

AValiação DE PROBIÓTICOS SOBRE PARâMETROS DE DESEMPENHO DE PÓS-LARVAS DE *Litopenaeus vannamei*

Aline Horácio da COSTA¹; Karina RIBEIRO²; Walter Pedro SILVA-JÚNIOR¹; Cibele Soares PONTES²

RESUMO

O objetivo do trabalho foi a avaliação da diferença entre o tratamento com o probiótico 1 (P1) e o tratamento com o probiótico 2 (P2) no cultivo larval de *Litopenaeus vannamei*, com duração de 18 dias. O tratamento com o P1 consistiu na adição do probiótico comercial Epicin G2 (Epicore Networks Eastampton, Estados Unidos) contendo *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, *B. pumilus* e *Saccharomyces cerevisiae*. No tratamento com o P2 foi utilizado o probiótico comercial ProBacyl (Bern&Roc Aquacultura Ltda, Ceará-Mirim, Brasil) com uma mistura de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Pediococcus acidilactici* e bactérias probióticas (total). As unidades experimentais consistiram em seis tanques de 15.000 L, e cada tratamento contou com três repetições. Os probióticos foram aplicados diariamente na água, avaliando-se o potencial zootécnico e a resistência a estresse iônico de larvas e pós-larvas (PL). Os parâmetros salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram controlados. As pós-larvas submetidas ao P2 apresentaram valores médios maiores ($p < 0,05$) para comprimento (PL 1 e PL 5), pesos úmido e seco (PL 5) e percentual de metamorfose (90%) em relação às pós-larvas do outro tratamento, e os valores das demais variáveis não diferiram. A sobrevivência final foi de 56,4% e 64,9% para pós-larvas submetidas ao P1 e ao P2, respectivamente. Dessa forma, o probiótico 2 apresentou melhores resultados que o P1 para o cultivo de *L. vannamei* em sistema de larvicultura comercial em algumas fases de desenvolvimento.

Palavras-chave: camarão; cultivo; performance de crescimento; sobrevivência

PROBIOTICS EVALUATION ON PERFORMANCE PARAMETERS OF POST-LARVAE OF *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The objective of the search was evaluation of the difference between treatment with the probiotic 1 (P1) in relation when treatment with probiotic 2 (P2) in the larvae cultivation of the *Litopenaeus vannamei*, these were culture for 18 days. The treatment with P1 consisted in the addition of the commercial probiotic Epicin G2 (Epicore Networks Eastampton, United State) containing *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, *B. pumilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. In the treatment with P2, was utilized commercial probiotic ProBacyl (Bern&Roc Aquacultura Ltda, Ceará-Mirim, Brazil) with a mixture of *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Pediococcus acidilactici* and probiotic bacteria (total). The experimental units consisted of six tanks of 15,000 L, and each treatment had three repetitions. The probiotics were applied daily in the water, evaluating the zootechnical potential and resistance to stress larvae and post-larvae (PL). The parameters salinity, temperature, pH and oxygen dissolved were controlled. The post-larvae submitted for P2 presented medium values higher ($p < 0,05$) to length (PL 1 and PL 5), humid and dry weights (PL 5) and metamorphosis percentage (90%) compared to the other treatment, but as other variables did not differ. The final survival was 56,4% and 64,9% to post-larvae submitted to P1 and P2, respectively. Thus, the probiotic 2 showed better results than P1 for cultivation of *L. vannamei* in commercial hatchery system at some stages of development.

Keywords: shrimp; culture; growth performance; survival

Artigo Científico: Recebido em 24/11/2015 - Aprovado em 18/04/2016

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Campus Natal, Centro de Biociências, Av. Senador Salgado Filho, 3000 - Lagoa Nova - CEP: 59064-741 - Natal (RN), Brasil. E-mail: wp_jr@hotmail.com; linehoracio7@gmail.com (autora correspondente)

² Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Escola Agrícola de Jundiá, RN 160 KM 3, s/n - CEP: 59280-000 - Macaíba (RN), Brasil. E-mail: ribeiro_k@hotmail.com; cibelepontes2006@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Durante muitas décadas, os antibióticos foram utilizados como estratégia para combater doenças em organismos aquáticos e também para aumentar o crescimento e a conversão alimentar (PANDIYAN *et al.*, 2013), o que causou o desenvolvimento e a disseminação de patógenos resistentes (CABELLO, 2006), resultando em fortes críticas quanto à eficácia desses produtos. Desta forma, o uso de antibióticos tem sido desencorajado, ao mesmo tempo em que surgem como uma alternativa sustentável (LAZADO e CAIPANG, 2014), e **vem** sendo extensivamente usados na aquicultura (VINE *et al.*, 2006).

Os probióticos foram definidos originalmente (LILLY e STILLWELL, 1965) como “substâncias produzidas por um protozoário que estimulavam o crescimento de outro”. FULLER (1989) expandiu a definição para “micro-organismos vivos utilizados na alimentação, que afetam beneficemente o animal hospedeiro por melhorar seu balanço microbiano intestinal”. Em uma redefinição, adaptada para a aquicultura, os probióticos são “células microbianas administradas de tal modo a entrar no trato gastrointestinal, sendo mantidas vivas com o objetivo de melhorar a saúde” (GATESOUBE, 1999).

Quando comparados aos animais terrestres, os organismos aquáticos possuem uma relação mais estreita com o ambiente em que vivem (KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008; BARBIERI *et al.*, 2016), de forma que VERSCHUERE *et al.* (2000) definiram os probióticos como sendo “micro-organismos vivos que têm efeito benéfico sobre o hospedeiro, seja modificando a comunidade microbiana associada ao hospedeiro ou ao ambiente, melhorando o consumo ou absorção do alimento, fortalecendo o sistema imunológico ou, ainda, melhorando a qualidade do ambiente de cultivo”.

O aumento do uso de probióticos em cultivos de camarão tem sido relacionado com a busca de uma aquicultura ambientalmente amigável (VINE *et al.*, 2006; KESACORDI-WATSON *et al.*, 2008), e seus efeitos benéficos relatados incluem incremento da decomposição de matéria orgânica, redução das concentrações de nitrogênio e fósforo e controle de amônia, levando a uma menor

incidência de doenças, maior sobrevivência dos animais e consequente aumento da produção (BOYD e MASSAAUT, 1999).

As pesquisas sobre o uso de probióticos em larvicultura de organismos aquáticos iniciaram-se no final da década de 1980 (VINE *et al.*, 2006), e a manipulação da microbiota larval com probióticos tem sido sugerida como uma estratégia para preventivamente colonizar as larvas com micro-organismos benéficos (VERSCHUERE *et al.*, 1999). O uso de probióticos reportado para larvicultura de camarão tem como principais objetivos melhorar o crescimento, a sobrevivência, a atividade enzimática digestiva e a resposta imune (ZIAEI-NEJAD *et al.*, 2006; RAVI *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; SHAILENDER, 2012).

Portanto, como o uso de probióticos vem promovendo grande interesse da indústria da aquicultura (TINH *et al.*, 2008) e uma gama diversificada desse produto está disponível no mercado para os produtores de camarão (AKHTER *et al.*, 2015), é fundamental a realização de estudos que avaliem o uso de probióticos na larvicultura de espécies comerciais de camarão. Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar as diferenças entre os efeitos do tratamento com o probiótico 1 e aqueles do tratamento com o probiótico 2, através do uso de probióticos comerciais de diferentes composições, sobre o potencial zootécnico e resistência a estresse iônico de larvas e pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* cultivadas em escala comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Larvi Aquicultura e Projetos LTDA, um laboratório comercial de produção de pós-larvas de camarão localizado no município de Macau, Rio Grande do Norte. A espécie utilizada no experimento, com duração de 18 dias, foi o camarão marinho *L. vannamei*, nas fases de náuplio V até pós-larva 10 (PL 10).

Povoamento dos tanques

Náuplios em estágio V, em salinidade 35 ppt, foram obtidos em um laboratório de reprodução e produção de larvas de *L. vannamei* e transportados até o local do experimento. Em seguida, foram

lavados, até que toda a água do transporte fosse renovada pela água utilizada na larvicultura, e aclimatados, durante duas horas, para a salinidade 34 ppt, salinidade utilizada no cultivo em função das características da água captada no ambiente pelo laboratório. Posteriormente, foram transferidos para os seis tanques de cultivo com volume de 10.000 L de água; cada unidade experimental recebeu aproximadamente 4.000.000 de náuplios, resultando na densidade de estocagem inicial de, aproximadamente, 400 indivíduos.L⁻¹. À água de cultivo foram adicionadas as microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis* nas concentrações de 4 x 10⁴ células ml⁻¹ e 0,5 x 10⁴ células ml⁻¹, respectivamente. Os tanques de cultivo, com aeração constante, começaram a receber a adição de probióticos na água antes mesmo do povoamento. A água dos tanques foi renovada diariamente a partir do estágio de PL 1, a uma taxa de 90%, sendo retirados do fundo, por sifonagem, os restos de alimento, fezes e mudas.

Procedimento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo as unidades experimentais representadas por seis tanques de 15.000 L. Foram aplicados dois tratamentos, que consistiram em dois tipos de probióticos comerciais, P1 e P2, com composições distintas e três repetições cada um. O tratamento com o P1 consistiu na adição do probiótico comercial Epicin G2 (Epicore Networks Eastampton, Estados Unidos) contendo *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Lactobacillus acidophilus*, *B. pumilus* e *Saccharomyces cerevisiae*. No tratamento com o P2, foi utilizado o probiótico comercial ProBacyl com uma mistura de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Pediococcus acidilactici* e bactérias probióticas (total). Diariamente, em cada tanque,

os probióticos foram adicionados ao cultivo, duas vezes ao dia (8h e 15h), nas quantidades de 2 g.1000 L⁻¹ para ambos os tratamentos.

Manejo alimentar na larvicultura

Em todas as unidades experimentais, diariamente foram efetuadas contagens em câmara de Neubauer para determinar as densidades das microalgas utilizadas (*C. muelleri* e *T. fluviatilis*), realizando-se a complementação das mesmas sempre às 7h e 14h, com o objetivo de manter as densidades, anteriormente estipuladas, nos tanques de cultivo. No estágio de Protozoa 2, iniciou-se a oferta de rações industrializadas. O manejo alimentar seguiu o protocolo determinado pela empresa, que consistiu na oferta de náuplios de *Artemia* a partir do estágio de Protozoa 3 (Z 3), com complementação de dieta seca nos estágios de Misis e Pós-larva (Tabelas 1 e 2). Os náuplios de *Artemia* (Mackay) congelados e vivos foram ofertados, respectivamente, de Z 3 a PL 1 e de PL 2 a PL 8.

Parâmetros físicos e químicos

A salinidade (ppt), temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) foram controlados diariamente, sendo verificados às 7h e 17h, enquanto o pH foi medido nos estágios de Protozoa 1, Misis 1, PL 1, PL 5 e PL 10. Os valores médios estão dentro das condições ideais para o cultivo de *L. vannamei* (VAN WKY e SCARPA, 1999; KUBITZA, 2003; ANDREATTA, 2011; NUNES e ANDREATTA, 2011) (Tabela 3). A salinidade foi monitorada através de refratômetro (pHep5, Hanna instruments), e a temperatura e o oxigênio dissolvido, através de oxímetro (Handy Polaris, OxyGuard), e o pH, com pHmetro (STX-3, Vee Gee Scientific).

Tabela 1. Quantidade de náuplios de *Artemia* ofertados por indivíduo, quantidade de ração (g) por tanque e frequência de arraçamento em cada estágio de *L. vannamei* em cultivo comercial, de acordo com manejo alimentar adotado pela empresa.

Dia	Estágio	Náuplios de <i>Artemia</i> /indivíduo	Quantidade de ração/tanque (g)	Frequência de arraçamento/dia
1	N 5	-	-	-
2	Z 1	-	-	-
3	Z 2	-	24	4 x
4	Z 2	-	40	4 x
5	Z 3	2	78	6 x
6	M 1	17	87	6 x
7	M 2	17	128	8 x
8	M 3	27	168	8 x
9	PL 1	27	184	8 x
10	PL 2	28	286	11 x
11	PL 3	28	319	11 x
12	PL 4	28	363	11 x
13	PL 5	40	385	11 x
14	PL 6	40	450	10 x
15	PL 7	28	480	10 x
16	PL 8	28	500	10 x
17	PL 9	-	660	12 x
18	PL 10	-	684	12 x

Fonte: Larvi Aquicultura e Projetos LTDA; g = grama; N = Náuplio; Z = Protozoa; M = Misis; PL = Pós-larva

Desempenho Zootécnico

O comprimento total foi mensurado nos estágios PL 1, PL 5 e PL 10, relacionados ao 1º, 5º e 10º dia após início da metamorfose das larvas do tanque ao primeiro estágio de pós-larva, em papel milimetrado, sendo para isto coletados aleatoriamente 30 indivíduos de cada unidade experimental. Para a determinação dos pesos úmido e seco, nestes estágios citados, as pós-larvas foram retiradas aleatoriamente, com a ajuda de um bécker, na quantidade de 10 amostras de 15 PLs de cada unidade experimental. No laboratório, as PLs foram secas em papel filtro, embaladas em papel alumínio pré-pesados e, em seguida, pesadas em balança analítica de precisão (AY220, Shimadzu) para a obtenção do peso

úmido. Posteriormente, foram levadas à estufa de circulação forçada e submetidas por 24 h à temperatura de 60 °C; depois, foram novamente pesadas para obtenção do peso seco.

Ao final do experimento foram mensurados o ganho de peso (1) (KURESHY e DAVIS, 2002), a taxa de crescimento específico (2) (TCE) (WU e DONG, 2002) e o percentual de sobrevivência final (3) (adaptado de SILVA *et al.*, 2009):

Em que: Ln = Logaritmo neperiano; P_i = Peso inicial; P_f = Peso final; t = tempo de experimento.

$$1. \text{Ganho de Peso (g)} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

$$2. \text{TCE (\% dia}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Ln } P_f - \text{Ln } P_i}{t} \times 100$$

Tabela 2. Rações ofertadas em cada estágio, em cultivo comercial, de acordo com manejo alimentar adotado pela empresa.

Dia	Estágio	Ração ofertada (Fabricante)
1	N 5	-
2	Z 1	-
3	Z 2	Royal Caviar 5 - 50 (Bernaqua), LZ < 50 (Zeigler), Car 1 (Inve), Minipro 0 (Maripro as)
4	Z 2	Royal Caviar 5 - 50 (Bernaqua), LZ < 50 (Zeigler), Car 1 (Inve), Minipro 0 (Maripro as)
5	Z 3	Royal Caviar 50 - 100 (Bernaqua), LHF 1 (Epicore), LZ < 100 (Zeigler), Minipro 1 (Maripro as), CD 2 (Inve)
6	M 1	Royal Caviar 50 - 100 (Bernaqua), LHF 1 (Epicore), LZ < 100 (Zeigler), Minipro 1 (Maripro as), CD 2 (Inve)
7	M 2	Royal Caviar 100 - 200 (Bernaqua), LHF 2 (Epicore), LZ 100 - 150 (Zeigler), Minipro 1 (Maripro as), CD 3 (Inve)
8	M 3	Royal Caviar 100 - 200 (Bernaqua), LHF 2 (Epicore), LZ 100 - 150 (Zeigler), Minipro 1 (Maripro as), CD 3 (Inve)
9	PL 1	Royal Caviar 100 - 200 (Bernaqua), LHF 2 (Epicore), LZ 100 - 150 (Zeigler), Minipro 1 (Maripro as), CD 3 (Inve)
10	PL 2	Sea Food 200 - 300 (Bernaqua), LHF 2 (Epicore), LZ 100 - 150 (Zeigler), Minipro 2 (Maripro as), PL 150 (Inve),
11	PL 3	Sea Food 200 - 300 (Bernaqua), LHF 2 (Epicore), LZ 150 - 250 (Zeigler), Minipro 2 (Maripro as), PL 150 (Inve),
12	PL 4	Epibal 300 (Epicore), Sea Food 200 - 300 (Bernaqua), LHF 2 (Epicore), LZ 150 - 250 (Zeigler), Minipro 2 (Maripro as), PL 150 (Inve),
13	PL 5	Epibal 300 (Epicore), Sea Food 200 - 300 (Bernaqua), LHF 3 (Epicore), LZ 150 - 250 (Zeigler), Minipro 2 (Maripro as)
14	PL 6	Epibal 300 (Epicore), LZ 250 - 450 (Zeigler), Flake (Mackay), S-PAK 2/5 (Inve)
15	PL 7	Epibal 300 (Epicore), LZ 250 - 450 (Zeigler), Flake (Mackay), S-PAK 2/5 (Inve)
16	PL 8	Epibal 500 (Epicore), LZ 250 - 450 (Zeigler), Flake (Mackay), S-PAK 2/5 (Inve), PL 300 (Inve), Minipro 3 (Maripro as)
17	PL 9	Epibal 500 (Epicore), LZ 250 - 450 (Zeigler), Flake (Mackay), S-PAK 2/5 (Inve), PL 300 (Inve), Sea Food 300 - 500 (Bernaqua)
18	PL 10	Epibal 500 (Epicore), LZ 250 - 450 (Zeigler), Flake (Mackay), S-PAK 2/5 (Inve), Sea Food 300 - 500 (Bernaqua), Minipro 3 (Maripro as)

Fonte: Larvi Aquicultura e Projetos LTDA; N = Náuplio; Z = Protozoa; M = Misis; PL = Pós-larva

Tabela 3. Médias e desvios-padrão de valores dos parâmetros físicos e químicos da água observados nesse estudo.

Parâmetros	Tratamentos	
	Probiótico 1	Probiótico 2
Salinidade (ppt)	32,79 ± 1,21	32,85 ± 1,34
Temperatura (°C)	29,18 ± 0,64	29,41 ± 0,58
pH	7,65 ± 0,23	7,69 ± 0,26
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	6,59 ± 0,60	6,52 ± 0,65

$$3. \text{ Sobrevivência (\%)} = \frac{N_f}{N_i} \times 100$$

Em que: N_i = Número de larvas no início do experimento; N_f = Número de pós-larvas estimadas no final do experimento.

Para determinar N_f , a população de cada unidade experimental foi concentrada em três caixas de 500 L cada uma. Após homogeneização, foram coletadas quatro amostras de água de 145 ml e contadas as pós-larvas presentes. Posteriormente, estimou-se o número total de animais a partir das médias obtidas.

Para calcular o percentual de metamorfose, foram coletados 50 indivíduos, aleatoriamente, de cada tanque no 9º e 10º dia de cultivo, avaliando-se assim o perfil de natação e a anatomia externa para determinar o estágio de desenvolvimento no qual se encontrava o animal.

Teste de estresse (adaptado de TACKAERT *et al.*, 1989)

Realizou-se teste de estresse a partir de choque iônico. Desta forma, 30 indivíduos foram retirados aleatoriamente de cada unidade experimental e colocados em água doce por 30 minutos, retornando para a água salgada por igual período de tempo. Logo em seguida verificou-se a sobrevivência em cada uma das amostras.

Análise Estatística

Todos os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidade (Levene) e independência (gráfico dos resíduos x ordem de coleta). Para as variáveis que não apresentaram violações sérias dos pressupostos exigidos foi aplicado o teste t de Student (paramétrico). Para as variáveis que tiveram problemas nesse diagnóstico, foram utilizados U de Mann-Whitney, qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher (não-paramétricos). Em todos os testes, o nível de significância adotado foi 0,05 e o software utilizado foi o MINITAB 17. A sobrevivência final foi analisada descritivamente.

RESULTADOS

Desempenho Zootécnico

Nos estágios PL 1 e PL 5, referentes ao 9º e 13º dia de experimento, as pós-larvas que receberam o probiótico 2 apresentaram valores médios de comprimento (Tabela 4) maiores do que aqueles apresentados pelas pós-larvas tratadas com o probiótico 1 (teste t de Student, $p < 0,05$). No estágio PL 10 (décimo oitavo dia de experimento), não houve diferença estatística entre os tratamentos (teste t de Student, $p > 0,05$). Animais dos estágios PL 1 e PL 10 não diferiram entre os tratamentos para os valores médios de peso úmido (respectivamente, testes t de Student e U de Mann-Whitney, $p > 0,05$). Já em estágio PL 5 houve diferença entre os tratamentos (teste t de Student, $p < 0,05$). Em relação ao peso seco, o resultado foi o mesmo (Tabela 4). Os valores médios de ganho de pesos úmido e seco (Tabela 4) não apresentaram diferenças entre os dois tratamentos (teste t de Student, $p > 0,05$) e, em relação à TCE, os valores médios encontrados (Tabela 4) também não diferiram entre os tratamentos aplicados (teste t de Student, $p > 0,05$).

Os percentuais de metamorfose (Figura 1) encontrados no nono dia de experimento não diferiram entre os tratamentos (teste Qui-quadrado χ^2 , $p > 0,05$). No entanto, no décimo dia, o percentual encontrado nas unidades experimentais que receberam o probiótico 2 (90%) foi significativamente superior ao apresentado nas unidades que receberam o probiótico 1 (78%) (teste Qui-quadrado χ^2 , $p < 0,05$). Vale ressaltar que o intervalo de 95% de confiança para essa diferença é [3,8%; 20,2%], e a chance de a larva virar pós-larva no décimo dia de experimento utilizando o probiótico 2 é 2,5 vezes maior do que utilizando o probiótico 1.

A diferença no percentual de sobrevivência (Tabela 5) para as pós-larvas submetidas aos probióticos 1 e 2 corresponde a, aproximadamente, 340.000.

Tabela 4: Desempenho zootécnico observado nas pós-larvas nos tratamentos aplicados.

Variável	Tratamentos	
	Probiótico 1	Probiótico 2
Comprimento total (mm)		
PL 1	4,66 ± 0,58 ^a	4,83 ± 0,52 ^b
PL 5	6,02 ± 0,67 ^a	6,22 ± 0,58 ^b
PL 10	8,13 ± 0,68 ^a	8,00 ± 0,86 ^a
Peso úmido (mg)		
PL 1	5,46 ± 1,42 ^a	6,29 ± 3,99 ^a
	10,08 ±	12,20 ±
PL 5	1,80 ^a	4,88 ^b
	27,55 ±	27,56 ±
PL 10	4,15 ^a	5,62 ^a
Ganho de peso úmido (mg)	22,72 ±	21,27 ±
	3,90 ^a	6,16 ^a
TCE (peso úmido) % dia⁻¹	9,80 ± 1,49 ^a	8,69 ± 2,26 ^a
Peso seco (mg)		
PL 1	0,91 ± 0,37 ^a	0,89 ± 0,38 ^a
PL 5	1,91 ± 0,49 ^a	2,33 ± 0,60 ^b
PL 10	6,41 ± 0,89 ^a	6,57 ± 1,34 ^a
Ganho de peso seco (mg)	5,64 ± 0,88 ^a	5,68 ± 1,19 ^a
	12,11 ±	11,63 ±
TCE (peso seco) % dia⁻¹	2,16 ^a	2,57 ^a

*PL: pós-larva; Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa ao nível de 5% entre os tratamentos.

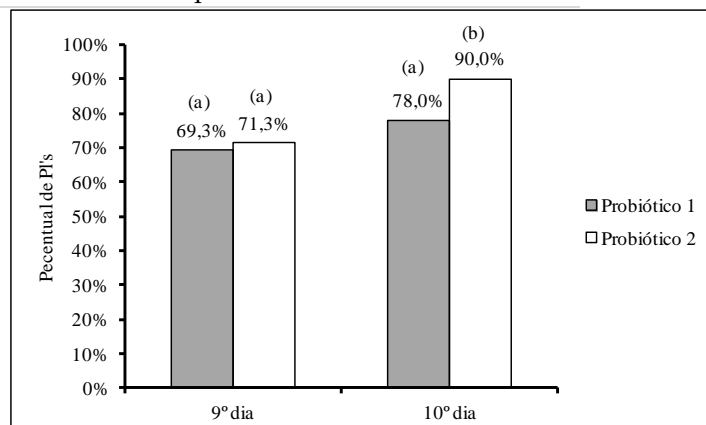
Teste de estresse

Os indivíduos submetidos ao teste de estresse por choque salino em Protozoa 1, Misis 1, PL 1 e PL 5 apresentaram mortalidade de 100%. O único estágio que apresentou sobrevivência foi PL 10 (Tabela 5), mas os percentuais encontrados para as PLs sobreviventes não diferiram entre os tratamentos (teste exato de Fisher, $p > 0,05$).

Tabela 5: Percentuais de sobrevivência final e de pós-larvas submetidas ao teste de estresse por choque salino em PL 10.

Variável	Tratamentos	
	Probiótico 1	Probiótico 2
Sobrevivência final (%)	56,4	64,9
Sobrevivência após teste de estresse em PL* 10 (%)	93,5 ^a	91 ^a

*PL: pós-larva; Letras iguais sobrescritas indicam diferença não significativa no nível de 5% entre os tratamentos.

**Figura 1.** Percentuais de metamorfose encontrados no 9º e 10º dia de experimento.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas no nível de 5% através do teste Qui-quadrado (χ^2).

DISCUSSÃO

Segundo Luo *et al.*, *apud* LUIS-VILLASEÑOR *et al.* (2012), a microbiota interna dos animais aquáticos cultivados está relacionada e é influenciada pela comunidade bacteriana presente no ambiente de cultivo, interferindo totalmente na nutrição, imunidade e resistência a doenças. Dessa forma, para que os organismos aquáticos permaneçam saudáveis, repercutindo positivamente na produção, é necessário um propício ambiente de cultivo, que pode ser conseguido, por exemplo, através da adição de bactérias benéficas.

NIMRAT *et al.* (2012) investigaram os efeitos de diferentes composições de *Bacillus* spp sobre o crescimento e sobrevivência de estágios larvais e pós-larvais de *L. vannamei*. No estágio pós-larval, todos os tratamentos com probióticos apresentaram melhores resultados que o grupo controle (sem adição de probiótico). Esses autores também observaram diferenças, entre os próprios tratamentos com probióticos utilizados, para os valores de peso final, comprimento final e percentuais de ganho de peso e comprimento, diferindo dos dados obtidos nesse experimento, que mostrou diferenças apenas em PL 1 e PL 5. ZIAEI-NEJAD *et al.* (2006) relataram que o peso úmido e a sobrevivência do camarão *Fenneropenaeus indicus* nas fases de misis 1 a PL 14 não diferiram ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos utilizados (probiótico comercial adicionado na

água ou na alimentação, através de artêmia enriquecida), embora ambos tenham sido superiores aos do grupo controle.

RENGPIPAT *et al.* (1998) também verificaram que pós-larvas de *Penaeus monodon* alimentadas com dietas contendo probióticos *Bacillus* sp. não diferiram no crescimento e sobrevivência entre os três tratamentos com probióticos utilizados, mas os valores encontrados nesses tratamentos foram superiores aos do grupo controle. Em outro estudo com camarões de água doce, pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* que foram alimentadas com dietas suplementadas com *L. acidophilus*, *L. sporogenes* e *L. sporogenes* não apresentaram diferença ($p > 0,05$) para ganho de peso e taxa de crescimento específico entre os tratamentos com probióticos (VENKAT *et al.*, 2004).

NIMRAT *et al.* (2011) observaram que o crescimento e as taxas de crescimento específico e de sobrevivência em pós-larvas (PL 1 a PL 21) do camarão-branco não diferiram entre alguns tratamentos com probióticos utilizados no experimento, assim como o observado no presente estudo, quando a taxa de crescimento específico, o comprimento final, o peso final e os ganhos de peso não diferiram entre os tratamentos utilizados. Em outro estudo, juvenis de *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com *Bacillus subtilis*, cepas L10 and G1 também não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) para os valores médios de peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico (ZOKAEIFAR *et al.*, 2012).

A taxa de desenvolvimento larval está intrinsicamente relacionada à metamorfose e, no estudo realizado por LUIS-VILLASEÑOR *et al.* (2011), a taxa de desenvolvimento larval de *L. vannamei* não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos com adição de probióticos comerciais, sendo um deles utilizado nesse estudo: o probiótico 1. O mesmo pode ser observado no presente estudo para o nono dia de cultivo, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre os percentuais de metamorfose encontrados. No entanto, no mesmo estudo, corroborando o resultado deste estudo para o décimo dia, larvas submetidas aos tratamentos com quatro cepas isoladas de *Bacillus* apresentaram diferença ($p > 0,05$) para a taxa de desenvolvimento larval entre os tratamentos (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011), ou seja, algumas

bactérias probióticas podem propiciar melhores taxas de desenvolvimento larval do que outras, o que para uma larvicultura em escala comercial é de grande importância. Estudos realizados por GUO *et al.* (2009) determinaram que o uso de *B. fusiformis* aumentou a sobrevivência e acelerou a metamorfose de larvas de *P. monodon* e *L. vannamei*.

Com relação à sobrevivência, o percentual obtido nos tanques que receberam o probiótico 2 foi semelhante ao encontrado no estudo realizado por CASTEX *et al.* (2009), os quais obtiveram taxa de sobrevivência final de 64% para tanques que receberam dieta suplementada com cepas de *P. acidilactici* (espécie contida apenas no probiótico 2) no cultivo de *L. stylirostris*. Em resultados similares aos encontrados no presente estudo, larvas de *L. vannamei* submetidas ao probiótico *Bacillus* YC5-2 apresentaram sobrevivência de 67%, seguida de, aproximadamente, 57% para aquelas submetidas ao probiótico comercial Alibio (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011).

O teste de estresse, bastante utilizado pelos laboratórios comerciais, consiste numa ferramenta útil durante o processo produtivo, pois possui a capacidade de distinguir pós-larvas saudáveis de outras debilitadas. A capacidade osmorregulatória de larvas de camarões peneídeos é limitada, diferentemente daquela de juvenis e adultos, e a habilidade para tolerar baixas salinidades se desenvolve somente após a metamorfose para pós-larva, aumentando com a idade (SAMOCHA *et al.*, 1998). Portanto, essas podem ter sido as causas das mortalidades nos estágios larvais e nos pós-larvais PL 1 e PL 5. No estudo realizado por BUGLIONE *et al.* (2008), as pós-larvas de *L. vannamei* que tiveram alimentação suplementada por *L. plantarum* apresentaram 87,86% de sobrevivência após teste de estresse salino em PL 20, sendo o percentual observado inferior aos encontrados nesse estudo. LIU *et al.* (2010) afirmaram que a utilização de probióticos melhora a resistência ao estresse tanto em peixes quanto em camarões, em especial *L. vannamei*.

CONCLUSÃO

Dentre os probióticos comerciais utilizados no estudo, o probiótico 2 apresentou melhores resultados que o P1 para o cultivo de *L. vannamei*

em sistema de larvicultura comercial, quando avaliados os estágios de PL 1 e PL 5. Entretanto, ao término do experimento (PL 10), os parâmetros de crescimento (comprimento, peso, taxa de crescimento específico e ganho de peso) avaliados não diferiram entre os dois tratamentos. Recomenda-se que a decisão do produtor de utilizar o probiótico leve em consideração a viabilidade econômica e a facilidade de obtenção do produto.

REFERÊNCIAS

- AKHTER, N.; WU, B.; MEMON, A. M.; MOHSIN, M. 2015 Probiotics and prebiotics associ. with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology* 45(2): 733-741.
- BARBIERI, E.; DE MEDEIROS, A.M. Z.; HENRIQUES, M.B. 2016 Oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile pink shrimp in culture: temperature effects. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(1): 19-25.
- BOYD, C.E. and MASSAUT, L. 1999 Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering* 20(2): 113-132.
- BUGLIONE, C.C.; PEDROTTI, F.; VIEIRA, F.N.; SEIFERT, W. Q.; MOURIÑO, J. L.; MARTINS, M. L. 2008 Avaliação de bacterina e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção experimental por *Vibrio harveyi* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 45: 40-45.
- CABELLO, F.C. 2006 Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiology* 8: 1137-1144.
- CASTEX, M.; LEMAIRE, P.; WABETE, N.; CHIM, L. 2009 Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture* 294(3): 306-313.
- FULLER, R. 1989 A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- GATESOUBE, F.J. 1999 The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180(1): 147-165.
- GUO, J.; LIU, K.; CHENG, S.; CHANG, C.; LAY, J.; HSU, Y.; YANG, J.; CHEN, T. 2009 Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquaculture Research* 40(5): 609-618.
- KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. 2008 Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274(1): 1-14.
- KUBITZA, F. 2003 *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. 1ª ed. Jundiaí: São Paulo. 229 p.
- KURESHY, N. and DAVIS, D.A. 2002 Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 204: 125-143.
- LAZADO, C.C. and CAIPANG, C.M.A. 2014 Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. *Aquaculture* 424-425: 53-62.
- LILLY, D.M. and STILLWELL, R.H. 1965 Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147(3659): 747-748.
- LIU, K.F.; CHIU, C.H.; SHIU, Y.L.; CHENG, H.; LIU, C.H. 2010 et al. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 28(5-6): 837-844.
- LUIS-VILLASEÑOR, I.E.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, M.E. ; GÓMEZ-GIL, B.; ASCENCIO-VALLE, F.; CAMPA-CÓRDOVA, Á.I. 2011 Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321(1): 136-144.
- LUIS-VILLASEÑOR, I.E.; CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; ASCENCIO-VALLE, F.J. 2012 Probiotics in Larvae and Juvenile Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. In: Rigobelo, E. C. *Probiotics*. InTech, Chapter 27.
- NEJAT, N. 2012 Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 33(4): 683-689.
- NIMRAT, S.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. 2011 Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus*

- vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology* 169(3): 244-258.
- NIMRAT, S.; SUKSAWAT, S.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. 2012 Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology* 159(3-4): 443-450.
- NUNES, H.R. e ANDREATTA, E.R. 2011 Efeito da salinidade e temperatura sobre a taxa de metamorfose de náuplios para protozoa e sobre a qualidade das larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Atlântica* 33(1): 87-96.
- PANDIYAN, P.; BALARAMAN, D.; THIRUNAVUKKARASU, R.; GEORGE, E.G.J.; SUBARAMANIYAN, K.; MANIKKAM, S.; SADAYAPPAN, B. 2013 Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today* 5(1): 55-59.
- RAVI, A.; MUSTHAFI, K.S. ; JEGATHAMMAL, G.; KATHIRESAN, K.; PANDIAN, S.K. 2007 Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters In Applied Microbiology* 45(2): 219-223.
- RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P. 1998 Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167 (3-4): 301-313.
- SAMOCHA, T.M.; GUAJARDO, H.; LAWRENCE, A.L.; CASTILLE, F.L.; SPEED, M.; MCKEE, D.A.; PAGE, K.I. 1998 A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture* 165(3-4): 233-242.
- SHAILENDER M*, K.P. 2012 Effect of probiotics on growth and survival of post larvae of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *International Journal of Bioassays* 1(12): 184.
- SILVA, B.C.; BELETTINI, F.; BUGLIONE NETO, C.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; ANDREATTA, E.R.; DERNER, R.B.; MOURIÑO, J.L.P.; ANDRÉ, R.C. 2009 Utilização de *Thalassiosira weissflogii* em larvicultura de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). *Atlântica* 31: 39-50.
- TACKAERT, W.; ABELIN, P.; LEGER, P.H.; SORGELOOS, P. 1989 Stress resistance as a criterion to evaluate quality of post-larval shrimp reared under different feeding procedures. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, 3, João Pessoa, 1989. Anais... João Pessoa: MCR Aquacultura.
- TINH, N.T.N.; DIERCKENS, K.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. 2008 A Review of the Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. *Marine Biotechnology* 10: 11-12.
- VAN WYK, P. and SCARPA, J. 1999 Water quality and management. In: VAN WYK, P. et al. (Ed.). *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems*. Florida department of agriculture and consumer services, Tallahassee: 128-138.
- VENKAT, H.K.; SAHU, N.P.; JAIN, K.K. 2004 Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 35(5): 501-507.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; HUYS, G.; DHONT, J.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 1999 Microbial Control of the Culture of *Artemia* Juveniles through Preemptive Colonization by Selected Bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2527-2533.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000 Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4): 655-671.
- VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. 2006 Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30(3): 404-427.
- WU, L. and DONG, S. 2002 Effects of protein restriction with subsequent realimentation on growth performance of juvenile Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Aquaculture* 210(1-4): 343-358.
- ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. 2009 Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287(3-4): 349-353.
- ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M.H.; TAKAMI, G.A.; LOVETT, D.L.; MIRVAGHEFI, A.; SHAKOURI, M. 2006 The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp

Fenneropenaeus indicus. *Aquaculture* 252(2-4): 516-524.

ZOKAEIFAR, H.; BALCÁZAR, J. L.; SAAD, C. R.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K.; ARSHAD, A.; NEJAT, N. 2012 Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 33(4): 683-689.