



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO NO CULTIVO
SUPER-INTENSIVO DO CAMARÃO-BRANCO
(*Litopenaeus vannamei*) EM UM SISTEMA SEM
RENOVAÇÃO DE ÁGUA**

GUSTAVO QUEIROZ LIMA DE VITA

FURG
RIO GRANDE, RS.
2008

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO NO CULTIVO SUPER-INTENSIVO DO
CAMARÃO-BRANCO (*Litopenaeus vannamei*) EM UM SISTEMA SEM
RENOVAÇÃO DE ÁGUA

Gustavo Queiroz Lima de Vita

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura no Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Junior

Rio Grande – RS – Brasil

Fevereiro, 2008

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	21
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

“Cantar a beleza de ser um eterno aprendiz”
(Gonzaguinha)

Dedico este trabalho aos meus pais, na eterna luta pela minha felicidade e sucesso, Dinorah e José Roberto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, luz da minha vida;

Ao Dr. Wilson Wasielesky Junior, pelos indispensáveis conselhos, pessoais e profissionais, buscando sempre minha evolução como profissional e cidadão;

Ao Dr. Sílvio Peixoto, por ter contribuído de forma essencial nos meus primeiros passos no mundo científico;

À Dra. Maude por aceitar o convite de participação na banca examinadora e por valiosas sugestões na elaboração do manuscrito;

Ao Dr. Paulo Abreu por ceder as instalações do laboratório sob sua coordenação para que fossem realizadas algumas análises;

Ao Dr. David J.W. Moriarty por ter nos auxiliado na utilização do probiótico;

A Eduardo Ballester, sempre disposto a ensinar e passar o que for necessário, tanto para o desenvolvimento da pesquisa quanto para elaboração da dissertação;

Ao amigo Charles, braço direito durante a fase experimental;

À Ana Paula, não poderia deixar de agradecê-la pela companhia durante o mestrado;

Aos amigos conquistados no laboratório. Na ausência destes, esta conquista se tornaria muito mais complicada: Cíntia, Diana, Adriana, Shei, Geraldamas, Klebinho, Renatones, Ângela, Adriana, Paulinha, Marlon, Ricardo, Vivi, Oka, João Sampaio;

Ao amigo Arnaldo (Pecinha), pelos seus ricos ensinamentos;

Ao Neve, um grande amigo que conquistei que me fez aprender amar as coisas mais simples da vida, o que veio a ser essencial no decorrer do mestrado;

Aos amigos de longa data, Diogo e Maurício, sem estes caras eu teria ido embora na primeira semana;

Ao Seu Hermes, por abrir seu imenso coração sempre que fosse preciso;

A todos os funcionários da EMA, em especial Getuliamas, Santa Casa, Pita e Zezinho;

Ao Laboratório de Nutrição Animal pelas análises bromatológicas;

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do probiótico tanto na qualidade de água, como no crescimento e conversão alimentar de *Litopenaeus vannamei* cultivado em um sistema super-intensivo sem renovação de água na presença de flocos microbianos. Para tanto, durante 30 dias experimentais, juvenis de *L. vannamei* com peso médio inicial de $0,047 \pm 0,024$ g foram cultivados em 8 tanques retangulares de concreto pintados com tinta epoxi ($1,43 \text{ m}^2$, 750 L) em uma densidade de 300 camarões/ m^2 em 2 tratamentos com 4 réplicas. No tratamento Probiótico (P) foi aplicada uma dose inicial de 2 ppm seguida de doses diárias de 0,5 ppm de probiótico (um produto comercial composto por $5,0 \times 10^5$ ufc/g de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheiniiformis*; ProW INVE®). Nos tanques do tratamento controle (C) os camarões foram cultivados sem adição de probiótico. Para o desenvolvimento do floco microbiano, todos os tanques foram fertilizados com uma aplicação inicial de melação e farelo de trigo como fontes de carbono para incentivar o crescimento de bactérias heterotróficas. Além disso, durante o período experimental, a concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN) foi monitorada para que fosse calculada a quantidade de melação a ser adicionado, assumindo que 6 g de carbono são necessárias para converter 1 g de TAN em biomassa bacteriana. Ao final do experimento, o material em suspensão (floco microbiano) foi coletado para análise de composição bromatológica. Não houve diferença significativa entre os parâmetros de qualidade de água monitorados em ambos os tratamentos durante o período experimental. A sobrevivência e conversão alimentar não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Da mesma forma, a sobrevivência e o fator de conversão alimentar não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Porém, os camarões cultivados no tratamento Probiótico apresentaram peso médio final significativamente maior ($p < 0,05$) ($0,78 \pm 0,32$ g) em relação ao controle ($0,66 \pm 0,21$ g). A composição bromatológica do floco microbiano no tratamento com probiótico apresentou proteína e extrato etéreo significativamente maior que o controle, o que pode ter proporcionado o melhor desempenho dos camarões. Portanto, a utilização de probióticos em meio heterotrófico pode ser recomendada como alternativa para melhorar a qualidade nutricional do floco microbiano e a performance dos camarões.

ABSTRACT

This study aimed to assess the effect of the use of a probiotic (selected strains of beneficial bacteria) in the water quality, and performance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system. Thus, during a 30 days trial, *L. vannamei* juveniles with an initial mean weight of 0.047 ± 0.024 g were reared in 8 epoxy painted square concrete tanks (1.43 m^2 , 750 L) at a density of 300 shrimp/ m^2 in two treatments with four replicates. In the treatment Probiotic (P) it was applied an initial dose of 2 ppm followed by daily applications of 0.5 ppm of the probiotic (a commercial product containing 5.0×10^5 cfu of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*; ProW INVE®). In tanks from the control treatment (C) shrimp were reared without probiotic addition. For microbial floc development, all tanks were fertilized with an initial appliance of molasses and wheat bran as Carbon sources to boost heterotrophic bacteria growth, furthermore, during the experimental period total ammonia nitrogen concentration (TAN) was monitored in order to calculate the amount of molasses to be added, assuming that 6g of Carbon are needed to convert 1g of TAN into bacterial biomass. At the end of the trial suspended material (microbial floc) was collected for proximate composition analysis. There were no significant differences among water quality parameters monitored in both treatments throughout the experimental period. As well, survival and feed conversion rate did not showed significant differences between treatments. However, shrimp reared in the Probiotic treatment achieved significant higher ($p < 0.05$) mean final weight (0.78 ± 0.32 g) than shrimp reared in the Control treatment (0.66 ± 0.21 g). Proximate composition analysis of the microbial floc from the Probiotic treatment showed significantly higher ($p < 0.05$) protein and lipid content than the control, which is a possible reason for the better performance of shrimp reared in the presence of probiotic. Therefore, the use of the probiotic in a zero exchange heterotrophic system is recommended as a way to improve microbial floc nutritional quality and enhance shrimp performance.

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisadores do mundo todo se depararam com a necessidade de criar alternativas para a produção de alimentos de origem animal com menor impacto ambiental. Na aquicultura, algumas atividades têm sido alvo de críticas por danos causados ao oceano e recursos costeiros, destruição de ecossistemas circundantes, descarga de efluentes, invasão de espécies exóticas, disseminação de patógenos e grande dependência de farinha de pescado como fonte de proteína (Naylor et al. 2000; Boyd 2003).

Custos excessivos e degradação da qualidade da água são fatores influenciados principalmente pela alta quantidade de nitrogênio protéico administrado em sistemas aquícolas. Os efluentes dos viveiros de cultivo são tipicamente ricos em sólidos suspensos, nutrientes orgânicos particulados, nutrientes inorgânicos dissolvidos e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), com as concentrações determinadas principalmente pelos alimentos adicionados (Sandifer & Hopkins 1996). Entretanto, a partir da década de 90, pesquisas nos Estados Unidos demonstraram a possibilidade de se cultivar camarões com pouca ou nenhuma renovação de água (Hopkins et al. 1993).

Nunes & Parson (1998) calcularam que apenas 17 % dos nutrientes da ração são despesados como biomassa de camarões ao final do ciclo, o restante acaba sendo perdido para o sedimento e, juntamente com fezes e outros materiais senescentes acumulando-se na forma de detritos orgânicos nas unidades de cultivo. Segundo Lin & Chen (2001), a mineralização destes detritos e a excreção dos animais cultivados resultam em aumento da concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN) no sistema.

Microrganismos desempenham funções em sistemas de aquicultura que estão relacionadas com o crescimento dos organismos cultivados, manutenção da qualidade da água, controle do acúmulo de sedimento e mitigação dos riscos de introdução de doenças (Bratvold & Browdy 1998). Segundo Moriarty (1997), a cadeia alimentar microbiana é parte integrante de todos os viveiros e tem impacto direto na produtividade dos organismos cultivados. Thompson et al. (2002) concluíram que nutrientes essenciais para os camarões podem ser fornecidos por meio de microrganismos presentes no ambiente de cultivo, complementando a alimentação e reduzindo custos.

Especificamente nos sistemas de produção sem renovação de água a comunidade microbiana é essencial para a manutenção da qualidade da água e como fonte de alimento para os organismos cultivados (Burford et al. 2004, Wasielesky et al. 2006). Neste sistema super-intensivo de cultivo, os animais apresentam um desempenho adequado mesmo com a utilização de dietas com teor protéico abaixo de sua exigência (Tacon et al. 2002). Vitaminas e minerais são supridos pela biota, diminuindo a necessidade de adicionar estes componentes na dieta (Velasco et al. 1998). Isto somente é possível devido à suplementação por meio do material floculado em suspensão formado nos viveiros durante o ciclo de produção, que contém alto número de bactérias e fitoplâncton senescente (Burford et al. 2003). Emerenciano et al. (2007), avaliando o cultivo de *Farfantepenaeus paulensis* em meio heterotrófico, encontraram na composição bromatológica do material floculado níveis de 30,4 % de proteína bruta e 29,1 % de carboidrato. Wasielesky et al. (2006) concluíram que o material particulado suspenso em sistemas superintensivos de cultivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação de água pode melhorar significativamente a conversão alimentar, reduzindo custos de produção e descarga de efluentes nitrogenados. Nas unidades tradicionais de criação de camarões, a comunidade microbiana é manejada com a renovação da água, desperdiçando estes possíveis benefícios (Bratvold & Browdy 1998).

Além de o sistema heterotrófico ser considerado de pouco impacto, a produção tem se mostrado promissora. Burford et al. (2004) relatam uma produção de 15.000 Kg de camarão/ha/ciclo na Belize Aquaculture Ltda (BAL), uma fazenda piloto onde são utilizados estoques reprodutores selecionados, pós-larvas livres de patógenos específicos, altas densidades de estocagem, renovação zero de água, viveiros forrados com membrana de polietileno de alta densidade e alimentos com baixo nível protéico (20%), situação esta que proporciona uma relação C:N maior, beneficiando as bactérias heterotróficas. A diminuição dos riscos de introdução e disseminação de patógenos e a otimização do uso da água e da terra são outros fatores que proporcionam ao cultivo sem renovação de água menor agressão aos ecossistemas adjacentes.

O acúmulo de compostos nitrogenados como amônia e nitrito é um dos maiores problemas de qualidade da água em sistemas intensivos de aquicultura (Ostrensky & Wasielesky 1995). Em sistemas sem renovação de água é utilizada a adição de carboidratos como estratégia para o controle da concentração de amônia,

proporcionando a sua assimilação pelas bactérias heterotróficas que fazem a conversão para proteína microbiana. Bactérias heterotróficas utilizam os carboidratos como fonte de energia e para o crescimento, ou seja, síntese de proteínas e novas células. Para a estruturação química das proteínas e dos materiais celulares, estes organismos precisam do nitrogênio inorgânico disponível na água. Este mecanismo, conhecido como imobilização do nitrogênio inorgânico, é realizado por praticamente todas as populações microbianas (Avnimelech 1999). Porém, para que este processo seja eficiente, a relação Carbono:Nitrogênio nos detritos deve ser maior do que 10:1 (Moriarty 1997). O melão pode ser utilizado como fonte de carbono, ajustando assim esta relação e incentivando a imobilização do nitrogênio (Samocho et al. 2007). A proteína microbiana associada aos detritos orgânicos e partículas inorgânicas contribui substancialmente com a nutrição dos camarões, reduzindo as exigências de proteínas exógenas nos sistemas sem renovação de água (Burford et al. 2003, 2004).

A inoculação seqüencial de microrganismos com o objetivo de melhorar a qualidade da água, saúde e a produção de organismos aquáticos tem sido aplicada em muitas fazendas e laboratórios por meio de probióticos (McIntosh et al. 2000). Gatesoupe (1999) sugere a seguinte definição para probióticos: células microbianas administradas de tal forma que se mantenham vivas no trato gastrintestinal, com o objetivo de melhorar a saúde do animal.

A eficácia do uso de suplementos microbianos na aquicultura ainda não é consenso entre pesquisadores da área. Os processos ecológicos que estão por trás dos possíveis benefícios destes produtos ainda não foram bem definidos, porém, acredita-se que as bactérias adicionadas produzem uma maior diversidade de exoenzimas que atuam diretamente na quebra de compostos orgânicos (Moriarty 1997).

Balcázar et al. (2006) citam cinco mecanismos de atuação dos probióticos: exclusão competitiva de bactérias patogênicas, fonte de nutrientes, contribuição enzimática para a digestão, influência sobre a qualidade da água, melhora da resposta imune, efeitos antivirais.

Entre as espécies de bactérias probióticas, o *Bacillus subtilis* é freqüentemente utilizado. Nishijima & Fukami (1995) descreve a espécie como remediadora devido à alta atividade de decomposição de proteína e carboidratos. Além disso, Keysami et al. (2007) observaram melhor sobrevivência e maior rapidez na metamorfose de larvas de

Macrobrachium rosenbergii alimentadas com náuplios de *Artemia sp.* enriquecidos com *Bacillus subtilis*. Outra bactéria frequentemente utilizada como probiótico é o *Bacillus licheiniiformis*, Li et al (2007) concluíram que esta espécie administrada em cultivo de *L. vannamei* inibiu *Vibrio sp.* por exclusão competitiva e melhorou a imunidade dos camarões.

Rengpipat et al. (1998), utilizando *Bacillus S11* em dietas de *Penaeus monodon*, observaram que o probiótico proporcionou uma melhor sobrevivência após os animais serem desafiados por bactérias do gênero *Vibrio*. McIntosh et al. (2000) testaram o efeito de probiótico para *L. vannamei* em meio heterotrófico e não encontraram diferenças significativas em quaisquer das variáveis. Ziaei-Nejad et al. (2006) observaram que, quando suplementados com *Bacillus sp.* na fase larval e durante a engorda, *Fenneropenaeus indicus* apresentaram conversão alimentar, crescimento específico e produção final mais satisfatórios e atribuí o resultado a atividade de enzimas como lipase, amilase e protease. Wang (2007) observou maior crescimento e atividade enzimática em *L. vannamei* tratados com *Bacillus sp.* Lin et al. (2004) verificaram maior coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína, lipídeo, fósforo, aminoácidos e ácidos graxos com a utilização de probiótico para *L. vannamei*. Wang et al. (2005) observaram melhora na qualidade de água em viveiros de *L. vannamei* tratados com probiótico, já que as unidades apresentaram aumento no oxigênio dissolvido e redução no fósforo reativo dissolvido, nitrogênio inorgânico total e demanda química de oxigênio. *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheiniiformis* são ainda efetivos como probióticos na prevenção de vibriosis e estímulo a microflora intestinal (Balcázar et al. 2007; Balcázar & Rojas-Luna 2007; Li et al. 2007).

A adição de probiótico em um sistema heterotrófico sem renovação poderia determinar a persistência de bactérias benéficas ao meio, contribuindo para o desempenho dos organismos cultivados. Além disso, tem-se observado em sistemas de cultivo superintensivo sem renovação o acúmulo excessivo de matéria orgânica, o que aumenta a preocupação com a súbita queda nos níveis de oxigênio das unidades de cultivo (Avnimelech 2001; Boyd & Clay 2002). Desta forma, o probiótico poderia agir na decomposição da matéria orgânica evitando este acúmulo (Moriarty 1997).

Existem poucos trabalhos onde a adição de probiótico em meio heterotrófico é avaliada (McIntosh et al. 2000). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito

do probiótico sobre a performance dos camarões e a qualidade da água durante o cultivo super-intensivo sem renovação de água de *L. vannamei*.

2 – OBJETIVO

Avaliar crescimento, conversão alimentar, qualidade da água e composição do material floculado em sistema de cultivo superintensivo de *L. vannamei* sem renovação de água utilizando suplemento bacteriano (probiótico).

|

3 - MATERIAL E MÉTODOS

As Pós-larvas (PL's) de *L. vannamei* foram adquiridas em laboratório especializado (Aquatec, Canguaretama, RN, Brasil) 10 dias após a metamorfose para este estágio (PL10). Antes do experimento foi realizada a fase de berçário, quando estes animais foram mantidos em tanques de fibra de vidro com volume útil de 5.000L, aquecimento e aeração constante por um período de 30 dias. Durante esta fase, os camarões foram alimentados com ração comercial com 45 % de proteína bruta e náuplios recém eclodidos de *Artêmia sp.* (25/mL) em 12 refeições diárias alternadas. O volume útil do tanque era renovado em 30% diariamente. A temperatura média neste período foi de $24,65 \pm 1,44$ e a salinidade 30 ‰.

O experimento foi conduzido na Estação Marinha de Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (EMA/FURG) no período de 12 de agosto a 12 de setembro de 2007. As unidades de cultivo foram abastecidas com água filtrada bombeada do mar, e posteriormente inoculadas com $4,5 \times 10^4$ e 26×10^4 células/mL de microalgas diatomáceas *Thalassosira weissflogii* e *Chaetoceros muelleri* respectivamente. Foram utilizados 8 tanques retangulares de concreto pintados com tinta epoxi medindo $1,43 \text{ m}^2$ de área de fundo e volume útil de 750 L. Estes tanques contavam com sistema de aeração individual e estavam alocados em sala coberta com telhas transparentes (“greenhouse”). Em cada unidade experimental foram estocados 300 animais/ m^2 com peso inicial médio de $0,047 \pm 0,024$ g e aleatoriamente distribuídos em 2 tratamentos com 4 repetições cada: Tratamento Probiótico (P), nos tanques deste tratamento foi colocada uma dose inicial de 2ppm de probiótico, posteriormente foi realizada a adição diária de 0,5 ppm de probiótico (recomendado pelo fabricante), o produto era adicionado diretamente na água, conforme recomendação do fabricante; Tratamento controle (C), nos tanques deste tratamento não foi feita adição de probiótico.

O probiótico utilizado foi um produto comercial (Sanolife® PRO-W, INVE, Bélgica) composto por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* com uma concentração bacteriana de $5,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia (UFC)/g.

Os 30 dias experimentais foram conduzidos sem nenhuma renovação de água, apenas era completado o volume útil dos tanques em ocasião de evaporação, com água doce submetida à intensa aeração para retirada do cloro. Os tanques foram submetidos à intensa aeração para que o floco microbiano fosse mantido em suspensão.

Nos três primeiros dias de experimento foram aplicados, em todos os tanques, 7 g de melão e 3 g de farelo de trigo como fonte de Carbono e substrato para o crescimento de bactérias heterotróficas. A quantidade destes insumos foi calculada a partir da quantidade de ração fornecida para os camarões com o objetivo de atingir uma relação C:N de aproximadamente 20:1. Posteriormente foi realizada a fertilização conforme sugerido por Avnimelech (1999), ou seja, para manter as concentrações de amônia abaixo de 1mg/L eram adicionadas 6 g de carbono para cada 1,0 g de TAN presente no sistema. Portanto, sempre que a concentração de TAN presente no sistema fosse maior que 1mg/L era adicionado melão nestas proporções. A análise bromatológica do melão utilizado revelou que 46 % (peso seco) deste era composto por Carbono.

A concentração de amônia ($N-NH_3 + NH_4$, UNESCO 1983) foi analisada em dias alternados, enquanto que nitrito ($N-NO_2$, Bendschneider & Robinson 1952), nitrato ($N-NO_3$, Wood et al. 1967 adaptado por Aminot & Chaussepied 1983) e ortofosfato ($P-PO_4$, Aminot & Chaussepied 1983) foram analisados a cada 5 dias. Este mesmo intervalo foi respeitado para as análises de clorofila *a* (Strickland & Parsons 1972) e volume do floco (VF) (Eaton et al. 1995 adaptado por Avnimelech 2007). Todas as manhãs antes da primeira refeição os parâmetros de temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados com o auxílio de um aparelho multiparâmetros (modelo 556 MPS, YSI, EUA). No período da tarde era realizada a leitura do disco de secchi e uma nova medida de temperatura. A cada dez dias foi analisada a alcalinidade (Eaton et al. 1995).

Os camarões foram alimentados 2 vezes por dia em bandejas de alimentação com ração comercial com 38 % de proteína bruta. A quantidade de ração fornecida foi fundamentada no trabalho de Jory et al. (2001). Além disso, esta quantidade era ajustada diariamente de acordo com o consumo observado nas bandejas e de acordo com a biometria realizada após 15 dias de experimento. Ao final do experimento, estes

dados foram utilizados para calcular o fator de conversão alimentar aparente (FCA) de acordo com a seguinte fórmula:

$$FCA = RF/B_i - B_f,$$

Onde, FCA = Fator de conversão alimentar aparente, RF = quantidade de ração fornecida, B_i = Biomassa inicial, B_f = Biomassa final

Na despesca foram coletadas amostras de material floculado de todos os tanques e congeladas para posterior análise de composição bromatológica. Estas amostras foram obtidas a partir da filtragem dos meios experimentais em malha de 50 micras. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal – LNA da Universidade Federal de Pelotas – UFPEL, estado do Rio Grande do Sul, segundo os protocolos da AOAC (1984).

Os dados de sobrevivência, crescimento, conversão alimentar dos camarões, parâmetros de qualidade da água e composição bromatológica do floco, foram submetidos ao teste “t” levando em consideração as premissas necessárias. Para tanto foi utilizado o programa STATISTICA 6.0.

4 - RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade da água temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e alcalinidade não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Além disso, não foram observadas diferenças nas concentrações médias de amônia (NH₃), nitrito (NO₂), nitrato (NO₃) e fosfato (PO₄) (Tabela 1). Da mesma forma, as médias de clorofila *a* e volume do floco (FV) não apresentaram diferenças entre os tratamentos, entretanto os resultados de volume de floco mostraram uma tendência de maior quantidade de material em suspensão no tratamento P. As progressões dos compostos nitrogenados, Clorofila *a* e VF com o tempo estão expressas na Figura 1 e 2 respectivamente. A leitura média do disco de secchi indicou uma transparência significativamente menor da água nos tratamentos em que o probiótico foi aplicado ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade da água dos tratamentos controle (C) e probiótico (P).

Parâmetros	C	P	p
Temperatura a.m. (C)	25,27 (1,97)	25,07 (2,00)	0,3293
Temperatura p.m. (C)	25,10 (2,24)	25,11 (1,45)	0,9723
Salinidade (g/L)	30,06 (1,05)	29,86 (0,85)	0,0532
PH	7,76 (0,66)	7,69 (0,63)	0,3002
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	7,44 (1,42)	7,43 (1,48)	0,9374
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	108,13 (30,34)	109,31 (34,54)	0,9183
Secchi (cm)	31,08 (8,45) ^a	28,12 (8,67) ^b	0,0009
Clorofila α (μ g/L)	76,69 (83,65)	69,15 (52,27)	0,5083
VF (mL/L)	1,86 (2,55)	4,21 (5,65)	0,0765
Amônia (mg/L)	0,50 (0,60)	0,58 (0,73)	0,4214
Nitrito (mg/L)	10,30 (13,66)	10,90 (14,49)	0,8565
Nitrato – N (mg/L)	2,79 (3,49)	2,72 (4,07)	0,9529
Fosfato (mg/L)	0,38 (0,63)	0,42 (0,67)	0,7982

* Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

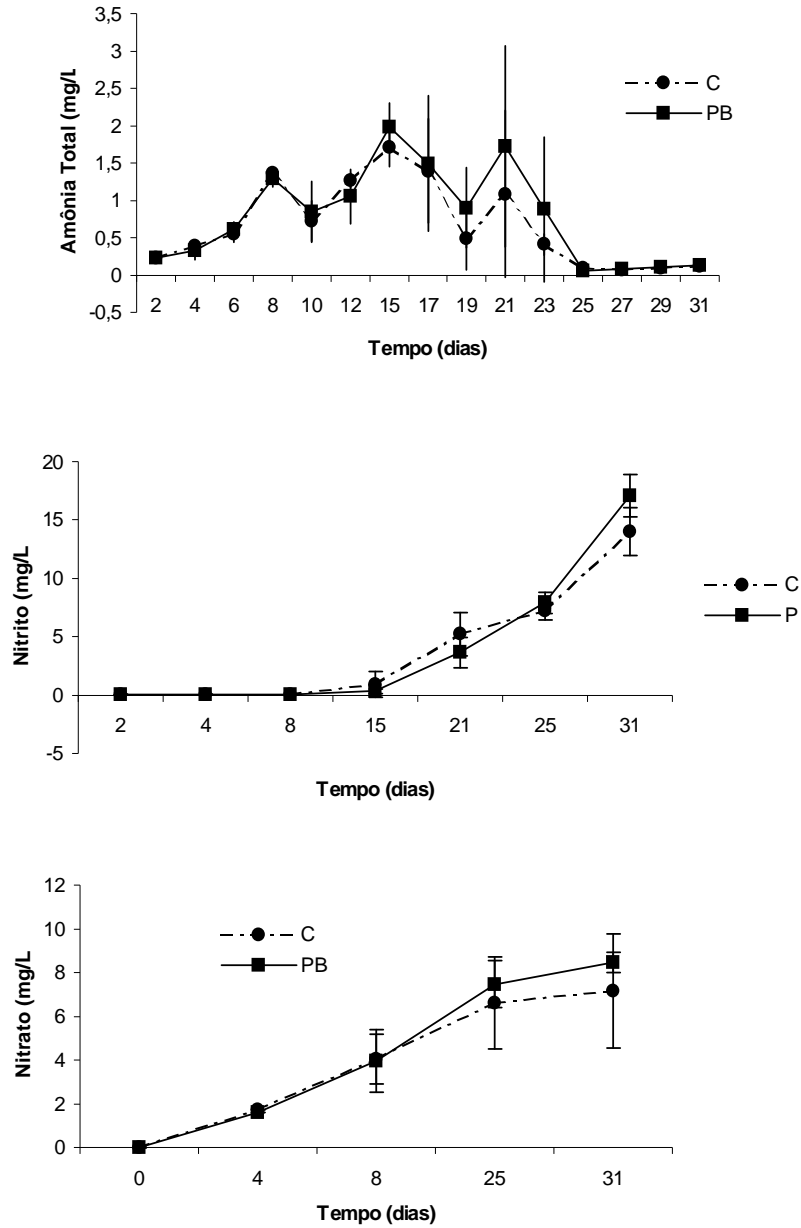


Figura 1 - Concentrações médias de amônia total (TAN), nitrito e nitrato no decorrer do tempo em sistema intensivo de criação de *L. vannamei* sem renovação de água com adição de probiótico (P) e sem probiótico (C).

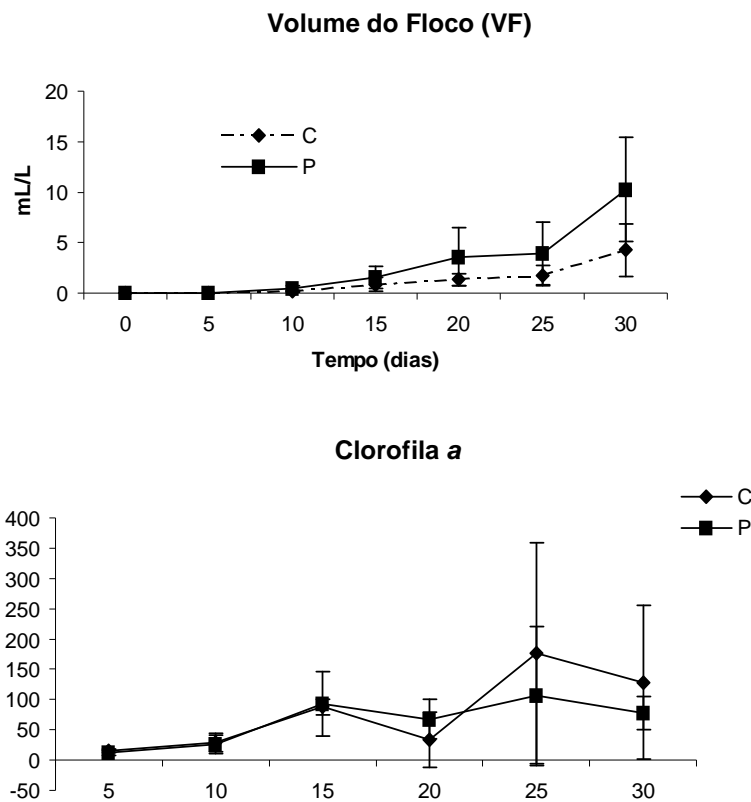


Figura 2 - Volume do floco (VF) e Concentração de clorofila em sistema intensivo de criação de *L. vannamei* sem renovação de água com probiótico (P) e controle sem probiótico (C).

A sobrevivência e o fator de conversão alimentar foram estatisticamente iguais entre os tratamentos, porém o peso médio final nos tratamentos com adição de probiótico foi superior ao controle (Tabela 2). Os camarões no tratamento P ($293,45 \pm 62,85$ g) consumiram mais ração do que no controle ($256,92 \pm 46,21$ g), porém estes valores não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 2 – Parâmetros de crescimento, sobrevivência, consumo de ração e fator de conversão alimentar de *L. vannamei* em tratamentos sem probiótico (C) e com probiótico (PB).

Parâmetros	Tratamento	Mínimo	Máximo	Média (DP)	<i>p</i>
Sobrevivência (%)	C	92,00	100,00	97,00 (4,00)	0,9695
	P	93,00	100,00	97,00 (3,00)	
Peso médio final (g)	C	0,55	0,76	0,66 (0,21) ^a	0,0010
	P	0,56	0,97	0,78 (0,32) ^b	
Consumo de Ração (g)	C	212,85	307,45	256,92 (46,21)	0,3687
	P	210,92	361,20	293,45 (62,85)	
FCA	C	0,99	1,05	1,02 (0,03)	0,2843
	P	0,91	1,10	0,99 (0,09)	

* Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$)

Na tabela 3 estão apresentados os valores médios referentes à composição bromatológica do flocos microbiano nos tratamentos. A proteína bruta (PB) e o extrato etéreo (EE) no tratamento com probiótico (P) foram estatisticamente superiores ao controle.

Tabela 3 – Conteúdo de Proteína Bruta (PB), Extrato Não Nitrogenado (ENN), Fibra Bruta (FB), Extrato Etéreo (EE) e Cinzas no flocos microbiano obtido dos tratamentos Controle (C), probiótico (P).

TRATAMENTO	PB (%)	ENN (%)	CINZAS (%)	FB (%)	EE (%)
C	27,06 ^a	12,73	45,63	13,53	1,05 ^a
P	32,42 ^b	13,61	36,70	13,94	3,33 ^b

* Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$)

5 - DISCUSSÃO

Em sistemas de produção de organismos aquáticos, a qualidade da água é preponderantemente controlada pela degradação microbiana dos resíduos orgânicos (Avnimelech et al. 1995). A utilização de *Bacillus spp.* em sistemas tradicionais de cultivo tem sido indicada com o objetivo de beneficiar esta degradação (Moriarty 1997; Gatesoupe 1999). Nos sistemas superintensivos sem renovação de água, algumas vezes, observa-se um excessivo acúmulo de material orgânico, aumentando os riscos da degradação da qualidade da água. Porém, no presente estudo, não houve efeito óbvio do probiótico, composto por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheiniformis*, sobre a qualidade da água, sendo que, a temperatura, salinidade e pH estiveram dentro da faixa considerada adequada para o crescimento destes *Bacillus sp.* (Nishijima & Fukami 1995). Com exceção da transparência do disco de secchi, os demais parâmetros de qualidade de água analisados, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Como neste trabalho, outros estudos que avaliaram o efeito de probiótico em sistema sem renovação de água não apresentaram efeitos sobre a qualidade da água (Samocha et al. 1998; McIntosh et al. 2000). Porém, como a biomassa era pequena, podemos supor que, tanto no controle como no tratamento com probiótico, o tempo não foi suficiente para que a matéria orgânica acumulasse. Não existem sérios problemas com qualidade de água durante os estágios iniciais do cultivo de organismos aquáticos, quando os animais são pequenos e suas taxas metabólicas e as quantidades de alimento adicionadas ao sistema são baixas (Farzanfar 2006). Além disso, no floco naturalmente é estabelecida uma comunidade microbiana que pode atuar na degradação da matéria orgânica (Moriarty 1997; Avnimelech 2001; Burford et al. 2004).

A temperatura média durante o experimento esteve dentro da faixa de 25 – 30 C, adequada para o crescimento e sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* (Ponce-Palafox et al. 1997). Rosas et al. (2001) encontraram uma taxa máxima de crescimento da espécie em salinidade 15. Porém, Decamp et al. (2003), estudando diferentes salinidades em sistema sem renovação de água, observaram melhor produção em salinidade 36. Portanto, as salinidades verificadas no presente estudo podem ser consideradas adequadas ao crescimento da espécie. As médias de oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade observadas nos tratamentos estiveram dentro dos níveis aceitáveis

(Van Wyk & Scarpa 1999). Amônia, nitrito, nitrato estiveram abaixo dos níveis de segurança determinados para as salinidades observadas (Van Wyk & Scarpa 1999; Lin & Chen 2001, Lin & Chen 2003). No presente estudo, os níveis de nitrito e nitrato aumentaram ao longo do tempo, porém não atingiram valores tóxicos. A amônia total foi mantida em níveis baixos durante todo o experimento, provavelmente devido à comunidade bacteriana, que, através da energia do carboidrato do melaço adicionado, utilizou esta fonte de nitrogênio para formar biomassa. Com isso, é possível supor que as comunidades de bactérias nitrificantes que reduzem amônia foram estabelecidas, mas a redução do nitrito a nitrato não foi eficiente, visto que ambos foram acumulando com o tempo. Uma possível estratégia para aumentar a capacidade de nitrificação do sistema seria a utilização de substratos artificiais (Bratvold & Browdy 2001, Ballester et al. 2007).

Os parâmetros que indicam a quantidade de microorganismos no meio, VF e clorofila *a*, não apresentaram diferenças significativas após 30 dias. Entretanto, a significativa menor transparência (secchi) evidenciou uma tendência de existir maior quantidade de material floculado no tratamento que incluía probiótico. Apesar do Disco de Secchi não ser um equipamento de alta precisão, no presente trabalho este recurso mostrou-se relativamente eficiente, pois através do mesmo em trinta dias já foi possível detectar esta tendência. Possivelmente, a maior quantidade de material floculado no tratamento com probiótico esta relacionada com a maior biomassa bacteriana no mesmo. Além disso, é possível que os *Bacillus spp.* aplicados tenham competido por nutrientes com o fitoplâncton, já que verificou-se uma tendência de menor concentração de clorofila *a* no tratamento com probiótico.

Os probióticos podem ser utilizados tanto como suplemento alimentar quanto como aditivo para a água (Moriarty 1998). Nos organismos aquáticos, o fluxo contínuo de água no interior do organismo aumenta a influência do meio sobre os mesmos. Assim, a microbiota intestinal destes animais pode variar rapidamente com a entrada de microorganismos vindos do alimento e/ou da água (Gatesoupe 1999). Ziaei-Nejad et al. (2006) comprovaram, através de técnicas de contagem de microorganismos, a presença de *Bacillus spp* no trato intestinal de *Fenneropenaeus indicus* submetidos a tratamento com probiótico. Segundo Bomba et al. (2002), os probióticos influenciam processos

digestivos pelo enriquecimento da população de microrganismos benéficos, atividade de enzimas microbianas e melhor digestibilidade e utilização do alimento.

Em sistemas intensivos sem renovação de água, os microrganismos colonizam detritos orgânicos formando os flocos microbianos e estes complementam a dieta dos camarões reduzindo custos de alimentação (Wasielesky et al. 2006). Portanto, os *Bacillus spp.* aplicados na água das unidades experimentais possivelmente contribuíram com a nutrição dos animais, conforme ficou demonstrado pelo maior crescimento dos camarões.

Segundo Irianto & Austin (2002), o uso de probiótico, além de reduzir a utilização de antibióticos, aumenta o apetite e a performance de crescimento das espécies cultivadas. No presente experimento, os camarões apresentaram maior peso médio final no tratamento onde o probiótico foi fornecido, provavelmente devido a fatores nutricionais. Apesar de não ter sido detectada diferença estatística, o consumo alimentar foi em média 13% maior no tratamento com probiótico, indicando um estímulo à alimentação. Além disso, o maior valor nutricional do floco microbiano formado na presença de probiótico provavelmente contribuiu para o melhor desempenho dos camarões.

De acordo com Jory (2001) e Tacon et al. (2002) o floco microbiano contém altos níveis de proteína e outros importantes componentes que suplementam a nutrição dos camarões. No presente estudo, a composição do floco microbiano no tratamento com probiótico apresentou estatisticamente maiores níveis de proteína bruta e extrato etéreo comparado ao controle. Os níveis de proteína de 27,06 e 32,42 %, respectivamente para C e P, estão próximos dos valores verificados por Tacon et al. (2002), Soares et al. (2004), Wasielesky et al. (2006) e Emerenciano et al. (2007). No entanto, os níveis de extrato etéreo no tratamento com probiótico foram superiores ao destes experimentos (3,33%) e significativamente maiores do que o controle (1,05%). McIntosh (2000) encontrou 12,5 % de lípidos na composição do floco microbiano. Chamberlain et al. (2001) argumentam que a composição de células microbianas em flocos suspensos varia muito dependendo dos microrganismos específicos e das condições sob as quais estes estão crescendo. Este mesmo autor sugere que, em um certo grau, esta biota que habita o floco pode ser manipulada. Possivelmente o aumento na quantidade de lípidos esta relacionado ao aumento no número de bactérias devido

ao fornecimento de probiótico, porém são necessários estudos mais aprofundados para que seja possível afirmar. Além disso, Zhukova & Kharlamenko (1999) demonstraram que zooflagelados e ciliados são capazes de sintetizar ácidos graxos poliinsaturados a partir de ácidos graxos mais simples ingeridos a partir da predação de bactérias, o que pode significar um incremento da qualidade lipídica no floco e um sinal de que o “*Microbial Loop*” esta acontecendo dentro do ambiente de cultivo.

Os resultados do experimento estão de acordo com os resultados encontrados por Wang (2007) que observou maior crescimento em juvenis de *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com probiótico. O autor atribuiu isto a melhora na atividade enzimática, o que proporcionou melhor eficiência no aproveitamento do alimento. Da mesma forma, Lin et al. (2004) observaram que com a utilização de probiótico, os coeficientes de digestibilidade aparente de nutrientes como proteína, aminoácidos e fósforo podem ser melhorados em *L. vannamei*.

6 – CONCLUSÃO

A utilização do probiótico no cultivo de *L. vannamei* em meio heterotrófico mostrou-se eficiente. Os animais cultivados na presença de probiótico apresentaram sobrevivência e conversão alimentar estatisticamente iguais, entretanto foi observado crescimento significativamente maior ($p < 0,05$) dos camarões cultivados no tratamento com adição de probiótico. Estes resultados estão provavelmente relacionados com a melhor qualidade nutricional do flocos formado com adição de probiótico e ao estímulo alimentar notado nos camarões deste tratamento.

7 - REFERÊNCIAS

AOAC. 1984. Official methods of analysis. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1141p.

AMINOT A, M CHAUSSEPIED. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest, CNEXO, 395p.

AVNIMELECH Y, N MOZES S DIAB, M KOCHBA. 1995. Rates of organic carbon and nitrogen degradation in intensive fish ponds. *Aquaculture*, 134, 211-216.

AVNIMELECH Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.

AVNIMELECH, Y, G RITVO, LE MEIJER, M KOCHBA. 2001. Water content, organic carbon and dry bulk density in flooded sediments. *Aquacultural Engineering*, 25, 25-33.

AVNIMELECH Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264, 140-147.

BALCÁZAR, JL, I DE BLAS, I RUIZ-ZARZUELA, D CUNNINGHAM, D VENDRELL, JL MÚZQUIZ. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.

BALCÁZAR JL, T ROJAS-LUNA, DP CUNNINGHAM. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, Article in press.

BALCÁZAR JL, T ROJAS-LUNA. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

BALLESTER ELC, W WASIELESKY, RO CAVALLI, PC ABREU. 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: Biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, Article in press.

BENDCHNEIDER K, ROBINSON RJ. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research*, 11, 87-96.

BOMBA A, R NEMCOVÁ, S GANCARCIKOVÁ, R HERICH, P GUBA, D MUDRONOVAL. 2002. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 88, Suppl. 1, 95-99.

BOYD CE, JW CLAY. 2002. Evaluation of Belize Aquaculture, Ltda: A Superintensive Shrimp Aquaculture System. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17 p.

BOYD CE. 2003. Guidelines for aquaculture effluents management at the farm-level. *Aquaculture*, 226, 101-112.

BRATVOLD D, CL BROWDY. 1998. Simple electrometric methods for estimating microbial activity in aquaculture ponds. *Aquacultural Engineering*, 19, 29-39.

BRATVOLD D, CL BROWDY. 2001. Effects of sand and vertical surfaces (AquamatsTM) on production, water quality and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195, 81-94.

BURFORD MA, PJ THOMPSON, RP MCINTOSH, RH BAUMAN, DC PEARSON. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219, 393–411.

BURFORD MA, PJ THOMPSON, RP MCINTOSH, RH BAUMAN, DC PEARSON. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525–537.

CHAMBERLAIN G, Y AVNIMELECH, RP MCINTOSH, M VELASCO. 2001. Advantages of Aerated Microbial Reuse Systems with balanced C:N, II: Composition and nutritional value of organic detritus. *Global Aquaculture Advocate*, June.

DECAMP O, J CODY, L CONQUEST, G DELANOY, AGJ TACON. 2003. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone) within experimental zero-water exchange culture system. *Aquaculture Research*, 34, 345-355.

EATON AD, LS CLESERCI, AE GREENBERG. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 10th edition. Amer. Public. Health Assoc. (APHA), Washington D.C.

EMERENCIANO MGC, WASIELESKY WJ, RB SOARES, EC BALLESTER, EM IZEPII, RO CAVALLI. 2007. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. *Acta Sci Biol Sci*, 29, (1), 1-7.

FARZANFAR A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *Imunol Med Microbiol*, 48, 149-158.

GATESOUBE FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.

HOPKINS JS, RD HAMILTON, PA SANDIFER, CL BROWDY, AD STROKES. 1993. Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets in intensive shrimp ponds. *Journal of World Aquaculture Society*, 24 (3), 304-320.

IRIANTO A, B AUSTIN. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25, 633-642.

JORY, DE. 2001. Feed management practices for a healthy pond environment. In: BROWDY CL, JORY DE (Eds.). *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 118-143.

KEYSAMI MA, SR SAAD, K SIJAM, HM DAUD, AR ALIMON. 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Nutrition*, 13, 131-136.

LI K, T ZHENG, Y TIAN, F XI, J YUAN, G ZHANG, H HONG. 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol Lett*, 29, 525-530.

LIN Y, J CHEN. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 109-119.

LIN Y, J CHEN. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*, 224, 193-201.

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

MCINTOSH D, TM SAMOCHA, ER JONES, AL LAWRENCE, DA MCKEE, S HOROWITZ, A HOROWITZ. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacultural Engineering*, 21, 251-227.

MCINTOSH RP. 2000. Changing paradigms in shrimp farming: IV Low protein feeds and feeding strategies. *Global Aquaculture Advocate*, April.

MORIARTY DJW. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151, 333-349.

MORIARTY DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.

NAYLOR RL, RJ GOLDBURG, JH PRIMAVERA, N KAUTSKY, MCM BEVERIDGE, J CLAY, C FOLKE, J LUBCHENCO, H MOONEY, M TROELL. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, 1017-1024.

NISHIJIMA T, K FUKAMI. 1995. Bioremediation of polluted fish farms by a bacterium, *Bacillus subtilis*. In: PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL CONFERENCE ON ECOLOGICAL SYSTEM ENHANCEMENT TECHNOLOGY FOR AQUATIC ENVIRONMENTS. Ecosec'95. Tokyo, 83-88.

NUNES AJP, GJ PARSONS. 1998. Dynamics of tropical coastal aquaculture systems and the consequences of waste production. *World Aquaculture*, 29 (2), 27-37.

OSTRENSKY A, WJ WASIELLESKY. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132, 339-347.

PONCE-PALAFIX J, CA MARTINEZ-PALACIOS, LG ROSS. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157, 107-115.

RENGPIPAT S, W PHIANPHAK, S PIYATIRATITIVORAKUL, P MENASVETA. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167, 301-313.

ROSAS C, G CUZON, G GAXIOLA, YL PRIOL, C PASCUAL, J ROSSIGNYOL, F CONTRERAS, A SANCHEZ, AV WORMHOUDT. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259, 1–22.

SAMOCHA TM, AL LAWRENCE, A HOROWITZ, S HOROWITZ. 1998. The use of commercial probiotics in the production of marine shrimp under no water exchange. *The second international conference on recirculating aquaculture, Virginia Polytechnic Institute*, 373-375.

SAMOCHA TM, S PATNAIK, M SPEED, A ALI, JM BURGER, RV ALMEIDA, Z AYUB, M HARISANTO, A HOROWITZ, DL BROCK. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultural Engineering*, 36, 184-191.

SANDIFER PA, JS HOPKINS. 1996. Conceptual design of a sustainable pond-based shrimp culture system. *Aquacultural Engineering*, 15 (1), 41-52.

SOARES R, C JACKSON, F COMAN, N PRESTON. 2004. Nutritional composition of flocculated material in experimental zero-exchange system for *Penaeus monodon*. In: AUSTRALIAN AQUACULTURE, CSIRO Aquaculture, Sydney, p. 89.

STRICKLAND JDH, TR PARSONS. 1972. A Practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. 2.ed, Ottawa Bulletin, 167.

TACON, AGJ, JJ CODY, LD CONQUEST, S DIVAKARAN, IP FORSTER, OE DECAMP. 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8, 121 - 137.

THOMPSON FL, PC ABREU, W WASIELESKY. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203, 263-278.

UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. *Intergovernmental Oceanographic Commission, Manual and Guides*, 12.

VANWYK P, J SCARPA. 1999. Water Quality and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp. 128–138.

VELASCO M, AL LAWRENCE, WH NEIL. 1998. Effects of dietary phosphorus level and inorganic source on survival and growth of *Penaeus vannamei* postlarvae in zero-water exchange culture tanks. *Aquatic living Resource*, 11, 29-33.

WANG Y, Z XU, M XIA. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Science*, 71, 1036-1041.

WANG Y. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 259, 259-264.

WASIELESKY WJ, H ATWOOD, A STOKES, CL BROWDY. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396-403.

WOOD ED, FAJ ARMSTRONG, FA RICHARDS. 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Ass.*, UK, 47, 23-31.

ZIAEI-NEJAD S, M H REZAEI, GA TAKAMI, DL LOVETT, AR MIRVAGHEFI, M SHAKOUORI. 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, 516-524.

ZHUKOVA NV, VI KHARLAMENKO. 1999. Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquatic Microbial Ecology*, 17, 153-157.