

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AQUÁTICOS TROPICAIS**

ONILLI SAADIA DE OLIVEIRA SITONIO

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADO
COM DIETA ENRIQUECIDA COM PROBIÓTICO
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

**ILHÉUS –BAHIA
2013.**

ONILLI SAADIA DE OLIVEIRA SITONIO

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADO
COM DIETA ENRIQUECIDA COM PROBIÓTICO
(*Saccharomyces cerevisiae*)

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Sistemas
Aquáticos Tropicais.

Área de concentração: Biorremediação de
Impactos ambiental

Orientador: Prof.Dr. João Carlos Dias Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Braga

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL
2013.

S623

Sitonio, Onilli Saadia de Oliveira.

Desempenho zootécnico do camarão *Litopenaeus vannamei* : alimentado com dieta enriquecida com probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) / Onilli Saadia de Oliveira Sitonio. – Ilhéus, BA : UESC, 2013.

xii, 33 f. : il.

Orientador: João Carlos Dias Teixeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Sistemas Aquáticos Tropicais.

Inclui referências e apêndice.

1. Camarão – Criação. 2. Probióticos. 3. Microorganismos patogênicos. I. Título.

CDD 639.543

ONILLI SAADIA DE OLIVEIRA SITONIO

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADO
COM DIETA ENRIQUECIDA COM PROBIÓTICO
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Ilhéus, 31/05/2013

Prof.Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati (Universidade Federal da Bahia)

Prof.Dr. Alexandre Oliveira de Almeida
(Universidade Estadual de Santa Cruz)

Prof.Dr. João Carlos Dias Teixeira
(UESC-orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram durante minha jornada acadêmica, em especial a minha família, pais e irmãos, que estiveram sempre do meu lado em todas as situações.

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota da água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTO

Ao Dr. João Carlos Dias Teixeira, pela orientação, paciência e compreensão;

Ao Dr. Gustavo Braga, pela co-orientação, paciência e compreensão;

A CAPES, pela concessão da bolsa durante o mestrado;

A Universidade Estadual de Santa Cruz e AQUANUT;

A todos os professores que contribuíram para realização do experimento;

Aos meus colegas de laboratório, Rosymeire, Cristiane, Salatiel, Emanuel, Tarcila

e todos os alunos dos laboratórios de microbiologia e monitoramento; ambiental,
pelo apoio que me deram durante fase laboratorial do experimento;

Aos meus colegas do laboratório AQUANUT, Itamar, Marcel, Jhon, Hortência;

Érica e demais colegas;

Aos queridos amigos que conquistei na cidade de Ilhéus;

A minha família, pai, mãe, irmãos e sobrinha, Giovanna;

A todos que de certa forma me apoiaram ao longo do mestrado;

RESUMO

A carcinicultura brasileira é uma atividade recente, começou na década de 70 com o cultivo de *Penaeus japonicus*, mas foi a partir do final da década de 90, com a introdução da espécie exótica *Litopenaeus vannamei*, que a atividade foi impulsionada. O *vannamei* é um crustáceo decápodo, pertencente à família Penaeidae. Nativos da costa oriental do oceano pacífico. Apresenta um crescimento uniforme, fácil adaptabilidade às condições adversas de salinidade e temperatura e bom desempenho reprodutivo. Dentro da carcinicultura o principal fator limitante está no controle de infecções. Um método seguro e efetivo no controle de enfermidades na aquicultura é através do uso de probióticos. Atualmente diversos organismos vêm sendo utilizados com probióticos, como é o caso das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação do *Litopenaeus vannamei*, em diferentes densidades de estocagem e suas interações com o crescimento, sobrevivência e ganho de peso do animal. Foi utilizado um esquema fatorial 2x2x2 com dois níveis de tratamento (com e sem levedura), e duas densidades de estocagem (alta e baixa). As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* DS-9 e 1031 foram submetidas a teste de resistência à salinidade nas utilizando as concentrações salinas de: 2, 10, 15, 20, 25, 30 e 35. As leveduras foram submetidas a teste de antagonismo frente a três microorganismos patógenos, *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*. Para testar os efeitos da *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado um experimento com 540 Pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, com peso inicial de 1,464. 10⁻³ gramas e comprimento médio inicial de 1,056 centímetros, distribuídas em 24 aquários de 30 litros. Os animais foram submetidos a dois tratamentos: T1 ração com levedura e T2 controle, em duas densidades de estocagem (25 pós-larvas e 50 pós-larvas). Os camarões foram alimentados com ração suplementada com a cepa DS-9. Ao final do experimento foi realizado um teste desafio com os microorganismos patógenos *Vibrio alginolyticus*. Foram avaliados ganho de peso, taxa de crescimento e sobrevivência. Ao final do experimento os animais foram contados, medidos e pesados, para avaliação do desempenho zootécnico. Em relação ao teste de salinidade as cepas de levedura DS-9 e 1031, apresentaram crescimento celular em todas as concentrações de salinidade, demonstrando não ser, portanto, a salinidade, um fator letal. No teste de antagonismo não foi observado nenhuma substância produzida pela *Saccharomyces* que inibisse o crescimento dos organismos patógenos utilizados. Quanto aos parâmetros analisados de ganho de peso, crescimento e sobrevivência não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que as leveduras DS-9 utilizadas não conferiram melhoras zootécnicas no desempenho dos animais.

Palavras - chave: carcinicultura, probiótico, desempenho, patógenos.

ABSTRACT

The Brazilian shrimp farming is a recent activity, it started in the 70s with cultivation of *Penaeus japonicus*, being driven in the late 90s with the introduction of the exotic species *Litopenaeus vannamei*. The *vannamei* is a crustacean belonging to the family Penaeidae. Native to the eastern shore of the Pacific Ocean. Presents a uniform growth, easy adaptability to adverse salinity conditions and temperature and good reproductive performance. Inside the shrimp farming the main limiting factor is in the infection's control. A safe and effective method to control diseases in aquaculture is through the use of probiotics. Currently many organisms have been used with probiotics, such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, this study aims to evaluate the effects of feeding the *Litopenaeus vannamei* with yeast *Saccharomyces cerevisiae*, at different stocking densities and their interactions with the growth, survival and weight gain of the animal. It was used a 2x2x2 factorial with two levels of treatment (with and without yeast) and two stocking densities (high and low). The strains of *Saccharomyces cerevisiae* DS-1031 and 9 were subjected to a resistance test using the salt concentrations: 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35. The yeasts were tested to determine antagonism against three pathogenic microorganisms, *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. To test the effects of *Saccharomyces cerevisiae* an experiment was carried out with 540 post-larvae of *Litopenaeus vannamei*, with initial weight of 1.464×10^3 grams and length averaging 1.056 cm, distributed in 24 tanks of 30 liters. The animals were subjected to two treatments: diets with yeast T1 and control at two stocking densities (25 post-larvae and post-larvae 50) T2. The shrimps were fed with supplemented ration with strain DS-9. At the end of experiment a challenge test was conducted with pathogenic microorganisms *Vibrio alginolyticus*. We evaluated weight gain, growth rate and survival. At the end of the experiment the animals were counted, measured and weighted to assess growth performance. In relation to the test salinity yeast strains DS-9 and 1031 showed cell growth at all concentrations of salinity, demonstrating that salinity is not lethal factor. In the antagonism test used pathogenic organism was observed. Regarding the analyzed parameters weight gain, growth and survival any significant differences were observed for the treatments, showing that the used yeast DS-9 do not confer zootechnical improvements in the animal's performance.

Keywords: shrimp farming, probiotics, performance, pathogenic.

ÍNDICE

1.0 INTRODUÇÃO REVISÃO DA LITERATURA	12
2.0 OBJETIVO GERAL.....	20
3.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Aquisição das pós larvas	21
4.2 Microorganismos utilizados.....	21
4.3 Microorganismos utilizados.....	21
4.4 Teste de resistência das leveduras à salinidade	22
4.5 Teste de antagonismo.....	23
4.6 Ração enriquecida com levedura	24
4.7 Experimento com a ração enriquecida.....	24
4.8 Delineamento experimental	26
4.9 Ensaio desafio com Vibrio.....	26
4.10 Análise estatística dos parâmetros zootécnicos experimentais.....	26
5.0 RESULTADOS	27
5.1 Teste de viabilidade celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na ração experimental	27
5.2 Tolerância à salinidade	27
5.3 Teste de antagonismo.....	29
5.4 Observações dos parâmetros físico-químicos da água	30
5.5 Desempenho zootécnico das pós-larvas nos diferentes tratamentos nas densidades de estocagem de 25 e 50 pós-larva/ aquário.....	31
5.6 Contaminação da água de cultivo por Vibrio.....	34
6.0 CONCLUSÃO.....	36
7.0 REFERÊNCIAS.....	37
8.0 APÊNDICE	41

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Fig. 1. Número de UFC/ml da estirpe DS9 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Fig.2. Número de UFC/ml da estirpe 1039 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes concentrações de salinidade	28
Tabela. 1 Estatística descritiva dos valores máximos, mínimos e médios encontrados das variáveis, temperatura, oxigênio e pH.....	30
Fig.3. Ganho de peso dos camarões em relação aos tratamentos com e sem probiótico nas duas densidades de estocagem	32
Fig. 4.Crescimento das pós-larvas de camarão em relação aos tratamentos com e sem probiótico submetidos às duas densidades de estocagem	35
Fig. 5.Sobrevivência das pós-larvas de camarão em relação aos tratamentos com e sem probiótico nas duas densidades de estocagem.....	35
Fig. 6.Verificação pureza em meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41
Fig.7. Verificação pureza em meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para <i>Vibrio harveyi</i>	41
Fig. 8.Verificação pureza em meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para <i>Vibrio alginolyticus</i>	41
Fig. 9.Coloração Gram <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42
Fig. 10. Coloração Gram <i>Vibrio harveyi</i>	42
Fig.11. Coloração Gram <i>Vibrio alginolyticus</i>	42
Fig. 12. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com <i>Vibrio harveyi</i> x cepa DS9	43
Fig. 13. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com <i>Vibrio harveyi</i> x cepa 1031	43
Fig. 14. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com <i>Vibrio alginolyticus</i> x cepa DS9	44
Fig. 15.Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com <i>Vibrio alginolyticus</i> x cepa 1031	44
Fig. 16.Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> x cepa 1031	44
Fig. 17.Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> x cepa DS-9	45

Fig. 18. Teste de viabilidade celular da cepa DS-9 na ração ofertada as pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*..... 45

1. INTRODUÇÃO

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Litopenaeus vannamei*

Litopenaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) é um camarão marinho, pertencente à família Penaeidae. A espécie é nativa da costa oriental do Oceano Pacífico, ocorrendo desde Sonora, México, ao sul do Peru; vive em águas rasas até 72 metros de profundidade, com temperatura acima dos 20°C durante todo o ano (FAO, 2013). Os animais adultos são encontrados em ambientes oceânicos e os jovens em ambientes estuarinos (HOLTHUIS, 1980).

O ciclo de vida do *vannamei* inicia-se com a migração dos adultos para águas oceânicas, em busca de condições propícias de salinidade e temperatura, para maturação de desova. Durante a fase reprodutiva, os machos fertilizam as fêmeas por meio da deposição do espermatozóide em seu túnel. Quando fertilizadas, as fêmeas podem produzir de 100.000 a 250.000 ovos. Doze horas após a fecundação, nascem os náuplios (MAGALHÃES, 2014), em águas oceânicas. O período larval de *Litopenaeus vannamei* apresenta seis fases de náuplios, três de protozoa e três de mysis. O processo de metamorfose termina quando os animais passam do estágio de mysis III para pós-larva (SILVA, 2007). À medida que vão mudando de estágio larval, se deslocam em direção aos estuários, que funcionam como berçários naturais, ricos em alimentos e que proporcionam ambiente favorável ao crescimento, até a fase de juvenil, quando então iniciam a migração para o mar aberto, para um novo ciclo (TREECE, 2000).

Possuem um rostro moderadamente longo com 7-10 dentes dorsais e 2-4 dentes ventrais. A coloração é translúcida, podendo mudar conforme substrato, alimentação e turbidez da água. Alcançam comprimento total de 23 cm. Normalmente as fêmeas alcançam maiores tamanhos do que os machos (FAO, 2013).

1.2 Morfologia de *Litopenaeus vannamei*

De acordo com Junior e Neto (2001) o corpo dos camarões peneídeos é comprimido lateralmente e coberto por um exoesqueleto calcificado, constituído de quitina e proteínas, articulado por meio de membranas articulares. Possuem um corpo alongado, segmentado, dividido em três regiões distintas: a cabeça, o tórax e o abdome. Cada uma dessas regiões é constituída por segmentos, onde estão inseridos os apêndices.

A cabeça e o tórax dos peneídeos estão fundidos em uma única estrutura, chamada de cefalotórax, localizada na porção anterior do animal, onde, morfologicamente, três estruturas se destacam: a carapaça (fusão dos somitos cefálicos e torácicos, responsável pela proteção das brânquias e demais órgãos vitais); os olhos pedunculados e o rostro (função de proteção contra predadores). O abdome, com seis segmentos, estende-se desde a parte final do cefalotórax até a porção terminal do animal. Inserido no sexto segmento abdominal encontra-se o telso.

O *Litopenaeus vannamei*, assim como os demais peneídeos, é ectotérmico e osmoconformista, mantendo as concentrações de sais dos tecidos e sangue equivalentes a do ambiente onde vivem, eliminando o excesso de sal do organismo através da urina e glândulas antenais (BELL & LIGHTNER, 2000).

Classificação taxonômica, segundo Pérez-Farfante e Kensley (1997)

Filo: Arthropoda

Subfilo: Crustacea

Classe: Malacostraca

Ordem: Decapoda

Subordem: Dendobranchiata

Superfamília: Penaeoidea

Família: Penaeidae

Gênero: *Litopenaeus*

Espécie: *Litopenaeus vannamei*(Boone, 1931)

1.3 Cultivos de camarões marinhos no Brasil

A carcinicultura brasileira é uma atividade recente. As primeiras tentativas de produção foram realizadas pela Rauston-Purina, em parceria com pesquisadores da Universidade Federal Rural de Pernambuco, realizando teste para produção de diferentes espécies de camarão na ilha de Itamaracá (MOLES E BUNGE, 2002).

Na mesma época, teve início, no estado do Rio Grande do Norte, a criação do projeto intitulado “Projeto Camarão”, com a produção da espécie *Penaeus japonicus* (SEBRAE, 2008). Na década de 80, a criação do *Penaeus japonicus* foi impulsionada com instalações das primeiras fazendas de camarão do Nordeste. Neste período, os cultivos ainda eram extensivos, com baixa densidade de estocagem, baixa renovação de água e alimentação natural (ABCC, 2011).

Com a falta de estudos prévios sobre a biologia da espécie e a falta de planejamento na produção, começaram a surgir problemas no cultivo do *P. japonicus*. O motivo do declínio, na produção, estava no fato de, a espécie, originada do Japão, desenvolver-se em altas salinidades e temperaturas. Ao iniciar o cultivo na região Nordeste, os produtores contaram com um período de seca, obtendo, assim, sucesso no cultivo nos primeiros três anos. Porém, com início do período de chuvas, ocorreram variações na salinidade nas águas estuarinas, dificultando a reprodução, a maturação e a própria sobrevivência da espécie (SCHWAB; WEBER; LEHMANN, 2002).

Com o fracasso da criação do *P. japonicus*, as espécies nativas *P. subtilis*, *P. schmitti*, *P. brasiliensis* e *P. paulensis*, passaram a ser o foco da carcinicultura brasileira. Com a experiência obtida na produção do *P. japonicus* e aproveitando as instalações das fazendas, foi possível desenvolver a base para domesticação destas espécies. Nesse período, iniciou-se o estabelecimento de cultivos semi-extensivos, com maiores densidades de estocagem, taxa de renovação e incremento de alimentos artificiais. Apesar do avanço tecnológico ocorrido nesta fase, os cultivos não apresentavam altas produtividades; a falta de alimentos com

as exigências nutricionais adequadas às espécies nativas comprometeu a rentabilidade do agronegócio, levando a desativação das fazendas (ABCC,2011).

A solução para a carcinicultura brasileira estava na importação de *Litopenaeus vannamei*, espécie que já apresentava sucesso em cultivos realizados em países como Equador e Tailândia, demonstrando capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais. Com os avanços tecnológicos na sua larvicultura e a distribuição constante de pós-larvas, atrelados a altos índices de rentabilidade e produtividade, *Litopenaeus vannamei* tornou-se a única espécie cultivada no país (SILVA,2009).

Apesar dos esforços na década de 70 e 80, para o desenvolvimento da atividade, a carcinicultura no Brasil só foi impulsionada a partir do ano de 1998. Houve um aumento exponencial da produção entre 1998-2003, quando a produção passou de 7.000 toneladas para mais de 90.000 em 2003. No ano de 2004, a produção de camarão, no país, apresentou uma queda de 27,93%, saindo de mais de 90.000 toneladas em 2003 para menos de 64.000 em 2005 (ROCHA,2007). Os fatores que contribuíram para esta queda foram as baixas nas exportações, relacionadas à ação antidumping, deflagrada pelos produtores norte-americanos e problemas no cultivo, ligados ao vírus da Mancha branca e a Necrose Infeciosa.

Após esse período, a produção foi declinando gradativamente de 2005 a 2009, voltando a apresentar crescimento em 2010. Atualmente, cerca de 90% da produção brasileira se concentra na Região Nordeste; a Região Sul representa apenas 3% do total, impulsionada pelo estado de Santa Catarina (FILHO et al., 2003).

1.4 Probióticos na aquicultura

Na aquicultura, uma forma de controlar microorganismos patógenos é através do uso de antibióticos. Nos anos 50, os antibióticos passaram a ser usados amplamente, como agentes terapêuticos e como promotores do

crescimento, principalmente em países em desenvolvimento, onde não há uma regulamentação para o uso de drogas em ambientes aquáticos.

No entanto, seu uso excessivo, pode levar a consequências negativas, como a seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático, ocasionando o surgimento de cepas resistentes na produção animal (CARNEIRO et al., 2007). Alguns países e organizações estabeleceram uma série de restrições ao uso de antibióticos. Países da Europa e Estados Unidos proibiram o uso de alguns antibióticos, como: virginiamicina, tilosina e bacitracina, como promotores de crescimento na alimentação animal, forçando países, onde o controle é menos rigoroso, a adotarem práticas de manejo para minimização do uso destas substâncias (TURNIDGE, 2004; DELSOL et al., 2005)

Com o insucesso na utilização de antibióticos e diante do seu potencial risco na produção de organismos aquáticos, uma alternativa viável e segura, para substituição dos antibióticos, é o uso dos probióticos. O conceito de probiótico surgiu a partir de observações de pesquisadores; eles sustentavam que, através da ingestão de microorganismos benéficos, seria possível controlar a ação de organismos patógenos. Foi usado, pela primeira vez, por Lilly e Stillwell, para apresentar substâncias produzidas por organismos que estimulam o crescimento do outro. Quinze anos depois, Fuller propôs que probióticos eram suplementos microbianos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio da flora intestinal.

Outra definição, proposta por Holzapfel et al. (2001) define probiótico como culturas puras ou mistas de microorganismos vivos (bactérias ou leveduras) que, quando aplicadas aos animais ou homens, têm efeito benéfico ao hospedeiro. Atualmente, a definição mais aceita é a proposta pela Organização das Nações Unidas da Agricultura e Alimentação e pela Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS, 2002) que define probióticos como sendo “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”.

Na aqüicultura, entende-se probiótico como sendo “suplemento bacteriano adicionado a um sistema de produção para modificar ou controlar as comunidades

microbianas na água e sedimento, reduzindo ou eliminando microorganismos patogênicos selecionados e aumentando também o crescimento e sobrevivência dos organismos cultivados” (HOROWITZ & HOROWITZ, 2000).

Nos ambientes aquáticos, as relações entre probiótico e hospedeiro, diferentemente do ambiente terrestre, não estão limitadas somente ao trato intestinal dos animais. As bactérias probióticas podem ser ativas nas brânquias, pele e intestino dos animais, proporcionando melhora na saúde. Além de atuar beneficemente no meio ambiente, melhorando a composição dos sedimentos, eliminação de patógenos e qualidade da água, através do aumento da velocidade de degradação dos resíduos orgânicos (TORO, 2005).

Atualmente, diversos organismos vêm sendo utilizados com essa finalidade, na aquicultura, como é o caso das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Lara-Flores et al (2003) observaram um efeito positivo de *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo. Sanderson e Jolly (1994) observaram que a adição da levedura beneficiou a qualidade do filé de salmão. Souza (1989) observou níveis elevados de digestibilidade proteica do tambaqui quando alimentado com levedura. A utilização de levedura como probiótico, além de contribuir para melhoria das condições sanitárias da criação, também pode proporcionar uma fonte alternativa de proteína. As leveduras contêm qualidades necessárias em dietas de organismos aquáticos, como carotenoides, vitaminas do complexo B, minerais, além de ser uma fonte de proteína completa (ALVARO, 2009).

1.5 Uso de levedura como probióticos

Leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. São amplamente distribuídas na natureza, frequentemente encontradas como um pó branco cobrindo frutas e folhas. As leveduras podem se multiplicar por fissão binária ou por brotamento, como no caso das *Saccharomyces*, dividindo-se e formando células iguais (TORTORA et al., 2005).

A *Saccharomyces* é uma levedura ascomicética e anaeróbia facultativa. Com células pequenas e ovais, seu ciclo de vida inclui duas fases: haploide e diploide (BYERIS, 1981). Destaca-se como espécie mais explorada, comercialmente, entre as leveduras e apresentam grande emprego na indústria.

As primeiras pesquisas realizadas com a *Saccharomyces* foram desenvolvidas por Anton Van Leeuwenhoek, que as observou em cervejas e vinhos. Pasteur, em 1876, provou que as fermentações de vinho e cerveja eram causadas pelas leveduras. É considerado um microorganismo atrativo de se trabalhar, por não ser patogênico, além de ter seu uso amplamente explorado ao longo da história como produto comestível. É classificado como microorganismo considerado como seguro (GRAS- generally regarded as safe) (OSTERGAARD;OLSSON;NIELSEN, 2000).

É uma espécie que pode ser utilizada como probiótico, na alimentação animal, devido a sua habilidade em converter açúcares em etanol e em dióxido de carbono (DZIEZAK, 1987). Elimina o oxigênio do trato digestivo do animal, diminuindo o número de bactérias aeróbicas, bloqueando a produção e atuação de substâncias tóxicas, além de estimular o sistema imunológico dos animais (CABALLERO-CÓRDOBA et al., 1997).

Tem sua eficácia comprovada como probiótico em animais ruminantes e monogástricos, como suínos, coelhos, frangos e, recentemente, em animais aquáticos, como peixes adultos e suas larvas (MACHADO et al., 2008).

1.6 Vibrios

Os vibrios são bactérias do grupo das gammaproteobactérias, gram negativas, bastonetes, geralmente móveis, mesófilas, com metabolismo fermentativo facultativo, encontradas em ambientes aquáticos e em associação com eucariotos (THOMPSON et al., 2004). São bactérias de vida livre que estão presentes no ambiente aquático marinho e estuarino; vivem como simbióticos ou patógenos, preferem pH alcalino e sua distribuição depende da salinidade, temperatura e nutrientes presentes na água (MAYER, 2010).

O gênero *Vibrio* compreende 74 espécies, distribuídas em quatro famílias: Entereovibrionacea, Protobacterionaceae, Salinivibrionaceae e Vibrionaceae (Thompson et al., 2004). Estas bactérias são tipicamente de ambientes marinhos e estuarinos; a maioria das espécies é mesófila, com tendência a proliferação em temperaturas mais quentes; temperatura e salinidade são fatores que influenciam na presença de vibrios no ambiente.

Os vibrios fazem parte da flora bacteriana dos peneídeos e são designadas como patógenos, mas nem sempre o são. Na maioria das estirpes ambientais faltam os fatores determinantes de virulência, seja pela falta de colonização, necessária para aderência e penetração, ou ausência de toxinas apropriadas. São considerados como patógenos oportunistas, devido a sua capacidade de adaptação e podem proliferar-se rapidamente (MAEDA, 2002).

A vibriose nos penneídeos pode se desenvolver como uma infecção sistêmica, quando afeta todos os órgãos e tecidos, ou como localizada. Geralmente a forma sistêmica está correlacionada a situações de estresse, desencadeando como uma enfermidade secundária. Manchas marrons ou pretas são características de infecções locais (GALLI et al., 2001 & TORLONE et al., 1985).

Em condições favoráveis, os camarões podem selecionar sua flora bacteriana mantendo o equilíbrio; porém, condições desfavoráveis, oriundas do manejo inadequado nos viveiros, provocam alterações das propriedades físico-químicas da água, que podem levar ao desequilíbrio do ambiente, submetendo o animal a situações de estresse e desencadeando doenças que geram um efeito negativo sobre a produção.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da adição da *Saccharomyces cerevisiaena* alimentação do *Litopenaus vannamei*.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a resistência das leveduras a diferentes níveis de salinidade;
- Realizar teste de antagonismo, *invitro*, com os agentes infecciosos e as leveduras;
- Testar, experimentalmente, a eficiência da ração enriquecida com a levedura;
- Testar as interações da ração, enriquecida em diferentes densidades de estocagem, e sua influência no crescimento, sobrevivência e ganho de peso;
- Realizar um ensaio de desafio com *Vibrio alginolyticus in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição e Alimentação de Peixes (AQUANUT) na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus-Bahia.

4.1 Aquisição das pós-larvas

As pós – larvas (Pl's) de *Litopenaeus vannamei* (pl12) foram adquiridas da larvicultura Larvi- Sul. Foram transportadas em sacos plásticos de 30 litros com água do mar e oxigênio, numa densidade de 1.500 pós-larvas e levados para o laboratório AQUANUT.

4.2 Microorganismos utilizados

As leveduras testadas foram a *Saccharomyces cerevisiae* DS-9 e 1031, cedidas pelo laboratório de Microbiologia da Agroindústria na Universidade Estadual de Santa Cruz, isoladas de dornas de fermentação de cachaça artesanal, localizadas em municípios do estado da Bahia.

4.3. Teste de resistência das leveduras à salinidade

Para teste de resistência das estirpes foi coletada água do mar, numa salinidade de 35. Para obtenção das diferentes concentrações de salinidade, foram realizadas diluições com água destilada, com finalidade de obter as salinidades de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35. Em seguida a água foi filtrada, em bomba de sucção a vácuo, acrescentado extrato de malte e esterilizadas. Cada concentração salina correspondeu aos diferentes tratamentos, totalizando seis tratamentos com três repetições. As cepas foram incubadas durante a noite, a 28°C, sob agitação contínua (150 rpm).

Após esse período foi realizada a contagem de leveduras. Para tanto foram realizadas diluições seriadas (1:10 salina estéril), que foram semeadas, em placas de Petri com meio de cultura Agar Extrato de Malte, colocadas em estufa D.B.O a temperatura de 28°C por 48 horas. Decorrido esse período, foi realizada a contagem de UFC/ml.

Foram realizados testes estatísticos de regressão linear.

4.4. Teste de antagonismos

Para teste de potencial antagônico das leveduras, foram realizados testes de antagonismo, frente a três cepas de microorganismos patogênicos ao camarão, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus*, cedidas pelo laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

As cepas de vibrios utilizadas foram plaqueadas em Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS – Extrato de levedura 5 g, hidrolisado pancreático de caseína 5 g, hidrolisado pancreático de tecido animal 5g, Citrato de Sódio 10g, Tiosulfato de sódio 10 g, Bili bovina 3g, Colato de sódio 3g, Sacarose (sucrose) 20 g, Cloreto de sódio 10 g, Citrato férrico 1g, Azul de bromitol 0,04 g, Azul de timol 0,04 g e Agar 14 G) para certificação da sua pureza e coloração de Gram.

Após certificada a pureza das cepas, foram realizados três testes in vitro: teste de difusão em Agar, perfuração de poços e dupla camada. No teste de perfuração em Agar, os vibrios foram semeados em TSA, acrescido de 3% de NaCl; realizaram-se perfurações de 6 mm de diâmetro no Agar e preenchidos com 10 µL de extrato das cepas DS-9 e 1031. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas. Após esse período, o antagonismo foi determinado pela presença do halo de inibição. No teste de difusão em Agar os vibrios foram semeados em Agar TSA, acrescido de 3% de NaCl, os extratos das cepas DS-9 e 1031 foram acrescentados no meio com auxílio da alça de níquel. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 30°C.

O método da dupla camada foi realizado seguindo metodologia proposta por (MARTINS et al., 2005). Para tanto, um “spot” de 5 microlitros da levedura, crescida em caldo Extrato de Malte durante 24 horas, a 30° C, foi colocado no centro da placa com Agar Extrato de Malte. Após incubação, a 30° C, por 48 horas, em aerobiose, as placas foram colocadas em posição invertida e em cada tampa foi colocado 1 ml de clorofórmio por 30 minutos. Decorrido esse período, as placas foram colocadas em posição invertida para evaporação do clorofórmio. As

cepas dos *Vibrioharveyi*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrioparahaemolyticus* foram crescidas em caldo BHI (brain heart infusion), a 30° C, sob agitação contínua a 180 rpm por 24 horas. Um “spot” de 10 microlitros, de cada cultura, foi acrescido em Agar BHI semi-sólido (0,7% de Agar), e uma camada de 3,5 do BHI semi-sólido foi colocada sobre o Agar extrato de malte, contendo a levedura. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados determinados pela presença do halo de inibição.

4.5 Preparo da ração enriquecida com levedura

Inicialmente, utilizou-se ração farelada para pós-larvas. Após 15 dias, os animais passaram a ser alimentados com ração comercial J40 (para PI (pós-larva) 5 a PI 35), granulometria de 1 mm. Para enriquecimento da ração, foi adicionado inóculo da cepa DS-9 da *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1: 10; para cada 1 kg de ração, adicionou-se 100 ml do inóculo, na concentração celular de 10^7 UFC/ml; manteve-se a ração em estufa a 30°C, por 24 horas, para crescimento microbiano; após esse período, a ração foi mantida sob refrigeração, a 4°C.

A concentração de levedura foi medida no início do experimento; para tanto, 1 grama de ração foi triturado e homogeneizado em salina estéril (na proporção de 1:10 peso/volume); foram realizadas diluições seriadas (1:10 em salina estéril), semeadas em placas de Petri com Agar extrato de malte e colocadas em estufa B.O.D a temperatura a 28°C por 48 horas; decorrido esse período, realizou-se contagem de UFC/g.

4.6 Experimento com a ração enriquecida

Os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias, alimentados com ração em pó. Decorrido esse período, para obtenção de um lote uniforme, os animais, de todos os aquários, foram transferidos para um recipiente de 30 litros. Foi retirada uma amostra de 30 pós-larvas, as quais foram medidas e estimada a média do comprimento de carapaça (medido desde a extremidade do rostro até a margem posterior da carapaça), com paquímetro de precisão 0,005 mm e classificadas de acordo com o tamanho. A partir da média obtida (1,056 cm) foi realizada a classificação dos animais. Os camarões, com comprimento maior que 1,05 cm, foram separados e estocados em tanque reserva. Os animais com comprimento inferior a 1,05 cm, foram transferidas novamente aos aquários.

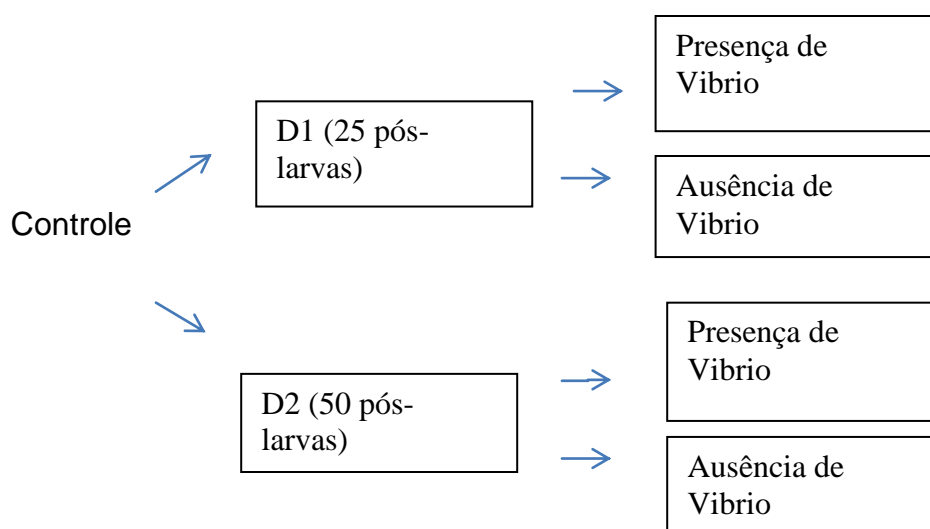
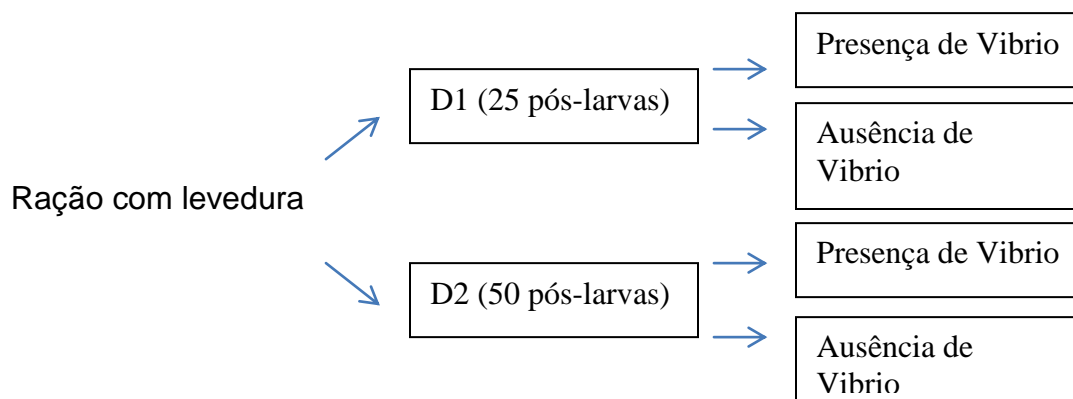
Para obtenção do peso inicial das pós-larvas retirou-se uma amostra de 10 pl's de cada aquário, num total de 240 Pl's; o excesso de água dos animais foi retirado com auxílio de papel filtro; peso médio individual foi de $1,46 \cdot 10^{-6}$ gramas; o peso foi obtido com uma balança digital (0,001 grama de precisão). As pós-larvas de camarão foram distribuídas em 24 aquários retangulares (25x40x40 cm) medindo 0,1 m² de área de fundo e volume de 30 litros. Os camarões foram estocados em duas densidades: D1 com 50 pós-larvas/aquário e D2 com 25 pós-larvas/aquário.

Os animais foram alimentados com a dieta experimental, quatro vezes ao dia, numa taxa de alimentação de 10% da biomassa por aquários, sendo que, na densidade de 25 pós-larvas a taxa de arraçoamento foi de $3,6 \cdot 10^{-3}$ gramas; na densidade de 50 pós-larvas, a taxa foi de $7,321 \cdot 10^{-2}$ gramas, durante oito semanas.

4.7 Delineamento experimental

O experimento constou de 2 tratamentos: T1 ração suplementada com a cepa DS-9 de *S. cerevisiae* e T2 controle, com três repetições. Para cada

tratamento foram utilizadas duas densidades (alta e baixa); ausência e presença de vibrio, num esquema fatorial 2x2x2. Conforme esquema abaixo:



Utilizou-se salinidade de 25, por corresponder à concentração salina usualmente utilizada em viveiros, além de apresentar, entre as salinidades altas, os maiores números de UFC/ml. Foram realizadas medições diárias dos parâmetros físico-químicos da água (oxigênio, temperatura) numa frequência de duas vezes ao dia, no período da manhã e final da tarde.

O experimento teve uma duração de 8 semanas. Ao final do experimento coletaram-se os animais de cada unidade experimental (cada aquário) os quais, individualmente, foram secos em papel toalha, contados, medidos com auxílio de paquímetro e pesados, com balança digital, para obtenção da taxa de crescimento, sobrevivência e peso final.

4.8 Ensaio- desafio com Vibrios

O inóculo do *Vibrio alginolyticus* foi preparado em caldo BHI sob agitação contínua por 24 horas. O inóculo foi diluído e as diluições semeadas em Agar marine (Difco) e incubadas a 30°C por 24 horas. Decorrido esse período, foram mensuradas as UFC.

Ralizou-se, inicialmente, uma contaminação numa concentração de 10^7 UFC nos aquários, acrescentado 1 ml do inóculo por litro de água nos tratamentos com presença de vibrio. Após sete dias, foi realizada nova contaminação, seguindo o mesmo procedimento. A contaminação foi observada pela expansão dos cromatóforos e vermelhidão das antenas. A sobrevivência das PL foi avaliada após 15 dias de infecção experimental,

4.9. Análise estatística dos parâmetros zootécnicos experimentais.

Os resultados dos parâmetros zootécnicos e físico-químicos da água foram submetidos ao programa R, realizada análise de variância e teste Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de significância.

Para análise das interações entre os tratamentos nas diferentes densidades de estocagem, primeiramente foi criada uma variável chamada de condição do tratamento. A interação entre os fatores está associada à mudança de comportamento de um fator, nos diferentes níveis do outro fator, com relação à característica de interesse. Pode-se observar que essa variável está balanceada segundo a condição, ou seja, o número de elementos em cada categoria é o mesmo.

5. Resultados

5.1. Teste de viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na ração experimental.

Os efeitos dos microorganismos probióticos são os mesmos da microbiota normal do animal. O que traz benefícios é a utilização de grandes quantidades desses microorganismos que tenham a eficácia comprovada, sendo que estes microorganismos podem ser bactérias, que fazem parte da microbiota do animal, ou outros, como a *Saccharomyces cerevisiae*. Para ser utilizado na suplementação da nutrição de animais aquáticos, os probióticos podem ser incrementados na ração ou incorporados na água de cultivo; quando ofertados na ração ou na água de cultivo, precisam ter sua viabilidade comprovada. No presente estudo, o número de células viáveis encontradas na ração foi de 10^7 UFC/g.; número semelhante ao utilizado por Meurer et al., (2006) em tilápias do Nilo, trabalhando com a *Saccharomyces*.

5.2. Tolerância à salinidade

A variação da pressão osmótica é um fator importante na manutenção da viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*. Pode esta relacionada com a vida celular em alimentos (BENEY, et al., 2000).

Foi observado que houve crescimento celular de *S. cerevisiae* em todas as concentrações, tanto para estirpe DS-9, quanto para 1031, não sendo a salinidade, portanto, um fator letal às leveduras. Houve um aumento do número de colônias inversamente proporcional às concentrações salinas, sendo que, as maiores concentrações de sal, correspondentes a 35 e 30, apresentaram os menores números de UFC/ml, como mostram os gráficos 1 e 2. A salinidade 0apresentou a maior quantidade de UFC/ml, para ambas as estirpes.

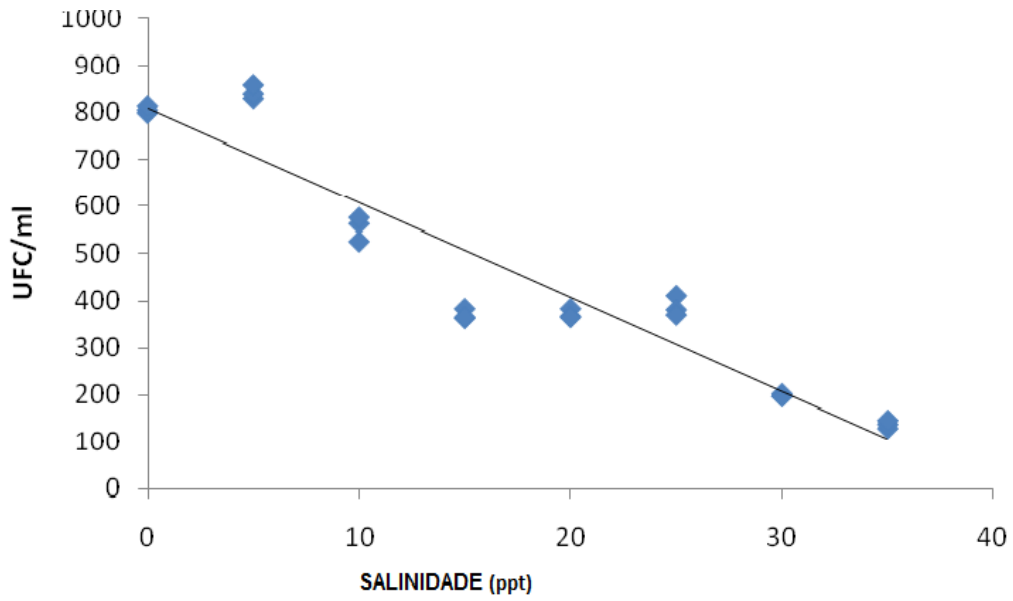


Fig. 1. Número de UFC/ml da estirpe DS9 de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de salinidade.

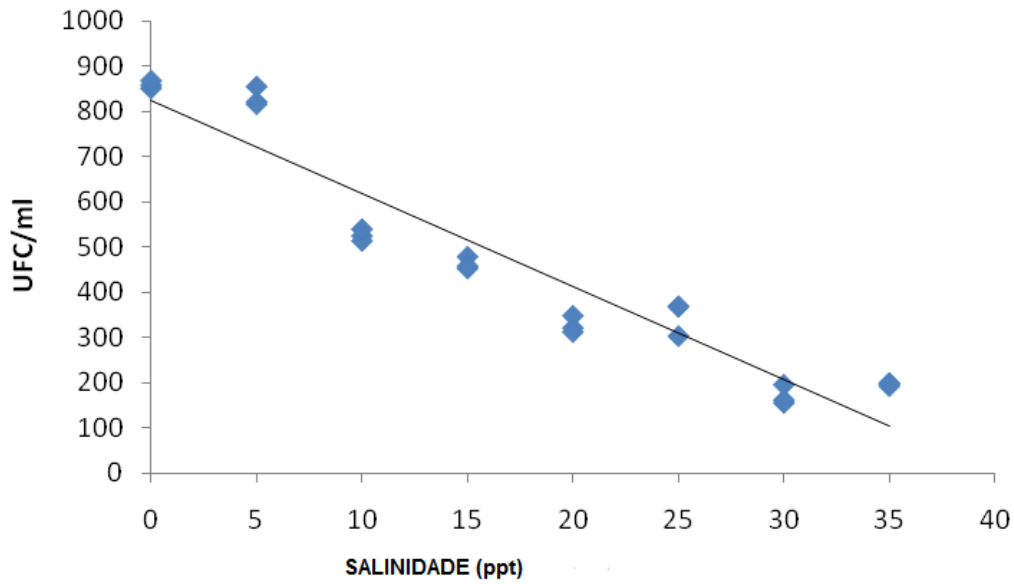


Fig. 2. Número de UFC/ml da estirpe 1039 de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de salinidade.

5.3. Teste de antagonismo

Dentro da carcinicultura, a ocorrência de patógenos nos sistemas de cultivo pode trazer consequências negativas, como perdas na produção, com consequente prejuízo econômico. Entre os organismos que causam enfermidades nos camarões, os vibrios se destacam como principais agentes epidemiológicos, principalmente nas primeiras fases de vida do animal. Um fator importante na utilização de probióticos, é a sua capacidade de inibição de crescimento de microorganismos patógenos; e uma maneira comum de selecionar os probióticos, é através do teste de inibição *in vitro*.

Nos testes antagonismo realizados com as estirpes de levedura DS-9 e 1031, frente aos microorganismos patógenos (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus*), não foi observada a produção de nenhuma substância que inibisse o crescimento desses patógenos. Ao contrário do que é observado para alguns gêneros bacterianos, como os *Lactobacillus spp.* e alguns outros organismos, as leveduras não possuem mecanismos de ação frente a microorganismos patógenos. Baldo et al., (2001) ao pesquisarem o efeito antagônico de cepas de *Saccharomyces*, observaram que as mesmas não foram capazes de inibir o crescimento da *Salmonella sp.*, *in vitro*.

Apesar das leveduras não possuírem um efeito letal contra alguns patógenos, como os vibrios utilizados na presente pesquisa, alguns estudos indicam que a *Saccharomyces cerevisiae* têm mostrado atividades antagônicas contra outros microorganismos, incluindo *Candida albicans*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella* (AUCLAIR, 2001). Brugier e Patte, 1975),. Zbinden et al., (1999), trabalhando com a *Saccharomyces* observaram que a levedura foi capaz de inibir o crescimento de *Salmonella triphimurim* e *Yersinia enterocolítica*, em ensaios *In vitro*.

Em pesquisa realizada no laboratório Lesaffre Développement envolvendo a *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, em meio de cultura apropriada para crescimento de leveduras e patógenos, utilizando diferentes níveis de concentração dos mesmos, mostrou que em níveis mais baixos de patógenos e mais elevados de leveduras, houve inibição do crescimento dos agentes

patogênicos. A inibição pode ser dependente da dose de patógenos e leveduras utilizadas (AUCLAIR, 2001).

5.4 Observações dos parâmetros físico-químicos da água.

Observou-se, pelo teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de significância, que as medianas da temperatura, oxigênio e pH não apresentaram diferença entre as condições de tratamento (p-valor = 0,4404), tabela 1.

Tabela. 1 Estatística descritiva dos valores máximos, mínimos e médios encontrados das variáveis, temperatura, oxigênio e pH.

Variáveis	Mínimo	Máximo	Média
Temperatura	25,98	27,25	26,73
Concentração de oxigênio	8,01	8,91	8,64
pH	7,74	7,95	7,83

A concentração de oxigênio exerce forte influência sobre atividade, crescimento, consumo alimentar e sobrevivência dos camarões. Nos cultivos de *Litopenaeus vannameias* concentrações de oxigênio devem ser mantidas acima de 4ml/L (KUBTZA, 2003;BOYD,2002). Observou-se que a concentração de oxigênio encontrada no experimento foi de, no mínimo 8ml/l, e, no máximo 8,91 ml/l, mantendo-se dentro dos limites considerados ideais. Da mesma forma o valor de pH, apesar de não apresentar distribuição normal, manteve-se dentro dos limites ideais, que variam de 7,7 a 7,9, segundo Wyk e Scarp (1999) e através do teste Kruskal-Wallis constatou-se que não houve diferença significativa entre os

tratamentos ($p=0,9572$). A temperatura manteve-se, na maior parte do experimento, em 26,7°C, temperatura recomendada ideal recomendada para a espécie (Kubtza, 2002).

5.5. Desempenho zootécnico das pós-larvas nos diferentes tratamentos nas densidades de estocagem de 25 e 50 pós-larva/ aquário.

A microbiota bacteriana intestinal de organismos aquáticos, ao contrário dos terrestres, é constituída, basicamente, por bactérias Gram negativas, podendo variar de acordo com o ambiente, escassez de nutrientes, ou pelo uso de organismos probióticos.

Em se tratando de probióticos seus efeitos positivos são mais pronunciados quando os microorganismos utilizados são endêmicos do trato intestinal dos animais avaliados. Além disso, os microorganismos aptos a colonizarem o trato intestinal de camarões, devem se adaptar à especificidade física, química e biótica do ambiente de cultivo e intestinal dos animais. O sucesso da colonização também envolve a competição com outras bactérias, por sítios de ligação, nutrientes e resistências a toxinas.

Diversos autores, pesquisando os efeitos da adição de probióticos tanto na ração como na água de cultivo dos camarões, encontraram resultados satisfatórios de melhora no desempenho zootécnico, principalmente ao utilizarem bactérias pertencentes ao grupo das ácido lácticas. Wang (2007) utilizando dietas enriquecidas com *Bacillus sp.* na alimentação de *Litopenaeus vannamei* observou melhoras significativas na flora bacteriana benéfica, redução da concentração de nitrogênio e fósforo e aumento da produção dos camarões. Zhou et al., (2008) constataram maior sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta enriquecida com probiótico.

Em detrimento aos efeitos positivos das bactérias ácido lácticas, a cepa de levedura DS-9, utilizada no presente experimento, de acordo com os dados obtidos, não apresentou ganhos significativos de desempenho zootécnico das

pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* quando comparados aos camarões alimentados sem probiótico.

Em relação ao parâmetro ganho de peso, quando submetidas aos tratamentos com e sem probiótico e em diferentes densidades de estocagem (25 e 50 pós-larvas/aquário), conforme mostra figura 4, não há diferença significativa entre os tratamentos. Quanto ao crescimento, nesse estudo os animais alimentados com a ração enriquecida com a cepa DS-9 também não apresentaram diferenças significativas, quando comparados aos animais alimentados sem o incremento da levedura, conforme mostra a figura 4. Igualmente para o parâmetro sobrevivência, figura 5.

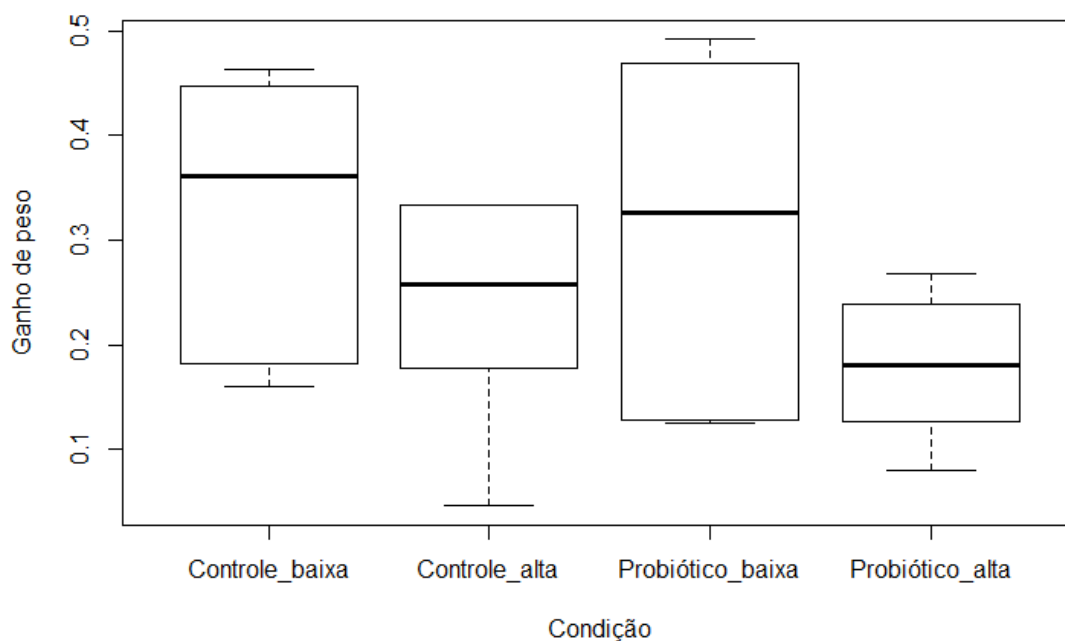


Fig.3. Ganho de peso dos camarões *Litopenaeus vannamei* em relação aos tratamentos com e sem probiótico nas duas densidades de estocagem.

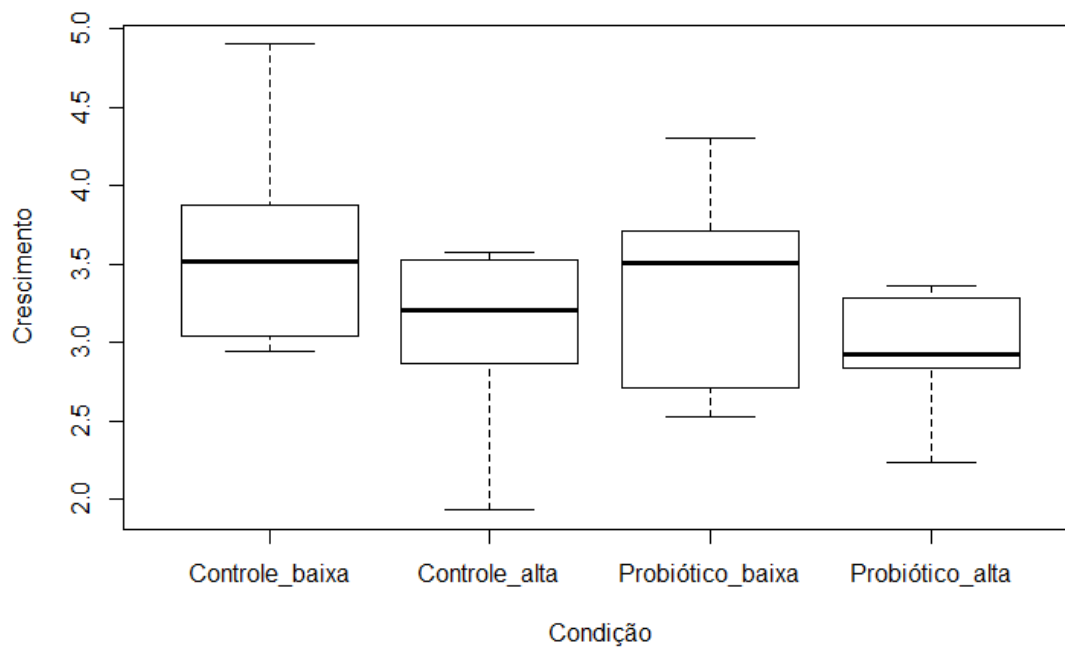


Fig. 4. Crescimento das pós-larvas de camarão *Litopenaeus vannamei* em relação aos tratamentos com e sem probiótico submetidos às duas densidades de estocagem.

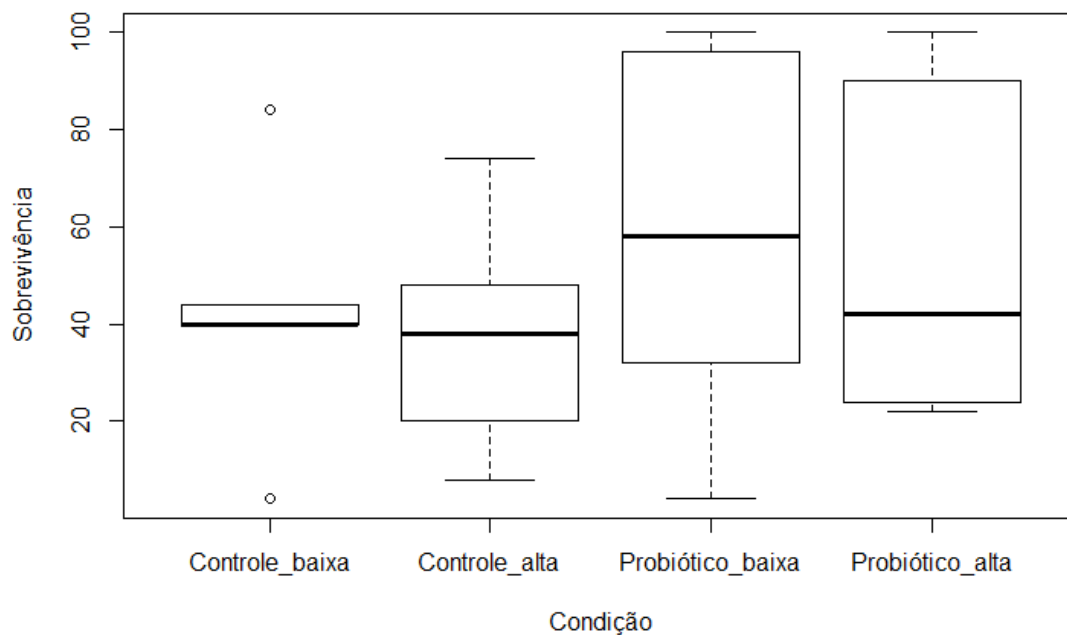


Fig. 5. Sobrevivência das pós-larvas de camarão *Litopenaeus vannamei* em relação aos tratamentos com e sem probiótico nas duas densidades de estocagem.

A escassez de estudos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como promotor de crescimento para camarão, dificulta a comparação de resultados com dados de parâmetros zootécnicos, havendo, portanto, a necessidade de comparação dos seus efeitos com outros organismos aquáticos. Aly et al., (2008) trabalhando com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) não observaram diferenças no crescimento entre os animais alimentados com e sem probiótico. Resultados também análogos aos encontrados por Ziaei Nejad et al., 2006, com *Fenneropenaeus indicus* observaram que os camarões cultivados com probiótico, entre os estágios de Mysis e a P14, não apresentaram diferenças significativas, quanto ao crescimento, quando comparados aos alimentados com dieta sem probiótico. Resultados também corroborados por Ribeiro et al., (1996), que não encontraram diferenças significativas em alevinos de tilápia, alimentados com e sem o uso de probióticos, em diferentes concentrações. Tachibana et al., (2011) também observaram que o desempenho zootécnico dos animais não foram afetados com incremento de probiótico na ração.

Apesar do presente estudo não encontrar respostas positivas ao uso de levedura como probióticos para pós-larva de *Litopenaeus vannamei*, os resultados demonstraram que houve crescimento, ganho de peso e sobrevivência das pós-larvas alimentadas com a *Saccharomyces cerevisiae*, não sendo, portanto, o microorganismo, letal aos camarões.

5.6 Contaminação da água de cultivo por vibrios

Atualmente, as maiores restrições para desenvolvimento da aquicultura sustentável, em fazendas de camarão, são as doenças causadas por agentes infecciosos. Doenças causadas por vibrios têm afetado o cultivo do *Litopenaeus vannamei* mundialmente. No presente estudo, a exposição dos animais a infecção por *Vibrio alginolyticus* não apresentou sintomas de infecção, tais como expansão dos cromatóforos e vermelhidão das antenas e antênulas, quando comparados aos animais não expostos.

De acordo com Soto-Rodriguez et al., (2006) infecções de pós-larvas de peneídeos, por diferentes linhagens de vibrios, têm apresentado resultados contraditórios. Algumas linhagens podem causar mortalidade em concentrações de 10^2 UFC/ml, enquanto outras linhagens não apresentam sintomas de infecção em concentrações superiores a 10^6 UFC/ml. Levando em consideração que o estudo utilizou uma concentração de 10^5 UFC/ml e não foram observados sintomas de infecção, os resultados indicam que a linhagem utilizada de vibrio não afetou o bem estar do animal, nos dias de infecção. Cabe salientar que os vibrios que fazem parte da microbiota dos camarões, são considerados organismos oportunistas, agentes secundários de infecções, que se manifestam quando em situações de estresse desencadeadas por manejo inadequado da água de cultivo.

6. CONCLUSÃO

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas no experimento, mostraram resistir a diferentes concentrações de salinidade, apresentando melhores resultados quando submetidas a baixas concentrações.

Apesar das cepas DS-9 e 1031 de *Saccharomyces cerevisiae* não apresentarem antagonismo frente aos microorganismos patógenos, apenas com a realização de outros testes utilizando diferentes concentrações de Vibrios e levedura, será comprovado a eficiência das leveduras frente aos patógenos.

No experimento com as pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso, crescimento e sobrevivência, entre os tratamentos controle e probiótico. As densidade de 25 Pls/ aquário não obtiveram melhores resultados, quando comparados com altas densidade de 50 Pls/ aquário.

Os animais submetidos à contaminação por *Vibrio* não apresentaram sintomas de contaminação; este resultado pode estar relacionado ao fato dos Vibrios serem organismos oportunistas que se manifestam em condições de má qualidade da água, realidade não observada durante execução do experimento, onde a qualidade da água foi mantida em ótimas condições.

Diante do exposto, recomenda-se que sejam realizadas pesquisas com a *Saccharomyces* em diferentes concentrações de salinidade, de levedura e de patógeno.

7. REFERÊNCIAS

AIY, S.M.; Ahmed Y.A.G.; Ghareeb, A.A.A. & Mohamed, M.M. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, 25(1-2):128-36.

AUCLAIR, E. Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. . 200. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza (Spain). v. 54. p. 45-53.

ALVARO, G. Uso de levedura desidratada sobre o desempenho de carpas comum (*Cyprinus carpio*) na fase de recria.2009. **REDVET**. Revista electrónica de Veterinaria. Pg, 1695-75042009 Vol. 10, Nº 10.

BENEY, L., MARAÑÓN, I.M., MARECHAL, P., GERVAIS, P. Influence of thermal and osmotic stresses on the viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2000. Int. J. **Food Microbiol**. Amsterdam, v. 55, p. 275-279.

BELL, T. A ; LIGHTNER, D.V. **A handbook of histology of penaeid shrimp**: Aquaculture development program. 2000. Tucson, Arizona – USA: **World Aquaculture Society**.

BYERS, B. Cytology of the yeast life cycle. In the Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance (ed. J. N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach), pp. 59-96. Cold Spring Harbor Laboratory Press

CAVALCANTI, F.A.A. Novos arranjos produtivos: a carcinicultura nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte. 2003. 168p. **Tese dissertação- Universidade Federal do Pernambuco- Pernambuco**.

CABALLERO-CÓRDOBA et al. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína de células íntegras ou rompidas mecanicamente. 1997. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n. 8, p. 102-106, maio/ago.

CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; JUNIOR, P. J. D.; LEAL, G. A.; LOGATO, R. V. P. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). 2007. Arq. **Bras. Med. Vet. Zootec**. Belo Horizonte. vol. 59 no. 4

DZIEZAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. 1987. **Food Technology**, v.41, n.2. p. 104-121.

DELSON, A. A.; RANDALL, L.; COOLES, S.; WOODWARD, M. J.; SUNDERLAND, J.; ROE, J. M. Effect of the growth promoter avilamycin on

emergence and persistence of antimicrobial resistance in enteric bacteria in the pig. 2005. **Journal of Applied Microbiology**. pg, 564–571.

FAO. Aquaculture development. The state of World fisheries and aquaculture 2008. Rome: 2009. 176 p.

FAO. Aquaculture development. 4. Ecosystem approach to aquaculture. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries. 2010. No. 5, Suppl. 4. Rome, FAO. 53p.

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

FAO/OMS- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk lactic acid bacteria. Córdoba.

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

HOLZAPFEL, W. H. ; HABERER, P. ; GEISEN, R.; BJORKROTH, J. & SCHILLINGER U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. 2001. **American Journal Clinical Nutrition**, 73 p. 365-373.

HOLTHUIS, L. B. Shrimps and prawns of the World. An annotated catalogue of interest to fisheries. **FAO species catalogue**, Roma:FAO, 1980, v. 1, p. 1-261, 1980.

Fisheries and Aquaculture Department Cultured Aquatic Species Information Programme *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)

HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. Efficacy of probiotics in growout systems. 2000. **The advocate**. p. 12.

JUNIOR, B. C. R.; NETO, O.A. **Camarões marinhos engorda, Reprodução, maturação e larvicultura**. 2001. Ed. Aprenda Fácil. V1. 258p.

LARA-FLORES, M., OLVEA-NOVOA, M. A.; GUZMAN-MENDEZ, B. E. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 2003. **Aquaculture**, Amsterdam. p. 216.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R.H. Probiotics – Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. 1965. **Science**, v. 14, n. 3659, p. 747.

MAGALHAES, M. E. S. Cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em sistema multifásico. 2004. **Tese dissertação- Universidade Federal Rural de Pernambuco- Pernambuco**. 60p.

MOLES, P. ; BUNGE, J. Shrimp farming in Brazil: an industry overview. 2002. Roma: **FAO/WWF/NACA**, 26p.

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. 2001. **Aquaculture**, v.198, p. 229–236.

NOGA, GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGARD, B.; et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. 1999. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.969-9732.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. 2000. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 64.

Pérez-Farfante, I & Kensley, B. Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and spongoid shrimps and prawns of the world. Mémoires du museum national d'histoire naturelle. 1997. pp 233.

RIBEIRO, R.P.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M.; FURUYA, V.B.; SOARES, C.M.. Utilização de diferentes níveis de levedura seca, *Saccharomyces cerevisiae*, em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em cultivo monosséxo. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 9, 1996**.

ROCHA, I.P. Carcinicultura brasileira: desenvolvimento tecnológico, sustentabilidade ambiental e compromisso social. 2007. **Revista da ABCC**, Recife, ano 9.

SANDERSON, G.W.; JOLLY, S.O. The value of Phaffia yeast as a feed ingredient for salmonid fish. 1994. **Aquaculture**, vol. 124. pg, 193-200,

SEBRAE/ESPM. Aquicultura e pesca: camarões. ESTUDOS DE MERCADO 2008 RELATÓRIO COMPLETO. **Sebrae – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**

SILVA, R. P. Fatores interferentes na frequência da vibriose em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) no litoral sul de Pernambuco. **Tese de Dissertação – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura- Pernambuco**, 2007.

SILA, M. M. Avaliação estatística das variáveis de manejo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), na fase de berçário. 2009. 61 p. **Tese dissertação- Universidade Federal do Pernambuco-Pernambuco.**

SOUZA, R.R.P. Digestibilidade aparente da matéria de dietas para o híbrido de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*). 1989. **Dissertação de mestrado.** Piracicaba: ESALQ. 79p.

SOUZA FILHO, J.; COSTA, S. W. da; TUTIDA, L. M.; FRIGO, T. B.; HERZOG, D. **Custo de produção do camarão marinho.** Ed. rev. Florianópolis: Instituto Cepa/SC/Epagri, 2003. 24p. (Cadernos de Indicadores Agrícolas, 1).

SOTO-RODRIGUEZ, SA, N SIMOES, A ROQUE, B GOMEZ-GIL. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. 2006. **Aquaculture**, 258: 109-115.

SCHWAB, B. WEBER, M. LEHMANN, B. key management challenges for the development and growth of a shrimp farm in northeast Brazil: a case study of Camamor Produtos Marinhos 2002. LTDA. ROME: **NACA/WWF/FAO**, 33p.

THOMPSON, F. L.; LIDA, S.; SWINGS, J. Microbiology and molecular biology reviews. 2004., p. 403–431.

TORO, R. C. Uso de bactérias ácido lácticas probióticas na alimentação de camarão *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulante do sistema imune. 2005. **Tese Dissertação – Universidade Federal do Paraná- Curitiba.** 173f

TORTORA, J. G.; FUNKE, R. B.; CASE, L. C. 2005. **Microbiologia.** Ed. ARIMED. 8ª edição. 894p.

Treece, G.D. 2000. Shrimp culture. In: R.R. Stickney (ed). **Encyclopedia of aquaculture.** John Wiley & Sons, New York, pp.798-868

TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals — prejudices, perceptions and realities. 2004. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, pg, 26–27.

VERSCHUER, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. 2000. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.655-671.

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

WANG, Yan-Bo.; XU, Zi-Rong.; XIA, Mei-Sheng. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. V. 71, Issue 5, pages 1036–1041.

8. APÊNDICE

1. Teste de Antagonismo

1.1 Verificação pureza vibrios em TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para consumo da sacarose

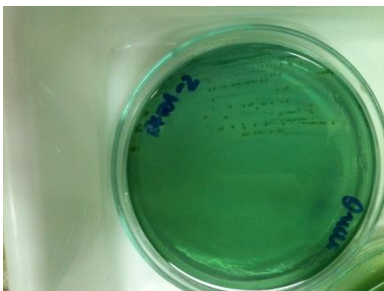


Fig. 6. Verificação pureza em meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para *Vibrio parahaemolyticus*



Fig. 7. Verificação pureza em meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para *Vibrio harveyi*

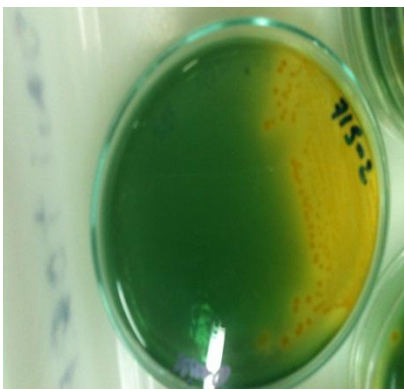


Fig. 8. Verificação pureza em meio de cultura TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) para *Vibrio alginolyticus*.

2. Verificação da pureza pelo GRAM

Lâminas com células bacilos, gram-negativas.

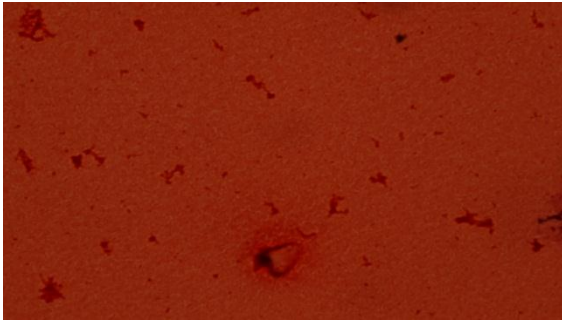


Fig.9 . Coloração Gram *Vibrio parahaemolyticus*

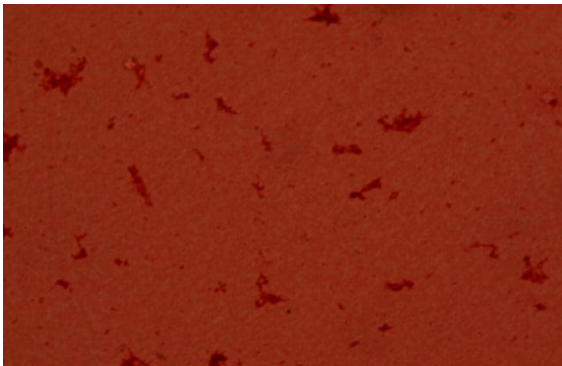


Fig. 10. Coloração Gram *Vibrio harveyi*

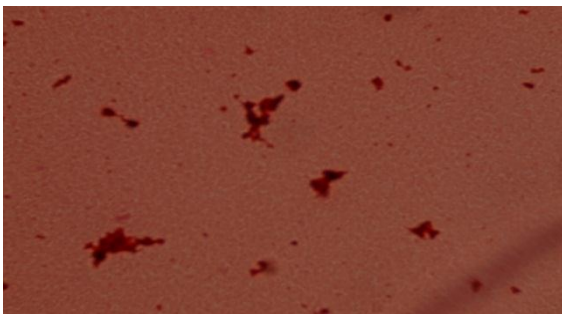


Fig. 11. Coloração Gram *Vibrio alginolyticus*

3. Teste de antagonismos In vitro

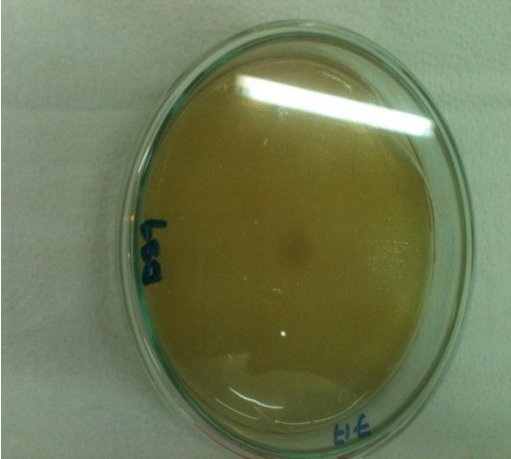


Fig. 12. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com *Vibrio harveyi* x cepa DS-9

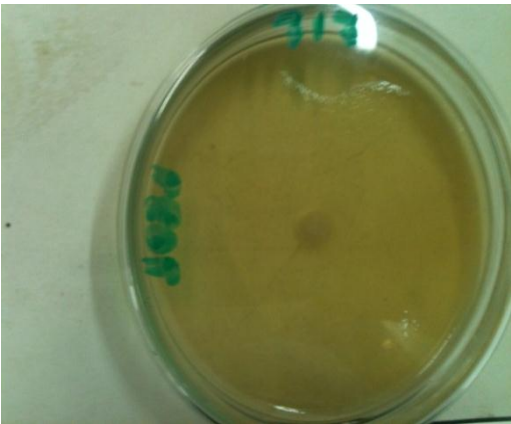


Fig. 13. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com *Vibrio harveyi* x cepa 1031

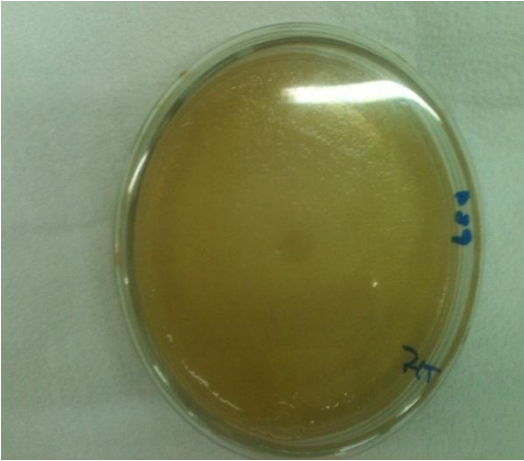


Fig. 14. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com *Vibrio alginolyticus* x cepa DS-9

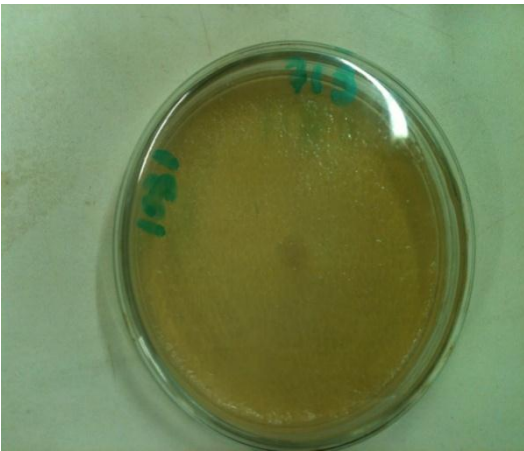


Fig. 15. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com *Vibrio alginolyticus* x cepa 1031

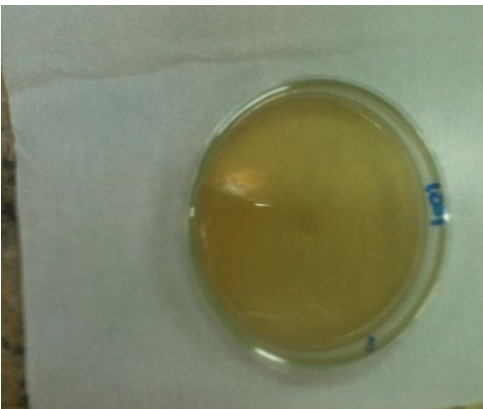


Fig. 16. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com *Vibrio parahaemolyticus* x cepa 1031

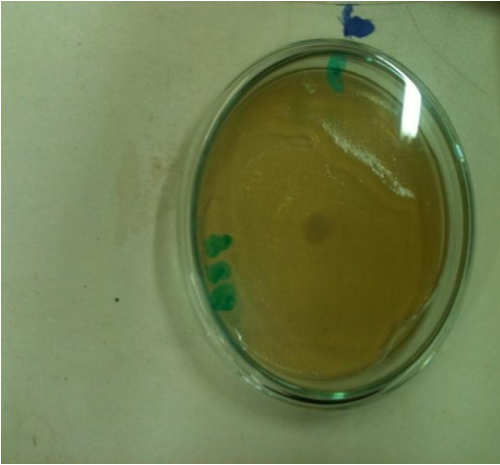


Fig. 17. Observação do halo de inibição no teste de antagonismo com *Vibrio parahaemolyticus* x cepa DS-9

4. Teste de viabilidade na ração

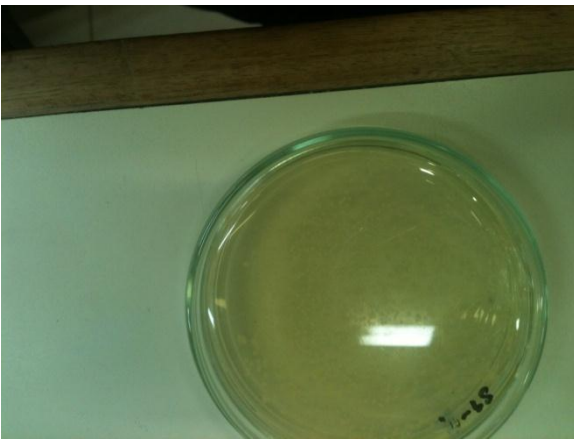


Fig. 18. Teste de viabilidade celular da cepa DS-9 na ração ofertada as pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*