA, com nível de confiança de 95%.

### 3.3 Eficácia do probiótico *EM4 in vitro*

Para análise da eficácia do probiótico *EM4 in vitro* na água de cultivo de camarão, foram realizadas 3 etapas:

1ª etapa:

- Ativação do probiótico
- Ensaio do probiótico inativo e ativo
- Preparo do inóculo de *E.coli*
- Preparo das amostras de água de cultivo

2ª etapa:

- Aplicação do probiótico em tanques experimentais sob 3 diferentes tratamentos

3ª. etapa:

- Monitoramento da eficácia do probiótico através da pesquisa de *E.coli* e contagem de microrganismos viáveis.

#### 3.3.1 Ativação do probiótico

Para ativação seguiu-se as instruções do fabricante: dissolveu-se 0,5mL de melão em 3mL de água não-clorada quente (40 a 50°C) e após dissolução, adicionou-se mais 5,5mL de água não-clorada. Depois de verificar que a temperatura dessa água se encontrava abaixo de 40°C adicionou-se 1 mL de *EM4* e misturou-se bem. Em seguida, colocou-se essa mistura num recipiente para o fechamento hermético (frasco plástico) e propiciar a anaerobiose. Incubou-se por 48 horas a 35°C, até se verificar a formação de gás (estufamento do frasco).

### 3.3.2 Ensaio do probiótico inativado e ativado

Foram realizados os ensaios de *Bacillus* sp, bactérias ácido-láticas, bolores e leveduras e contagem padrão em placas do probiótico comercial inativado e ativado. Os ensaios foram realizados em triplicata segundo metodologia oficial (APHA, 2001).

#### 3.3.2.1 *Bacillus* sp

Para o ensaio de *Bacillus* sp, retirou-se a alíquota de 1mL de cada probiótico, procedeu-se a diluição seriada em água peptonada 0,1% estéril e inoculou-se 0,1mL em placas de meio CSA (Cereus Seletive Agar), sendo incubadas a 30°C por 48 horas.

#### 3.3.2.2 Contagem de bactérias ácido-láticas

Foram distribuídos 1mL em cada placa de uma série de duas placas para cada diluição seriada realizada para as análises anteriores. Ao inóculo, foi adicionado o meio fundido MRS a 45°C, homogenizou-se, e após solidificação do meio as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas em jarras de anaerobiose. Após incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o resultado foi expresso em UFC/g.

#### 3.3.2.3 Bolores e leveduras

A partir da diluição seriada realizada para análise de *Bacillus* sp, inoculou-se 0,1mL em placas de meio Agar Batata Dextrose (PDA), sendo incubadas a 25°C por 5 dias.

#### 3.3.2.4 Contagem padrão em placa de mesófilos

Foram distribuídos 1mL em cada placa de uma série de duas placas para cada diluição seriada realizada para as análises anteriores. Ao inóculo, foi adicionado o meio fundido PCA com TTC a 45°C, homogenizou-se, e após solidificação do meio as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o resultado foi expresso em UFC/g.

### 3.3.3 Preparo do inóculo de *Escherichia coli*

Reativou-se em Agar Nutriente (Oxoid®) uma cepa de *Escherichia coli* (35°C/24 horas) isolada da água de cultivo anteriormente. Com esta cepa, inoculou-se duas alçadas leves em água salina 0,85%, e com o auxílio da Escala Mac Farland determinou-se a concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Após fez-se 4 diluições em um tubo de água salina a 0,85% para a obtenção da concentração de aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL de *Escherichia coli*. Plaqueou-se em meio EAM para se comprovar a concentração de *E.coli*.

### 3.3.4 Água de cultivo

Foi utilizado a água captada em profundidade de um tanque de cultivo de camarão da Fazenda Experimental Yakult, Barra do Sul – SC ao fim do cultivo do camarão. Foram coletados 10L de água em frascos plásticos limpos e a metade desta quantidade foi esterilizada a 121°C/15 minutos em erlenmeyers.

### 3.3.5 Aplicação do probiótico em tanques experimentais sob três diferentes tratamentos

Segundo recomendações do fabricante, diluiu-se 1mL da mistura de probiótico ativado (água não-clorada, probiótico e melão) em 100mL de água de cultivo. Essa solução foi adicionada ao tanque experimental na quantidade utilizada no campo (0,05mL para 1000mL de água de cultivo). A solução de probiótico ativado foi inoculada na quantidade recomendada, a cada 24 horas nos tanques experimentais.

Foram realizados três diferentes tratamentos em laboratório:

- Tratamento 1 (controle): água de cultivo esterilizada e *Escherichia coli*;
- Tratamento 2: água de cultivo esterilizada + *Escherichia coli* + solução de probiótico ativado;
- Tratamento 3: água de cultivo não - esterilizada + *Escherichia coli* + solução de probiótico ativado.

Todos os tratamentos continham 1000mL de água de cultivo e a temperatura mantida a  $29 \pm 2^\circ\text{C}$ , em banho-maria calibrado. A quantidade de *Escherichia coli* inoculada foi 1mL em cada tratamento ( $10^4$  UFC/mL); e a quantidade de solução de probiótico ativado foi de 0,05mL a cada 24 horas como realizado no campo. O monitoramento foi realizado em triplicata.

### **3.3.6 Monitoramento da eficácia do probiótico**

As análises foram realizadas a cada 6 horas durante um período de 48 horas nos três tratamentos simultaneamente. Para verificar a recuperação microbiana de *Escherichia coli* e do probiótico, procedeu-se a retirada de alíquotas de 1mL de cada tratamento; realizou-se a diluição seriada em água peptonada 0,1% estéril e inoculou-se 0,1mL no meio Eosina Azul de Metileno – EAM (Oxoid®) e 0,1mL no meio Agar Triptona de Soja – TSA (Oxoid®) para a determinação do número de microrganismos.

### **3.3.7 Análise estatística**

Para a análise estatística dos resultados do comportamento de *Escherichia coli* frente ao probiótico, utilizou-se o teste ANOVA com nível de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Monitoramento da água de cultivo e do camarão

#### 4.1.1 Água de cultivo

Os resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* nas amostras de água dos três tanques de cultivo analisados, estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* da água de cultivo de camarões coletados no tanque 2 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.

Local/ Coletas	Coliformes a 35°C (NMP/100mL)			Coliformes a 45°C (NMP/100mL)			<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)		
	1*	2**	3***	1*	2**	3***	1*	2**	3***
1°	<1,1	<1,1	1,1	<1,1	<1,1	1,1	<1,1	<1,1	<1,1
2°	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
3°	2,2	<1,1	1,1	2,2	<1,1	1,1	2,2	<1,1	1,1
4°	<1,1	1,1	1,1	<1,1	1,1	1,1	<1,1	<1,1	1,1
5°	2,2	<1,1	1,1	2,2	<1,1	1,1	2,2	<1,1	1,1
6°	12	16,1	16,1	9,2	6,9	16,1	5,1	6,9	9,2
7°	16,1	23,0	>23,0	16,1	16,1	>23,0	16,1	16,1	>23,0
8°	12	12	12	5,1	5,1	5,1	<1,1	<1,1	<1,1

(\*) Entrada de água no tanque

(\*\*) Aerador

(\*\*\*) Comporta (saída de água)

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* da água de cultivo de camarões coletados no tanque 9 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.

Local/ Coletas	Coliformes a 35°C (NMP/100mL)			Coliformes a 45°C (NMP/100mL)			<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)		
	1*	2**	3***	1*	2**	3***	1*	2**	3***
1°	2,2	<1,1	2,2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
2°	2,2	5,1	1,1	2,2	1,1	1,1	2,2	1,1	<1,1
3°	2,2	<1,1	<1,1	2,2	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
4°	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1,1	<1,1	<1,1	<1,1
5°	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
6°	1,1	3,6	1,1	1,1	2,2	1,1	<1,1	<1,1	<1,1
7°	23,0	6,9	2,2	16,1	5,1	1,1	16,1	3,6	1,1
8°	12	12	12	6,9	6,9	6,9	<1,1	<1,1	<1,1

(\*) Entrada de água no tanque

(\*\*) Aerador

(\*\*\*) Comporta (saída de água)

Tabela 3 – Resultados dos ensaios de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* da água de cultivo de camarões coletados no tanque 11 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.

Local/ Coletas	Coliformes a 35°C (NMP/100mL)			Coliformes a 45°C (NMP/100mL)			<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)		
	1*	2**	3***	1*	2**	3***	1*	2**	3***
1°	2,2	1,1	<1,1	2,2	1,1	<1,1	2,2	1,1	<1,1
2°	>23,0	>23,0	>23,0	>23,0	>23,0	>23,0	>23,0	>23,0	>23,0
3°	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
4°	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
5°	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	1,1	<1,1	<1,1
6°	>23	>23	>23	>23	>23	>23	>23,0	>23,0	>23,0
7°	9,2	5,1	2,2	5,1	5,1	1,1	5,1	5,1	1,1
8°	6,9	6,9	6,9	3,6	3,6	3,6	<1,1	<1,1	<1,1

(\*) Entrada de água no tanque

(\*\*) Aerador

(\*\*\*) Comporta (saída de água)



De acordo com MIGET (1991) e APHA (2001) a microbiota da água de cultivo reflete diretamente a qualidade do produto cultivado no tanque. Esta afirmação condiz com os dados desta pesquisa, representados pela variação na quantidade de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* na água e no camarão durante o monitoramento.

Em relação à microbiota da água de cultivo de camarões durante a safra 2004/1 (de fevereiro a junho de 2004), houve um aumento com uma diferença significativa de coliformes a 45°C na 6ª e 7ª coletas no tanque 2, na 7ª coleta no tanque 9 e na 2ª e 6ª coletas no tanque 11, como apresentado nas tabelas 1, 2 e 3. Este significativo aumento, pode ter acontecido devido certas variáveis do ambiente, como períodos chuvosos, presença de pássaros e outros animais próximos ao tanque; temperatura da água; renovação da água e recirculação da água dos tanques. O aumento pode não ter ocorrido simultaneamente nos tanques de cultivo devido possivelmente à localização e a disposição dos tanques na fazenda e principalmente pela microbiota ser diferente quantitativamente em cada tanque.

Segundo Resolução nº20 de 18 de junho de 1986 - CONAMA/MMA, para a água de cultivo de organismos marinhos consumidos *in natura* é permitido o valor máximo de 14 NMP/100mL como padrão microbiológico para a análise de coliformes a 45°C. Este limite foi ultrapassado em determinados períodos durante o cultivo do camarão nos três tanques monitorados.

Durante a safra 2004/1 do cultivo de camarão, houve períodos onde a quantidade de coliformes a 45°C na água de cultivo ultrapassou o padrão microbiológico aceito, de 14 NMP/100mL e comparando-se com este padrão microbiológico determinado pela legislação brasileira para águas de cultivo de organismos marinhos comestíveis, das 72 amostras de água de cultivo, 11 (15,3%) amostras seriam reprovadas durante o período do monitoramento. No entanto, na etapa de retirada do camarão dos tanques (8ª coleta-despesca) o padrão microbiológico coliformes a 45°C, confirmou que a água de cultivo estava dentro dos padrões microbiológicos aceitos pelo CONAMA/MMA.

A presença do microrganismo patogênico *E.coli* na água em determinados períodos do cultivo, fez com que fossem avaliadas simultaneamente a qualidade microbiológica do estuário de captação (anexo 7.1), pois esta pode ser uma das fontes de *E.coli*. Constatou-se que a água do estuário continha uma quantidade semelhante de microrganismo *E.coli*. Portanto, a troca constante de água, renovação da água e a oscilação da temperatura da água, pode ser provavelmente uma das razões da queda na quantidade de coliformes a 45°C e *E.coli* durante o monitoramento.

Segundo análise estatística ANOVA, com nível de confiança de 95%, afirma-se que houve diferença significativa entre as contagens de microrganismos em relação às coletas (a cada 2 semanas) nos três tanques analisados quanto a coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli*.

#### 4.1.2 Camarão *in natura*

Nenhuma das 36 amostras de camarão analisadas apresentaram contaminação por *Salmonella* sp, Estafilococos Coagulase Positiva.

Embora não tenha sido detectado *Vibrio parahaemolyticus*, verificou-se a presença de *Vibrio* sp em TCBS. Pesquisa semelhante foi realizada por HOSSEINI (2003), que detectou a presença de *V.parahaemolyticus*, *V.dansela*, *V.alginolyticus* e *V.fluvialis* em camarões capturados na Costa do Irã.

As contagens padrões em placa de mesófilos oscilaram entre  $1,0 \times 10^2$  UFC/g e  $1,0 \times 10^4$  UFC/g, mostrando que estavam dentro dos padrões sugeridos por SUWANSONTHICHAI (2003) de no máximo  $1,0 \times 10^5$  UFC/g em camarões *in natura* tipo exportação e por METCALFE (2004) que determina o limite de no máximo  $1,0 \times 10^6$  UFC/g e em qualidade marginal entre  $1,0 \times 10^6$  e  $1,0 \times 10^7$  UFC/g.

As médias dos resultados de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* nas amostras de camarões coletados dos três tanques de cultivo analisados, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias\* dos resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* de camarões coletados nos tanques 2, 9 e 11 da Fazenda Yakult na safra 2004/1.

Tanque/ Coletas	Coliformes a 35°C (NMP/g)			Coliformes a 45°C (NMP/g)			<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)		
	2*	9*	11*	2*	9*	11*	2*	9*	11*
1 <sup>a</sup>	7,0	7,7	7,0	<3	14,3	<3	<3	<3	<3
2 <sup>a</sup>	24,3	5,7	43,3	4,3	1,3	10,7	1,3	<3	3,0
3 <sup>a</sup>	35,3	273,3	12,7	10	53,7	5,7	4,3	15,3	1,3
4 <sup>a</sup>	154,0	154,7	10,3	71	31,0	2,7	14,3	14,3	2,7

(\*) média de 3 repetições.

Em relação à quantidade de microrganismos durante a safra 2004/1 (de fevereiro a junho de 2004), houve um aumento de coliformes a 35°C na 2<sup>a</sup> coleta no tanque 11, na 3<sup>a</sup> coleta no tanque 9 e na 4<sup>a</sup> coleta no tanque 2, como apresentado nas figuras 1, 2 e 3. Na figura 4 uma comparação entre a quantidade de *E.coli* presente nos três tanques de cultivo analisados demonstra uma possível diferença de microbiota entre os tanques devido provavelmente a localização destes (próximo ou distante do estuário).

Este aumento pode ter acontecido devido certas variáveis do ambiente, como períodos chuvosos, presença de pássaros e outros animais próximos ao tanque; temperatura, renovação e recirculação da água dos tanques. O aumento pode não ter ocorrido simultaneamente nos tanques de cultivo devido à localização e a disposição dos tanques na fazenda e principalmente pela possibilidade de a microbiota ser diferente quantitativamente em cada tanque.

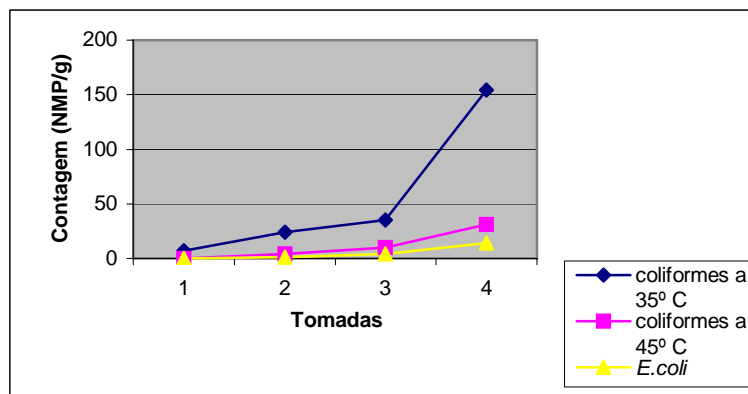


Figura 1. Resultado da média das contagens de microrganismos coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* de camarões coletados no tanque 2 da Fazenda Yakult durante as 4 coletas realizadas na safra 2004/1.

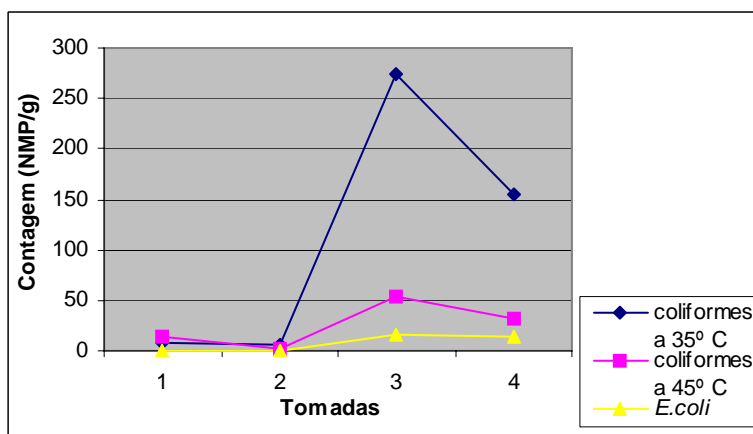


Figura 2. Resultado da média das contagens de microrganismos coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* de camarões coletados no tanque 9 da Fazenda Yakult durante as 4 coletas realizadas na safra 2004/1.

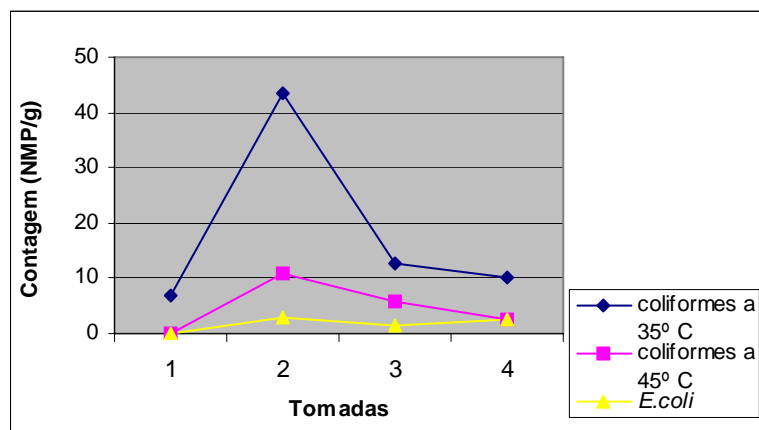


Figura 3. Resultado da média das contagens de microrganismos coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E.coli* de camarões coletados no tanque 11 da Fazenda Yakult durante as 4 coletas realizadas na safra 2004/1.

A quantidade de microrganismos coliformes a 45°C durante todo o ciclo de cultivo nos camarões *in natura* dos três tanques analisados, segundo os resultados apresentados não foi maior que 93 NMP/g. No entanto, foi detectado a presença de *Escherichia coli* em quantidades não superiores a 43 NMP/g no camarão *in natura*. Esta contaminação pode ter sido devido ao ambiente (ao ar livre) onde se encontram os tanques; ao metabolismo do próprio camarão; a presença de animais na fazenda; entre outros.

No caso da *Escherichia coli*, sua presença, tradicionalmente indicadora de contaminação por fezes humanas ou animais, nem sempre indicaria falta de cuidados higiênicos. Existem investigações que comprovam a possibilidade de contaminação do ambiente (tanques de cultivo) pelos animais que nele coabitam (aves, répteis e outros animais) e a sobrevivência por longo tempo destas bactérias neste ambiente (SANTOS, 2001).

Em relação aos resultados dos ensaios de *Escherichia coli*, foi encontrada uma ocorrência elevada a partir da 3ª coleta, no tanque 9 e a partir da 4ª coleta nos tanques 2 e 9 como apresenta a figura 4. Em estudo realizado por EYLES & DAVEY (1988), *Escherichia coli* foi encontrada em 43% do total de amostras de peixe, siri, camarão e carne de bivalves. Esta ocorrência concorda com os resultados encontrados no presente estudo.

SUWANSONTHICHA (2003) afirma que o padrão microbiológico para camarões tipo exportação na Tailândia é: contagem total de mesófilos  $<10^5$  UFC/g, coliformes  $<10^2$

NMP/g, *E.coli* <3 NMP/g, *Stapylococcus aureus* <50 UFC/g, *Bacillus cereus* <10<sup>2</sup> UFC/g, *Clostridium perfringens* ausência em 0,1g, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* sp ausência em 25 g. A legislação brasileira (Resolução – RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, ANVISA/MS) somente possui parâmetros microbiológicos para *Estafilococos* coagulase positiva (1,0 x 10<sup>3</sup> UFC/g) e para *Salmonella* sp (ausência em 25g).

Comparou-se os resultados obtidos nesta pesquisa com os padrões microbiológicos de SUWANSONTHICHAJ (2003) e da legislação brasileira, apresentado na Tabela 5, e constatou-se que dentre os ensaios realizados nas 36 amostras de camarão, somente em relação ao parâmetro microbiológico *E.coli* foram encontradas amostras reprovadas (30,6%), ou 11 das 36 analisadas.

Tabela 5. Comparação dos parâmetros microbiológicos utilizados na Tailândia SUWANSONTHICHAI (2003) e no Brasil (Resolução – RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, ANVISA/MS) com os resultados obtidos nos ensaios realizados no camarão.

<b>Parâmetro Microbiológico</b>	<b>Padrão aceito na Tailândia</b>	<b>Padrão aceito no Brasil</b>	<b>% de amostras reprovadas(*)</b>
Contagem padrão em placa de mesófilos	<10 <sup>5</sup> UFC/g	-	0
Coliformes a 45°C	<10 <sup>2</sup> NMP/g	-	0
<i>E.coli</i>	<3NMP/g	-	30,6
<i>S.aureus</i>	<50UFC/g	-	não analisado
Estafilococcus coagulase positiva	-	1,0 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	0
<i>B.cereus</i>	<10 <sup>2</sup> UFC/g	-	não analisado
<i>C.perfringens</i>	Ausência em 0,1g	-	não analisado
<i>V.parahaemolitycus</i>	Ausência em 25g	-	0
<i>Salmonella</i> sp	Ausência em 25g	Ausência em 25g	0

(\*) em relação ao padrão existente.

(-) Não existe padrão microbiológico.

Segundo BHASKAR e colaboradores (1998) e DALSGAARD (1998) a qualidade microbiológica é uma das principais causas de detenções e rejeições de camarão importado, motivo de suspensão de importações de certos países incriminados em camarões de qualidade duvidosa.

Alguns atributos de qualidade e inocuidade que afetam a comercialização do camarão são: valor nutritivo, presença de contaminação microbiana, tempo de armazenamento, sabor, resíduos de aditivos químicos (SO<sub>2</sub>), presença de metais pesados, resíduos de agrotóxicos (pesticidas) e medicamentos veterinários (antibióticos), alterações da coloração, tamanho, presença de corpos estranhos, odor e uniformidade, e o uso de certos tratamentos como a irradiação (CATO, 1998).

O manejo adequado durante os períodos de risco (como os períodos chuvosos e períodos de intensa presença de aves e animais silvestres) poderia minimizar esta oscilação da microbiota e a possível contaminação dos camarões.

Segundo análise estatística ANOVA, com nível de confiança de 95%, afirma-se que houve diferença significativa entre as contagens de microrganismos em relação às coletas

(a cada 2 semanas) nos três tanques analisados quanto a coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*.

## 4.2 Eficácia do probiótico *EM4 in vitro*

### 4.2.1 Monitoramento da eficácia do probiótico

O comportamento do probiótico comercial foi testado no intuito de verificar sua eficácia na utilização no cultivo de camarão. Os resultados desse estudo podem ser observados nas tabelas 6, 7 e 8. Comprovou-se que a quantidade inicial de *E.coli* foi de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL e que esta em todos os tratamentos aumentou em torno de um a dois ciclos logarítmicos durante as 48 horas do experimento.

Tabela 6: Resultado da média das contagens em meios TSA (Agar Triptona de Soja) e EAM (Eosina Azul de Metileno) do monitoramento no tratamento 1 (água de cultivo esterilizada + *E.coli*)

Meios/ Coletas*	TSA** (UFC/mL)	EAM** (UFC/mL)
1 <sup>a</sup>	$6,8 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$
2 <sup>a</sup>	$4,4 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$
3 <sup>a</sup>	$3,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
4 <sup>a</sup>	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
5 <sup>a</sup>	$4,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$
6 <sup>a</sup>	$3,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
7 <sup>a</sup>	$5,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$
8 <sup>a</sup>	$6,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$

\* coletas realizadas a cada 6 horas durante 48 horas.

\*\* médias de 3 repetições.

Neste tratamento, a microbiota era composta somente pelo microrganismo *E.coli*, visto que foi utilizada a água de cultivo esterilizada, ou seja, a água sem a presença da microbiota natural do tanque. Portanto, as contagens nos meios TSA e EAM estão próximas e equivalentes devido à presença de somente este microrganismo.



Tabela 7: Resultado da média das contagens em meios TSA (Agar Triptona de Soja) e EAM (Eosina Azul de Metileno) do monitoramento no tratamento 2 (água de cultivo esterilizada + *E.coli* + solução de probiótico ativado)

Meios/ Coletas*	TSA** (UFC/mL)	EAM** (UFC/mL)
1 <sup>a</sup>	$8,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$
2 <sup>a</sup>	$3,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
3 <sup>a</sup>	$5,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$
4 <sup>a</sup>	$3,4 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$
5 <sup>a</sup>	$4,4 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$
6 <sup>a</sup>	$2,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
7 <sup>a</sup>	$5,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
8 <sup>a</sup>	$1,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$

\* coletas realizadas a cada 6 horas durante 48 horas.

\*\* média de 3 repetições.

O tratamento 2 foi realizado para se fazer uma comparação com o tratamento 3 e assim verificar a eficácia do probiótico em relação ao microrganismo em estudo *E.coli* sem a presença da microbiota acompanhante do tanque, devido a utilização de água esterilizada para este experimento. Nota-se que as contagens nos meios TSA e EAM, a partir da 3<sup>a</sup> coleta são maiores se comparadas com o tratamento 3. No entanto, o aumento de 1 ciclo logarítmico com a adição do probiótico, não seria eficaz para eliminar ou substituir a microbiota naturalmente presente no tanque.

SUNG (2003) e colaboradores utilizaram quaternário de amônio, um detergente catiônico de nome comercial Timsen<sup>TM</sup> para verificar a redução na quantidade de bactérias heterotróficas e espécies de vibrios em tanques de cultivo de camarões *Penaeus monodon*. Os autores relataram uma diminuição de até 50% na quantidade de *Vibrio* sp; e afirmam que a atividade bactericida do Timsen<sup>TM</sup> só não foi maior devido principalmente a uma interação entre o quaternário de amônio e partículas suspensas de solo, compostos orgânicos e cátions ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) presentes na água salobra. Em relação ao probiótico *EM4*, nota-se que não houve uma ação comparável.

Tabela 8: Resultado das contagens em meios TSA (Agar Triptona de Soja) e EAM (Eosina Azul de Metileno) do monitoramento no tratamento 3 (água de cultivo não-esterilizada + *E.coli* + solução de probiótico ativado)

Meios/ Coletas*	TSA** (UFC/mL)	EAM** (UFC/mL)
1 <sup>a</sup>	$3,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$
2 <sup>a</sup>	$1,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$
3 <sup>a</sup>	$3,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$
4 <sup>a</sup>	$4,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
5 <sup>a</sup>	$5,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
6 <sup>a</sup>	$3,1 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$
7 <sup>a</sup>	$5,8 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$
8 <sup>a</sup>	$3,3 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$

\* coletas realizadas a cada 6 horas durante 48 horas.

\*\* média de 3 repetições.

O tratamento 3 é o mais próximo da realidade do campo, pois manteve-se a microbiota natural da água de cultivo, o que se pode verificar pelas contagens no meio TSA. No entanto, quando se analisa somente a quantidade de *E.coli* percebe-se uma discreta diminuição na quantidade deste microrganismo ao longo das 48 horas; portanto, seria necessário estudos futuros, inclusive com a aplicação deste no campo, para se concluir que o uso intensivo do probiótico no tanque é eficaz para gerar uma eliminação da microbiota patogênica (*E.coli*) presente.

A microbiota patogênica alterada neste estudo foi ínfima, visto que seria necessário ao menos a substituição de 4 a 5 ciclos da microbiota presente pelo probiótico, como demonstrado por DEVARAJA et al., 2002 que analisaram dois probióticos comerciais (Produto 1 contendo *Bacillus* sp e *Saccharomyces* sp e o Produto 2 contendo *Bacillus* sp, *Nitrosomonas* sp e *Nitrobacter* sp) e obtiveram resultados satisfatórios com a substituição da microbiota presente na água e no sedimento analisado. A contagem total de bactérias foi aumentando gradualmente no experimento *in vivo* sendo ao final do cultivo em torno de  $10^6$  UFC/mL. A espécie identificada e dominante na água e no sedimento foi o *Bacillus* sp nos tanques tratados com ambos os produtos (DEVARAJA et al., 2002).

RENGPIPAT e colaboradores (2000) promoveram a resposta imune de camarões (*Penaeus monodon*) tratados com um probiótico (*Bacillus* sp) isolado do próprio camarão em estudos anteriores (RENGPIPAT, et al., 1998a, b). O probiótico foi adicionado na ração do animal sendo a sobrevivência maior (54,3%) no tanque de camarões tratados, se

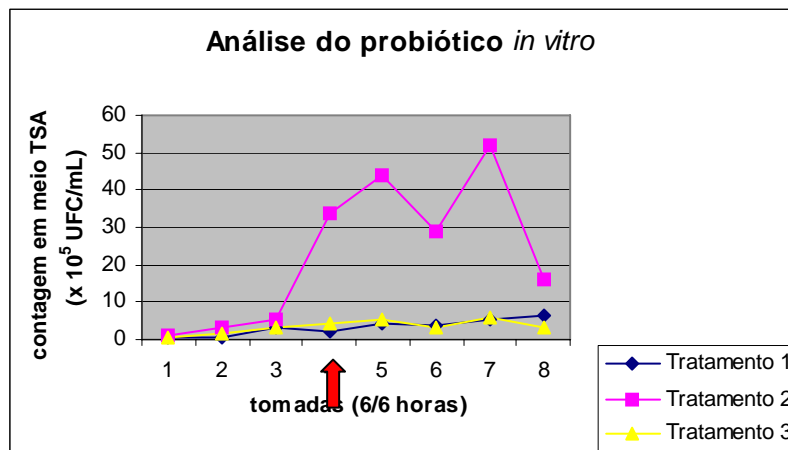
comparado com o tanque de camarões não-tratados (35,5%) frente ao microrganismo *Vibrio harveyi*.

A qualidade da água de cultivo não é afetada pela utilização de rações aditivadas com probióticos (RENGPIPAT, *et al.*,1998a), no entanto a saúde do camarão e seu sistema imunológico podem ser melhorados (AUSTIN, *et al.*,1992, 1995; RENGPIPAT, *et al.*,1998a, b; PHIANPHAK, *et al.*,1999).

Segundo RENGPIPAT, *et al.*1998b a aplicação de probióticos deveria ser feita nos estágios iniciais do cultivo para o ótimo aproveitamento da microbiota indígena presente. Assim, o probiótico pode se proliferar na água de cultivo promovendo um ambiente melhor para o camarão, pela redução no nível de certos patógenos na água de cultivo (MORIARTY, 1998).

Na figura 4 temos o comportamento do total de bactérias presentes nos três viveiros experimentais e uma comparação entre os tratamentos estudados.

Na figura 5 temos o comportamento do microrganismo *E.coli* inoculado nos três viveiros experimentais e uma comparação entre os tratamentos estudados.



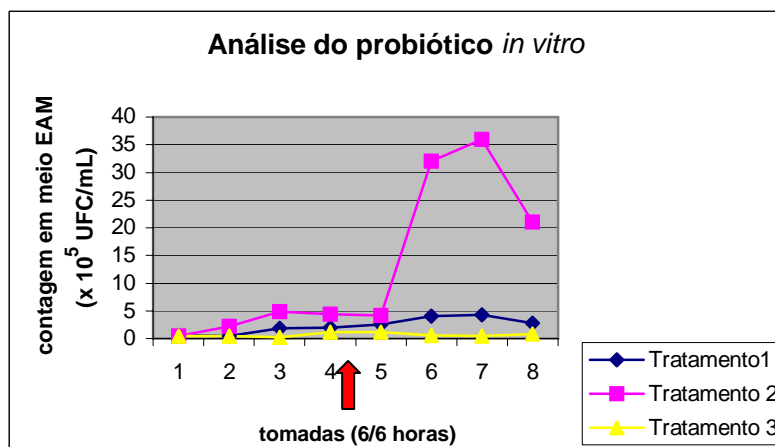
↑ Adição de probiótico.

Tratamento 1: água de cultivo esterilizada + *E.coli*

Tratamento 2: água de cultivo esterilizada + *E.coli* + probiótico

Tratamento 3: água de cultivo não esterilizada + *E.coli* + probiótico

Figura 4. Comparação entre as contagens médias em meio TSA dos tratamentos 1, 2 e 3 durante as 48 horas do monitoramento *in vitro* do probiótico.



↑ Adição de probiótico.

Tratamento 1: água de cultivo esterilizada + *E.coli*

Tratamento 2: água de cultivo esterilizada + *E.coli* + probiótico

Tratamento 3: água de cultivo não esterilizada + *E.coli* + probiótico

Figura 5. Comparação entre as contagens médias em meio EAM dos tratamentos 1, 2 e 3 durante as 48 horas do monitoramento *in vitro* do probiótico.

De acordo com as figuras 5 e 6 apresentadas, nota-se que não houve diferença significativa ao nível de 5% de confiança entre as contagens no tratamento 1 (controle sem probiótico) e no tratamento 3 (água do viveiro não-esterilizada + *E.coli* + probiótico). A partir da 3ª coleta houve diferença significativa ao nível de 5% entre os três tratamentos, nas contagens do meio TSA (figura 4) e após a 5ª coleta no meio EAM (figura 5). A partir desta 5ª coleta, também ocorreu uma discreta diminuição na quantidade de *E.coli* (figura 5) podendo-se suspeitar que ocorreu uma eliminação do microrganismo patogênico em detrimento do probiótico aplicado, visto que não houve variações na temperatura da água. No entanto, esta discreta suposta proliferação do probiótico não seria suficiente para a eliminação/substituição de uma quantidade de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL de *E.coli*, como a que estava presente.

No tratamento 2 ocorreu uma elevação de até 2 ciclos logarítmicos a partir da 3ª coleta, isto pode ter ocorrido devido a água ser esterilizada e não possuir a microbiota indígena, assim, os microrganismos inoculados (*E.coli* e o probiótico) ao início do experimento se proliferaram com maior facilidade por não terem competidores naturais, como ocorreu no tratamento 3. No entanto, esta é uma situação experimental e pode não refletir a realidade do campo, pois alguns fatores que influenciam o desenvolvimento microbiano, como salinidade, temperatura, concentração de oxigênio e quantidade de matéria orgânica (MORIARTY & BODY, 1995) foram mantidas constantes durante o experimento *in vitro*.

#### **4.2.2 Ensaio do probiótico comercial inativado e ativado**

Os resultados médios dos ensaios realizados no probiótico inativado e ativado estão apresentadas na Tabela 9. No probiótico ativado a quantidade de microrganismos elevou-se em torno de 1 a 2 ciclos logarítmicos se comparado com os mesmos ensaios realizados na forma inativada do probiótico. Estas quantidades de microrganismos são consideradas baixas se comparado com outros probióticos comerciais utilizados na aquicultura como o Baozyme – Aqua® que coloca a venda sachês de esporos de *Bacillus subtilis* com  $1,0 \times 10^8$  UFC/g (HONG, 2004) e o probiótico desenvolvido e testado por RENGPIPAT et al.; (2000) onde o inóculo inicial de *Bacillus* sp era de  $1,0 \times 10^{10}$  UFC/mL.

Tabela 9. Resultados médios\* das análises realizadas no probiótico inativado e ativado.

Análises	Probiótico inativado	Probiótico ativado
<i>Bacillus</i> sp (UFC/mL)	<100	<100
Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)	1,4 x 10 <sup>4</sup>	6,9 x 10 <sup>5</sup>
Bolores e leveduras (UFC/mL)	4,9 x 10 <sup>3</sup>	9,1 x 10 <sup>4</sup>
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	1,1 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>

\*médias de três repetições.

Em relação ao ensaio de *Bacillus* sp, as colônias encontradas no meio CSA eram de cor creme, opacas, pequenas, arredondadas e Gram positivas, suspeitando-se ser leveduras. Não havia colônias típicas de *Bacillus* sp. Em relação ao ensaio de bolores e leveduras, as colônias encontradas nas placas de PDA eram tipicamente leveduras: creme – brancas, opacas, pequenas, arredondadas e Gram positivas. A presença de bactérias ácido-láticas e leveduras confirmou a composição que o fabricante do probiótico havia descrito como sendo componentes do probiótico: bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*) e bactérias fototróficas (*Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*). Uma versão semelhante ao probiótico estudado EM4 é o citado por MAEDA & LIAO (1992), o PM4. Este probiótico também demonstrou ação inibitória *in vitro* contra o microrganismo *V. anguillarum*, ação que discretamente foi demonstrada pelo EM4 contra o microrganismo *E.coli* nesta pesquisa.

Segundo estudos sobre probióticos utilizados na aqüicultura, a composição deste pode variar desde bactérias isoladas do próprio hepatopâncreas do camarão (GULLIAN, 2004), até a mistura de cepas com ação bactericida e ou bacteriostática (HONG, 2004; DEVARAJARA, et al. 2000; GRASLUND, et al. 2003; VASEEHARAM & RAMASAMY, 2003).

HONG (2004) e colaboradores relataram a freqüente utilização de *Bacillus* sp e seus esporos em probióticos utilizados em diversos setores, desde a alimentação humana até a aqüicultura. Dentre os citados para a utilização em cultivos de camarão, pode-se citar o Baozyme – Aqua® (*Bacillus subtilis* cepas Wu-S e Wu-T a 1,0 x 10<sup>8</sup> UFC/g, *Lactobacillus* sp e *Sacharomyces* spp); o Biostart® (mistura de *Bacillus megaterium*, *B.licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa* e duas cepas de *B.subtilis*) (VERSCHUERE,

2000); o Licalife® (espécies não definidas de *Bacillus*) (GATESOUBE, 2000) e o Promarine® (4 diferentes cepas de *B.subtilis*) (UDARCI & PINCHUK, 2004).

A utilização de um inóculo maior de probiótico, ou a preparação do tanque antes do povoamento com o probiótico, como verificado em outros estudos poderia ser a solução para a utilização do probiótico, no entanto, estudos em relação ao custo benefício da utilização deveriam ser considerados. Outros trabalhos, como o monitoramento do efeito do probiótico diretamente no tanque de cultivo com as alterações ambientais do campo poderiam demonstrar a real ação do probiótico frente aos microrganismos presentes.

## 5 CONCLUSÕES

- O monitoramento microbiológico do camarão e da água de cultivo demonstra que a microbiota do tanque é oscilante e algumas bactérias encontradas ao início do cultivo não foram detectadas ao fim.
- A água de cultivo foi reprovada no ensaio de coliformes a 45°C em 11(15,3%) de 72 amostras analisadas durante o monitoramento.
- O camarão foi reprovado no ensaio de *E.coli* em 11(30,6%) de 36 amostras analisadas durante o monitoramento.
- A água de cultivo e o camarão na etapa de despesca estava dentro dos parâmetros exigidos para comercialização.
- O probiótico não obteve um resultado eficaz “*in vitro*” na eliminação e substituição da microbiota natural presente.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROPACTO, Informativo Semanal, ano 08, nº 319, Fortaleza, 15/05/2003.

APHA, **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4rd. ed., Ed. VANDERZANT, C. e SPLITTSTOESSER, Am. Pub. Health Assoc., Washington, D.C. 676p, 2001.

ARANA, L.A.V. **Aqüicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÕES. Consulta *on line* disponível em: <http://www.abccam.br/> Acesso em 11/04/2005.

ASSOCIAÇÃO CATARINENSE DE AQUICULTURA. Consulta *on line* disponível em: <http://www.acaq.org.br/> Acesso em 22/11/2004.

AUSTIN, B., BAUDET, E., STOBIE, M. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. **Journal of Fish Diseases** v.15, p. 55–61. 1992.

AUSTIN, B., STUCKEY, L.F., ROBERTSON, P.A.W., EFFENDI, I., GRIFFITH, D.R.W. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. **Journal of Fish Diseases** v.18, p. 93–96. 1995.

BASKAR, N.; SETTY, T.M.R.; MONDAL, S.; JOSEPH, M.A.; RAJUL, C.V.; RAGHUNATH, B.S. & ANANTHA, C.S. **Prevalence of bacteria of public health significance in cultured shrimp (*Penaeus monodon*)**. Food Microbiology, 15, pp. 551 – 519, 1998.

BEIRÃO, L. H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M.; SANTO, M. L. P. E. **Processamento e industrialização de moluscos**. Consulta *on line* disponível em: [http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento\\_indust.PDF](http://www.acaq.org.br/arquivos/processamento_indust.PDF) Acesso em 22/09/2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Consulta *on line* disponível em: [www.setorpesqueiro.com.br/ministerios/ministerio\\_da\\_agricultura\\_e\\_do\\_abastecimento/dp\\_a/asp](http://www.setorpesqueiro.com.br/ministerios/ministerio_da_agricultura_e_do_abastecimento/dp_a/asp) Acesso em 30/09/2004.

BRASIL. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. **CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente/ MMA**. Diário Oficial da União. Brasília, DF.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF – 10 de janeiro de 2001.

BROWDY, C. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. **Aquaculture** 164:3-21. 1998.

CAPRA, S.M. **Análise de bactérias heterotróficas associadas à larvicultura de *Penaeus paulensis*, Barra da Lagoa, Ilha de Santa Catarina**. Florianópolis, 1994. 111p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura, UFSC.

CATO, J.C. Seafood safety - Economics of hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) programmers. **FAO Fisheries Technical Paper** 381. FAO, Rome - Italy:70p., 1998.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. **Aquaculture**, n ° 220 p 355 – 366, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS Disponível em: [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net) Acesso em: 21/10/2004.

DALSGAARD, A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp and *Salmonella* in aquacultured. **International Journal of Food Science and Technology**, 33, pp. 127 – 138, 1998.

DEVARAJA, T. N.; YUSOFF, F. M.; SHARIFF, M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. **Aquaculture**, n ° 226 p 245 – 256, 2002.

EMPRESA PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI. **Maricultura – dados de produção**. Florianópolis. 2001.

EYLES, M. J.; DAVEY, G. R.; ARNOLD, G. Behavior and incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Sydney rook oysters (*Crassostrea commercialis*). **International Journal of Food Microbiology**, v.1, p. 327 – 334, 1985.

EYLES, M. J.; DAVEY, G. R. *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of two urban estuaries in Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, p. 207 –218, 1988.

FAGHRI, M. A.; PENNINGTON, C. L.; CRONHOLM, L. S.; ATLAS, R. M. Bacteria associated with crabs from cold waters with emphasis on the occurrence of potential human pathogens. **Apply Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1054 – 1061, 1984.

FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia do alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 1996.

FRAZIER, W. C. & WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 465p, 1993.

FREUND, J. E.; SIMON, G. A. **Estatística Aplicada**. 9 ed. Porto Alegre, RS – Brasil 2000. 404p.

GARRIQUES, D., & AREVALO, G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador, p. 53-59. **In C. L. Browdy, and J. S. Hopkins (ed.), Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La., 1995.**

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture** v.180, p. 147–165, 2000.

GRASLUND, S.; HOLMSTROM, K.; WAHLSTROM, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. **Marine Pollution Bulletin** v. 46 p. 81–90, 2003.

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

HANNINEN, M.L.; OIVANEN, P.; HIRVELA-KOSKI, V. *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 34, p. 17 – 26, 1997.

HATHA, M. A. A.; MAQBOOL, T. K.; KUMAR, S. S. Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultured shrimp. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 82, p. 213 – 221, 2003

HEU, M.S.; KIM, J.S.; SHAHIDI, F. Componentes and nutritional quality of shrimp processing by products. **Food Chemistry**, vol. 82, p. 235 – 242, 2003.

HOSSEINI, H.; CHERAGHALI, M. A.; *et al.* Incidence of *Vibrio* spp. In shrimp caught off the south coast of Iran. **Food Control**, 2003.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews** 2004.

HUSS, H. H.; REILLY, A. & EMBAREK, K. B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, vol. 11, p. 149 0 156, 2000.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS – ICMSF. **Ecologia Microbiana de los Alimentos 2**, Espanha: Zaragoza, 1985.

- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Review: Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases** vol. 25, 633–642, 2002
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. London : Chapman & Hall, 1996. 661p.
- LCM (Laboratório de Camarões Marinhos – Departamento de Aqüicultura – DAQI/CCA/UFSC), 2000. Disponível em: [www.lcm.ufsc.br](http://www.lcm.ufsc.br) Acessado em: 22/09/2003.
- LUPIN, H. M. Producing to achieve HACCP compliance of fishery and aquaculture products for export, **Food Control**, Vol. 10, Pages 267-275, 1999
- MARCHIORI, M. A. Guia ilustrado de maturação e larvicultura do camarão-rosa *P. Paulensis*. Rio Grande: Editora FURG, 1996.
- MAEDA, M. Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. **Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.** 1:71-74. 1994
- MAEDA, M., AND I. C. LIAO. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva *Penaeus monodon*. **Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.** V. 21:25-29. 1992.
- METCALFE, A. M.; MARSHALL, D. L. Capacitance method to determine the microbiological quality of raw shrimp (*Penaeus setiferus*) **Food Microbiology** v.21 p. 361–364, 2004.
- Microrganismos eficazes E.M na pecuária. **Boletim informativo da Fundação Mokiti Okada MOA** - Centro de Pesquisa de São Paulo – SP, 2002.
- MIGET, R.J. Microbiology of crustacean processing: Shrimp, crawfish, and prawns. p. 65 – 87. *In*:D. R. WARD and C. R. HACKNEY **Microbiology of marine food products**. Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
- MORIARTY, D. J. W. & BODY, A. G. C. Modifying microbial ecology in ponds: the key to sustainable aquaculture, p. 1-10. *In Proceedings of Fish Asia '95 Conference: 2nd*

**Asian Aquaculture and Fisheries Exhibition and Conference.** RAI Exhibitions, Singapore, Singapore. 1995.

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

NASCIMENTO, S. M. M.; VIEIRA, R. H. S.; THEOPHILO, G. N. D. *et al.* *Vibrio vulnificus*: um fator de risco para a saúde do consumidor de camarões. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, vol.43, no.5, p.263-266, 2001.

PHIANPHAK, W., RENGPIPAT, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASVETA, P., Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** v. 24, p. 41–51. 1999.

QUEIROZ, J.; Boyd, C. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. **Journal World Aquaculture Soc.** 29:67-73. 1998

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. 1998a

RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASVETA, P. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In: Flegel, T.W. Ed. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 177–181. 1998b

RENGPIPAT, S. RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiont bacterium *Bacillus* S11. **Aquaculture** vol. 191 (271–288) 2000

RÊGO, G.S. Roteiro básico para despesca do camarão. Disponível em: [www.carcinicultor.com.br](http://www.carcinicultor.com.br) Acesso em: 06/10/2003

ROCHA, I. P.; MAIA, E. P. **Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira.** In: Contribuições ao desenvolvimento da aquicultura, em especial da carcinicultura no Brasil, 1998.

SAINT-BRISSON, S.C. **Cultivo de camarões marinhos.** Rio de Janeiro: 1999.

SANTOS, C.A.L. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Departamento de pesca e Agricultura. Brasília, 2001.

SOUZA, J. **Camarão Marinho.** Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. Florianópolis: 2002.

SUWANSONTHICHAJ, S.; RENGPIPAT, S. Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. **International Journal of Food Microbiology** v.81 p. 113– 121, 2003.

SUNG, H. H.; LIN, S. C.; CHEN, W. L.; TING, Y.Y.; CHAO, W. L. Influence of Timsenk on *Vibrio* populations of culture pond water and hepatopancreas and on the hemocytic activity of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) **Aquaculture** v. 219 p. 123 – 133, 2003.

TANASOMWANG, V.; NAKAI, T.; NISHIMURA, Y.; MUROGA, K. *Vibrio* sp inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. **Fish Pathol.** V. 33:459 - 466, 1998.

URDACI, M.C.; PINCHUK, I. Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications (Ricca, E., Henriques, A.O. and Cutting, S.M., Eds.) **Horizon Bioscience.** p. 171–182. 2004.

VALENTI, W.C. **Criação de camarões em águas interiores.** Jaboticabal; FUNEP, 81 p., 1996.

VANDENBERGUE, J.; THOMPSON, F. L.; *et al.* Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**, vol. 219, p. 09 – 20, 2003.

VASEEHARAM, B. & RAMASAMY, P. Control of pathogenic *vibrio* spp by *Bacillus subtilis* BT23 a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *P.monodon*. **Lett. Appl. Microb.** V. 36, p. 83 – 86, 2003.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Mic. Mol. Biol. Rev.** V. 64, p. 655–671. 2000.

WONG, H. C.; CHEN, M.C.; LIU, S. H.; LIU, D. P. Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 52, p. 181 – 188, 1999.



**7 ANEXOS**

## 7.1

Tabela 10 – Resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* da água de captação da Fazenda Yakult na safra 2004/1.

Ensaio/ Coletas	Coliformes a 35°C (NMP/100mL)	Coliformes a 45°C (NMP/100mL)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)
1°	5,1	5,1	5,1
2°	6,9	6,9	4,1
3°	<1,1	<1,1	<1,1
4°	2,2	2,2	2,2
5°	>23,0	>23,0	>23,0
6°	3,6	3,6	<1,1
7°	>23,0	16,1	9,2
8°	16,1	12,0	12,0

## 7.2 Artigos submetidos

### **REVISÃO: CAMARÃO DE CULTIVO UM RENTÁVEL ALIMENTO.**

Artigo submetido ao **Boletim Ceppa** em 18/03/2005.

### **QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E DO CAMARÃO *L.vannamei* EM DIFERENTES ETAPAS DO CICLO DE CULTIVO.**

Artigo em tradução para ser submetido a revista **Aquaculture**.

### **MONITORAMENTO DA EFICÁCIA DO PROBIÓTICO *EM4 in vitro* FRENTE AO MICRORGANISMO *Escherichia coli***

Artigo a ser submetido a revista **Ciência e Agrotecnologia**.