



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

MARCIO IVIS BARBOZA COUTINHO

**TRIAGEM DE GENES PirVP EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* ISOLADOS
DE ESTUÁRIOS COM ATIVIDADE DE CARCINICULTURA NO ESTADO DO
CEARÁ**

FORTALEZA

2022

MARCIO IVIS BARBOZA COUTINHO

TRIAGEM DE GENES PIR VP EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* ISOLADOS DE ESTUÁRIOS COM ATIVIDADE DE CARCINICULTURA NO ESTADO DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Tecnologia e Microbiologia do Pescado.

Orientador: Prof^a. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes

Coorientador: Dr. Rafael dos Santos Rocha.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C897t Coutinho, Marcio Ivis Barboza.
Triagem de genes PirVP em bactérias do gênero vibrio isolados de estuários com atividade de carcinicultura no estado do Ceará / Marcio Ivis Barboza Coutinho. – 2022.
44 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.
Coorientação: Prof. Dr. Rafael dos Santos Rocha.
1. Camarão. 2. Plasmídeo. 3. *Vibrio parahaemolyticus*. 4. *Litopenaeus vannamei*. I. Título.
- CDD 639.2
-

MARCIO IVIS BARBOZA COUTINHO

TRIAGEM DE GENES PIR VP EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO* ISOLADOS DE ESTUÁRIOS COM ATIVIDADE DE CARCINICULTURA NO ESTADO DO CEARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Pesca, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Microbiologia e Processamento do Pescado.

Aprovada em: 25/04/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues De Menezes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Juliana de Carvalho Gaeta
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Clarinda e Marcos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Gleire Menezes, pela paciência, empenho e excelente orientação.

Ao Coorientador Dr. Rafael dos Santos Rocha pela dedicação e serenidade.

Às professoras participantes da banca examinadora Oscarina Viana de Sousa e Juliana de Carvalho Gaeta pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos laboratórios de pesquisa LAMAP e CEDECAM.

Aos colegas de laboratório, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

RESUMO

A carcinicultura é um ramo da aquicultura que apresenta ascensão a cada ano, demandando assim produções cada vez maiores do camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Por causa do adensamento dos cultivos, compartilhamento de água e efluentes bastante eutrofizados, a produção de camarão sofre com algumas doenças de origem bacteriana, dentre elas a Síndrome da Necrose Hepatopancreática Aguda, causada principalmente pelo *Vibrio parahaemolyticus*. A presente pesquisa teve por objetivo verificar a presença de bactérias patogênicas pertencentes ao gênero *Vibrio* que possuam genes capazes de expressar toxinas causadoras da Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) em três estuários do Estado do Ceará que são polos de produção de camarão marinho em cativeiro (Pirangi, Jaguaribe e Acaraú). Em cada estuário foram realizadas duas coletas. Assim foram processadas seis subamostras, oriundas de duas matrizes ambientais, água e sedimento. Destas amostras foram isoladas cepas com perfil bioquímico compatível com gênero *Vibrio*. Foi realizada a contagem das colônias de *Vibrio* das amostras. Após o isolamento e purificação das colônias, o DNA total foi extraído para identificação de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* e espécie *V. parahaemolyticus* através do método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Um total de 109 cepas foram submetidas a testes com a finalidade de detectar os genes relacionados a produção da toxina causadora da AHPND. Onze cepas apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos sete métodos descritos pela OIE. Porém não foi possível identificar os genes capazes de codificar as toxinas *PirA* e *PirB*. Apenas uma cepa foi considerada suspeita por apresentar resultado positivo para o método que identifica o *V. parahaemolyticus* portador da AHPND (VpAHPND). Nenhuma destas 11 cepas pertence à espécie *V. parahaemolyticus*. A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que o plasmídeo que carrega genes da toxina capaz de causar AHPND já circula em estuários com presença de atividade de carcinicultura no Ceará.

Palavras-chave: camarão; plasmídeo; *Vibrio parahaemolyticus*; *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Shrimp farming is a branch of aquaculture that is growing every year, thus demanding ever greater productions of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Due to the densification of crops, sharing of water and highly eutrophic effluents, shrimp production suffers from some bacterial diseases, including Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome, mainly caused by *Vibrio parahaemolyticus*. The present research aimed to verify the presence of pathogenic bacteria belonging to the *Vibrio* genus that have genes capable of expressing toxins causing the Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in three estuaries of the State of Ceará that are centers for the production of marine shrimp in captivity (Pirangi, Jaguaribe and Acaraú). In each estuary, two collections were carried out. Thus, six sub-samples were processed, originating from two environmental matrices, water and sediment. From these samples, strains with a biochemical profile compatible with the *Vibrio* genus were isolated. The count of *Vibrio* colonies in the samples was performed. After isolation and purification of the colonies, total DNA extraction was performed to verify the presence of bacteria belonging to the genus *Vibrio* and species *V. parahaemolyticus* using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. A total of 109 strains were subjected to tests in order to detect genes related to the production of the toxin that causes AHPND. Eleven strains were positive in at least one of the seven methods described by the OIE. However, it was not possible to identify the genes capable of encoding PirA and PirB toxins. Only one strain was considered suspect because it presented a positive result for the method that identifies *V. parahaemolyticus* carrying AHPND (VpAHPND). None of these 11 strains belong to the species *V. parahaemolyticus*. From the results obtained, it is possible to state that the plasmid that carries the toxin genes capable of causing AHPND is already circulating in estuaries with the presence of shrimp farming activity in Ceará.

Keywords: shrimp; plasmid; *Vibrio parahaemolyticus*; *Litopenaeus vannamei*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mapa com a localização dos pontos de coleta dos três estuários estudados:
Ponto 1 - Rio Jaguaribe, Ponto 2 - Rio Pirangi, Ponto 3 - Rio
Acarauá..... 22
- Figura 2 – Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias
(UFC) de *Vibrio* nos estuários durante o período de
estio..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para amplificação dos genes da toxina <i>Pir</i> ; detecção do plasmídeo <i>pVA1</i> e determinação do <i>Vp_{AHPND}</i>	27
Tabela 2 – Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras do gênero <i>Vibrio</i> para os métodos AP1, AP2, AP3, VpPirA-284, VpPirB-392, TUMSAT-Vp3 e AP4 para detecção por PCR de bactérias portadoras do plasmídeo <i>pVA1</i> para AHPND.....	28
Tabela 3 – Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras para espécie <i>V. parahaemolyticus</i>	29
Tabela 4 – Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de <i>Vibrio</i> nos estuários durante o período de estio na primeira e segunda coleta.....	30
Tabela 5 – Aferição de variáveis abióticas nos estuários durante o período de estio.....	32
Tabela 6 – Matriz de Correlação de Pearson para dados de variáveis abióticas e contagem de colônias bacterianas na água e sedimento.....	33
Tabela 7 – Amostras que apresentaram resultado positivo para algum método de PCR testado.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Aquicultura.....	15
2.2	Carcinicultura	16
2.3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17
2.4	Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND).....	18
2.5	Estratégias para o combate das vibrioses.....	20
3	METODOLOGIA.....	22
3.1	Local coleta	22
3.2	Coleta das amostras.....	23
3.3	Determinação de variáveis abióticas.....	23
3.4	Processamento das amostras.....	23
3.4.1	<i>Amostras de água</i>	23
3.4.2	<i>Amostras de sedimento</i>	24
3.4.3	<i>Inoculação inicial das amostras</i>	24
3.5	Quantificação e caracterização das colônias.....	24
3.6	Identificação fenotípica e genotípica.....	24
3.7	Lavagem das Placas de Petri.....	25
3.8	Identificação genotípica das bactérias do gênero <i>Vibrio</i> causadoras da AHPND.....	25
3.8.1	<i>Extração do DNA total</i>	25
3.8.2	<i>Amplificação do DNA para confirmação do gênero Vibrio</i>	26
3.8.3	<i>Deteção dos genes relacionados a AHPND</i>	26
3.8.4	<i>Genes utilizados para deteção de cepas de V. parahaemolyticus</i>	29
3.9	Eletroforese.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1	Quantificação das Colônias.....	30
4.2	Análise de variáveis abióticas.....	32
4.3	Amplificação do DNA para confirmação do gênero <i>Vibrio</i>	34
4.4	Diagnóstico da Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)..	35

4.5	Identificação de <i>V. parahaemolyticus</i>	37
5	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é apontada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018) como um setor com promessas de crescimento decorrente de investimentos feitos na área nos últimos anos. Esse panorama futuro resulta da crescente demanda por alimentos, incluindo o consumo de proteína de origem animal e alternativas para produzi-las. A região Nordeste do Brasil destaca-se como uma das maiores produtoras aquícolas respondendo por 19% da produção nacional para piscicultura e 99,4% para carcinicultura (IBGE, 2018), tendo como estados produtores mais notáveis, o Ceará e o Rio Grande do Norte, em virtude, principalmente, da presença do camarão *Litopenaeus vannamei* como produto predominante.

Geograficamente, a carcinicultura se instala em locais onde estão disponíveis recursos naturais para a atividade obter sucesso. Água, em abundância e qualidade, é um dos fatores principais para a manutenção do empreendimento (OSTRENSKY, 2007). Portanto, a instalação de fazendas de camarão em zonas de manguezal e estuário se tornou comum por contar com sua localização próxima ao mar e clima favoráveis ao cultivo (NASCIMENTO, 2007). Porém, o aporte de nutrientes, matéria orgânica e má qualidade dos efluentes oriundos da carcinicultura, causam danos ambientais ao estuário, resultando em favorecimento de bactérias possivelmente patogênicas tanto para os camarões como para humanos (WAINBERG & CÂMARA, 1998).

Naturalmente marinho, *Litopenaeus vannamei* é a espécie de camarão mais cultivada e bem adaptada ao clima quente do nordeste brasileiro e teve seu auge de produção no início da década de 2000, atingindo o patamar da indústria de exportação (ROCHA, 2013). Em virtude da intensificação da atividade, como aumento do número de fazendas, maiores densidades de estocagem, redução da área dos viveiros e necessidade de aumento da eficiência dos resultados, os camarões são submetidos a forte estresse, ocasionado pelo acúmulo de matéria orgânica e compostos tóxicos, promovendo um aumento da incidência de patógenos infecciosos que afetam a sobrevivência e o crescimento dos animais cultivados (WAINBERG & CÂMARA, 1998).

As variações anuais nas produções de camarão no Brasil estão diretamente relacionadas com o aparecimento de patógenos como vírus e bactérias (IBGE, 2018). As infecções bacterianas em camarões têm como principal causador o gênero *Vibrio*, pertencente à família Vibrionaceae, que tem como habitat o ambiente marinho e estuarino. Este gênero é comumente encontrado em camarões de cultivo e de vida livre e são considerados

oportunistas por agirem quando os mecanismos de defesa naturais são suprimidos (TRAN *et al.*, 2013).

Dentre os problemas associados às cepas de *Vibrio* spp. na carcinicultura, a síndrome de mortalidade precoce, *Early Mortality Syndrome* (EMS), conhecida também como "Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda", *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*, (AHPND), tem sido a doença bacteriana que mais afeta os camarões cultivados, causando grandes perdas econômicas (CHUMPOL *et al.*, 2017). Dentre as espécies pertencentes ao gênero, cepas virulentas de *Vibrio parahaemolyticus* são responsáveis pela AHPND. Os principais sintomas que podem ser observados no camarão infectado são: letargia, estômago e intestino vazios e hepatopâncreas apresentando um tom de pálido a branco. Através de análise histológica do hepatopâncreas é possível identificar descamação das células do túbulo epitelial na fase inicial da doença e infiltração hemocítica maciça na fase tardia da infecção (LUANGTRAKUL *et al.*, 2021). As cepas virulentas de *Vibrio parahaemolyticus* abrigam um plasmídeo único extracromossômico (pVA1) de aproximadamente 69 kpb, com genes homólogos aos das toxinas relacionadas ao inseto *Photobacterium* (*Pir*), *PirA* e *PirB*, produzidas pelo *Vibrio*, causando danos ao camarão quando se encontra no interior do seu sistema digestivo (OIE, 2019). A bactéria age colonizando o trato gastrointestinal dos camarões e liberando a toxina binária, *PirA* e *PirB*, que causa destruição tecidual do sistema digestivo, principalmente o hepatopâncreas, descamando severamente as células, causando a necrose dessa área resultando na mortalidade rápida e em massa dos indivíduos (ZORRIEZHARA, 2015). A doença foi relatada pela primeira vez na China e em seguida em outros países asiáticos e latino-americanos, incluindo Vietnã (2010), Malásia (2011), Tailândia (2012), México (2013) e Filipinas (2015) (RESTREPO *et al.*, 2018).

Pesquisas recentes indicam que outras espécies do gênero *Vibrio* como *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. punensis* e *V. harveyi* podem abrigar plasmídeos capazes de codificar os genes para a produção de toxinas (*PirA* e *PirB*) causadoras da AHPND e transferir o conteúdo plasmidial para outras bactérias (RESTEPRO *et al.*, 2018). Consequentemente a presença de genes de transferência conjugativa no plasmídeo pVA1 postula a possibilidade de mobilização dos genes de virulência do AHPND para outras espécies pertencentes ao gênero citado, via transferência horizontal de genes (CHONSIN *et al.*, 2015; RESTEPRO *et al.*, 2021). Portanto mesmo a presença de bactérias do gênero *Vibrio* que não produzam as toxinas causadoras da AHPND, podem apresentar perigo às produções de camarão uma vez que essas bactérias podem se tornar veículo de transmissão da doença por transferência horizontal do plasmídeo de bactérias AHPND positivas (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2019).

Os isolados bacterianos positivos para o gênero *Vibrio*, que possam ser portadores dos genes relacionados a AHPND podem ser testados utilizando os pares de *primers* (oligonucleotídeos) sugeridos no manual da *World Organisation for Animal Health* (OIE, 2019). De acordo com essa organização, existem sete metodologias, entre provas e contraprovas, que são utilizadas para confirmação da espécie *Vibrio parahaemolyticus* portador da toxina AHPND. Estes testes são realizados em ciclos distintos, pois sugerem o positivo de diferentes maneiras como: detecção do plasmídeo pVA1 (AP1 e AP2), detecção de genes da toxina Pir (AP3, TUMSAT-Vp3, *VpPirA*-284 e *VpPirB*-392) e determinação do *Vibrio parahaemolyticus* portador da AHPND, *Vp_{AHPND}* (AP4 passo 1 e AP4 passo 2). Em todas as amplificações é necessário utilizar como controle, uma cepa de referência.

O papel de bactérias, principalmente do gênero *Vibrio*, à patógenos causadores de vastas perdas de produção na carcinicultura já é fundamentada. Para combater esses surtos bacterianos, o recurso utilizado é o emprego de antimicrobianos, porém o uso não controlado desses fármacos convergiu para o surgimento de cepas resistentes e a disseminação de genes de resistência entre os microrganismos. Essa propagação da resistência se dá entre outros fatores, devido a possibilidade de organismos poderem ser carregados pelos efluentes dos viveiros para rios e estuários, podendo favorecer o alastramento da resistência (REBOUÇAS *et al.*, 2017; ROCHA, 2016).

Diante disso, a antecipação da detecção do plasmídeo envolvido na patogenia permite o entendimento e possível prevenção de surto da AHPND em fazendas de camarão. O conhecimento da diversidade de espécies de víbrios nos estuários e o fluxo de material genético entre espécies bacterianas pode ajudar na compreensão da comunicação entre os ambientes de carcinicultura e das conseqüências para a própria atividade.

OBJETIVOS

Geral

Detectar a circulação de genes relacionados a expressão de toxinas causadoras da Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) entre a comunidade de bactérias do gênero *Vibrio* em três estuários do Estado do Ceará.

Específicos

- Estabelecer a abundância da comunidade cultivável de *Vibrio* nas amostras de água e sedimento de cada estuário;
- Detectar a presença dos genes referentes às toxinas envolvidas na AHPND e a presença de elementos genéticos móveis (plasmídios).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura

Entende-se por aquicultura o cultivo de organismos cujo ciclo de vida, completo ou parcial, em condições naturais se dá em meio aquático, como peixes, moluscos, crustáceos e algas (IBGE, 2018). Em 1970, a aquicultura participava com apenas 3,9% da produção total em peso da pesca e aquicultura somadas, no ano 2000 estes valores já estavam em 27,1% da produção total, no ano de 2004 alcançou os 32,4% e em 2020, 46% (FAO, 2020). Este crescimento tem sido mais rápido que em qualquer outro setor de produção de alimentos de origem animal. Em percentagem, a taxa de crescimento anual da aquicultura tem sido de 8,8% desde 1970, enquanto que no mesmo período de tempo, as capturas pesqueiras cresceram somente 1,2% e os sistemas terrestres de produção de carne cresceram 2,8% (FOES, 2008). A atividade aquícola tornou-se a alternativa de maior viabilidade para o suprimento da crescente demanda de proteína animal devido ao declive dos estoques pesqueiros e ao crescimento demográfico humano nas últimas décadas (FAO, 2010).

Em 2016, a produção mundial aquícola foi de 110,2 milhões de toneladas estimando-se um valor comercial de primeira venda em 243.500 milhões de dólares. No total, embora a produção global pesqueira (53%) ainda seja maior do que a produção aquícola (47%), a aquicultura continua contribuindo mais do que a pesca para o fornecimento de alimentos para consumo humano, 52% aquicultura, contra 48% da pesca. A estimativa é que para 2030 a aquicultura contribua com 60% do pescado para consumo humano e sua produção supere a pesca (FAO, 2018).

Durante o período de 2001 a 2016 o índice de crescimento anual da atividade caiu para 5,8%, contudo, ainda é o setor que mais cresce diante de outros grandes setores de produção de alimentos. Entre os crustáceos o mais cultivado é *Litopenaeus vannamei*, com 4,1 milhões de toneladas (53%) (FAO, 2018).

A contribuição da aquicultura no fornecimento mundial de organismos aquáticos cresce anualmente de maneira significativa. Segundo a FAO (2018), de 2000 a 2017, as operações de aquicultura mundial aumentaram em torno de 150%. A China, maior produtor mundial aquícola (58% da produção mundial), gera 46,8 milhões de toneladas de produtos animais de aquicultura por ano. O Brasil, um dos maiores produtores da América do Sul, gera 565 mil toneladas de produtos animais de origem aquícola por ano. A expectativa é que esse valor se estenda ainda mais com o declive da pesca (IBGE, 2018)

2.2 Carcinicultura

A carcinicultura, entendida pelo cultivo de crustáceos em cativeiro, é uma das principais vertentes da aquicultura, pois se destaca no setor de produção de alimentos. O camarão *Litopenaeus vannamei* é o crustáceo mais produzido mundialmente (FAO, 2018), devido ao seu alto valor nutricional e comercial que gera boas receitas financeiras e atrai muitos investimentos e por isso é considerada uma fonte de renda importante em muitas economias em desenvolvimento (ABCC, 2011).

Segundo Rocha *et al.*, (2004), por mais que a carcinicultura, que no Brasil teve seu início na década de 1970, seja uma atividade bastante antiga, com estudos realizados em espécies pertencentes à família Penaeidae, a espécie que se saiu melhor nesses testes foi *Litopenaeus vannamei*.

Ao final da década de 1980, a criação de camarão se consolidou no Brasil a partir da inserção do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, espécie que havia apresentado grande sucesso no Equador, tornando-se a principal espécie cultivada. Sua escolha se deu devido ao excelente desempenho zootécnico e resistência durante a recria, então, foi desenvolvido um pacote tecnológico de produção (reprodução, larvicultura e engorda) (ROCHA, 1988). Essa espécie apresentou uma excelente adaptabilidade às condições de cultivo em regiões de clima tropical, tanto em água salgada, de acordo com sua origem marinha, como também em águas oligohalinas. Isto permitiu seu cultivo em localidades mais distantes da costa, onde a região nordeste também merece destaque, principalmente os Estados do Ceará e Rio Grande do Norte (ABCC, 2011).

A produção nacional de camarão cultivado atingiu o seu auge no ano de 2003, chegando ao valor de 90.000 toneladas quando a taxa de crescimento anual chegou a atingir 50% se comparada ao ano anterior (ROCHA, 2004). Porém, alguns agentes microbianos como bactérias, vírus e fungos, que são patogênicos para os camarões, prejudicaram a produção nacional. Após o auge produtivo em 2003, vibrioses recorrentes, viroses como a Mionecrose Infecciosa (IMN) e a Síndrome da Mancha Branca (WSS), causaram prejuízos à produção devido a falta de implantação de protocolos de biossegurança (ABCC, 2011). Então estabeleceu-se uma crise nos anos subsequentes com doenças que impediram a continuação do bom crescimento da atividade que acarretou uma significativa redução na produção para valores em torno de 46 mil toneladas em 2018. No mesmo ano, a Região Nordeste foi responsável pela quase totalidade da produção nacional (99,4%), sendo os Estados do Ceará e

Rio Grande do Norte os maiores produtores, respondendo por 71,7% do total nacional (IBGE, 2018).

Diversas alternativas, como cultivo super intensivo e sistemas de recirculação de água, surgiram para minimizar esses efeitos causados pelas doenças e permitir a produção do crustáceo sem maiores impactos. Permitindo, assim, o reuso do recurso mediante o tratamento físico e/ou biológico, possibilitando aumento da produtividade no cultivo (ZIMMERMANN, 2017). Dentre os processos de tratamento contra as doenças, o uso indevido de antibióticos surge como uma falha biológica na aquicultura devido à forma e quantidade utilizada, o que acaba gerando grandes problemas como a seleção de microrganismos resistentes a ação dos antimicrobianos prejudicando assim outros ecossistemas próximos. Na maioria dos casos, os antibióticos e antimicrobianos químicos são utilizados rotineiramente para prevenir ou tratar a vibriose em camarões, embora tragam efeitos secundários negativos (SERNAPESCA, 2013; LONGO *et al.*, 2019).

As bactérias do gênero *Vibrio* apresentam potencial patogênico para o camarão durante todas as etapas do cultivo, por esse motivo são microrganismos muito relevantes na aquicultura e algumas cepas podem causar gastroenterite em seres humanos (JONES, 2017; ROCHA, 2016). Estas bactérias são em sua maioria halofílicas e por isso são comumente encontradas na água e no sedimento de ambientes estuarinos e marinhos (MORIARTY, 1988). Possuem forma de bastonetes curtos e levemente curvos e são gram-negativas (JAYASREE *et al.*, 2006). Possuem mobilidade através de um flagelo polar e podem ser oportunistas, agindo quando o sistema imune do crustáceo está prejudicado (TRAN *et al.*, 2013). Estas mesmas bactérias em número adequado podem não ser nocivas e compor a microbiota intestinal de camarões sadios (REBOUÇAS *et al.*, 2017; ROCHA, 2016).

2.3 *Vibrio parahaemolyticus*

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, existe a espécie *Vibrio parahaemolyticus* que é encontrada naturalmente em ambientes halofílicos como nos estuários e no mar. Esta espécie de víbrio é capaz de crescer em concentrações de NaCl de até 8% (YANG *et al.*, 2010). É um agente causador de vibrioses em camarões peneídeos em várias partes do mundo (ZHANG *et al.*, 2014; DSMZ, 2020). Sua patogenicidade para *Litopenaeus vannamei* foi confirmada por Kumar *et al.*, (2014) ao isolarem cepas oriundas de animais com sinais clínicos de vibriose em cultivos na Índia no ano de 2013.

Sabe-se que essa bactéria vem sendo responsável por severas perdas de produção ao redor do mundo (RESTREPO *et al.*, 2018). O surgimento da doença pode ter seu gatilho devido às alterações ambientais desfavoráveis, como mudança brusca de temperatura e chuvas intensas ou escassas, que provocam estresse no animal, com consequente redução da resposta imunológica e o oportunismo da bactéria frente a outros microrganismos virais e bacterianos. *V. parahaemolyticus* tem sido relacionado como sendo o agente etiológico da doença da necrose hepatopancreática aguda (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) também conhecida como a síndrome da mortalidade precoce (Early Mortality Syndrome, EMS). Esta doença surgiu e se espalhou nos países Asiáticos: Vietnã, Malásia, Tailândia, Filipinas e depois chegou no continente americano: México e Equador (NUNAN, *et al.*, 2014; GOMEZ-GIL *et al.*, 2014; RESTREPO *et al.*, 2018).

2.4 Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)

Atualmente, uma das doenças emergentes mais fortes de origem não viral para os países produtores de camarão é a doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), previamente conhecida como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS). Trata-se de uma enfermidade bacteriana, causada por cepas de *V. parahaemolyticus*, que causa mortalidade significativa de até 100%, 20 a 30 dias após o povoamento do camarão. (ICAR, 2016; BONDAD-REANTASO, 2016).

Segundo o Manual de Testes de Diagnóstico para Animais Aquáticos da OIE (2019), a enfermidade é causada por uma cepa de *V. parahaemolyticus* (VpAHPND) que contém um plasmídeo extracromossômico (pVA1) de aproximadamente 70 kbp, com genes homólogos capazes de codificar a toxina binária *pirA* e *pirB*.

Os genes das toxinas *PirA* e *PirB*, que ocasionam a AHPND, são homólogos aos genes da toxina *PirA* e *PirB* de *Photobacterium* spp, um gênero de bacilos Gram-negativo, bioluminescente, pertencente à família Enterobacteriaceae e que vive simbioticamente com *Heterorhabditis* spp., um gênero de nematóides que possui ampla distribuição geográfica e sua aplicação é estudada como controlador populacional de larvas de inseto através de parasitismo (BONDAD-REANTASO, 2016).

Descrivem-se como sinais clínicos da manifestação de AHPND a presença de camarões letárgicos, geralmente com carapaças amolecidas, estômago e intestino vazios, além de apresentar o hepatopâncreas pálido, esbranquiçado e significativamente atrofiado ICAR (2016). Isso ocorre porque as toxinas passam a ser produzidas no estômago do camarão,

causando a descamação das células do túbulo epitelial do hepatopâncreas e desencadeando uma série de fatores capazes de levar a morte (PHIWSAIYA *et al.*, 2017; LUANGTRAKUL *et al.*, 2021).

Inicialmente, cientistas acreditavam que o responsável pela doença fosse um agente etiológico desconhecido, já que e que a enfermidade era a ocasionada por uma gama de agentes como matéria orgânica em excesso, uso de inseticidas, parasitas, floração de algas, aplicação inadequada de probióticos ou má qualidade da ração ofertada, sendo o papel das bactérias considerado secundário, ou seja, acreditava-se que a colonização bacteriana era o último estágio da manifestação da doença e não a causa (TRAN *et al.*, 2013). Posteriormente, uma cepa virulenta de *V. parahaemolyticus* foi isolada em exemplares de *L. vannamei* doentes e apontada como agente etiológico da enfermidade (FAO, 2013).

Apesar de algumas cepas de *V. parahaemolyticus* terem sido reconhecidas como agentes causadores de AHPND, nem todas são capazes de causar a doença. Após sequenciar genomas e plasmídios de *V. parahaemolyticus* isolado de camarões de cultivo infectados com AHPND, foi descoberto que a AHPND é desencadeada apenas por cepas de *V. parahaemolyticus* que possuem codificação de plasmídeo extra-cromossômico que codifica as toxinas binárias *PirA* e *PirB*. O plasmídeo pVA1 inclui genes para conjugação e mobilização do plasmídeo, tornando o plasmídeo autotransmissível (AHMED *et al.*, 2021).

Embora a AHPND afete principalmente a produção de *L. vannamei*, a enfermidade também foi relatada no cultivo de *Penaeus monodon* e *Penaeus chinensis*, além de que, apesar de ainda não ter sido notificada, a doença está presente em outros países da Ásia, América Latina e Caribe (BONDAD-REANTASO, 2016).

De acordo com a OIE (2019), embora haja relatos do isolamento de outras espécies de *Vibrio* em casos clínicos de AHPND, apenas o VpAHPND demonstrou ser o causador da enfermidade. Entretanto, outras espécies do gênero como *V. campbellii*, *V. owensii*, *V. punensis* e *V. harveyi* também foram observadas como causadoras da AHPND em camarões (MUTHUKRISHAN *et al.*, 2019).

Fatores ambientais, como variação de salinidade e nutrientes na água estimulam os mecanismos horizontais de transferência de genes entre bactérias, o que justificaria a transferência do plasmídeo (pVA1) entre diferentes espécies do gênero *Vibrio* (CHONSIN *et al.*, 2015).

Assim, mesmo que haja presença de cepas de víbrios não causadores da AHPND, o risco às produções permanece, sendo a possível transferência plasmidial preocupante para o

ambiente de cultivo principalmente porque pode resultar no rápido surgimento de cepas causadoras de AHPND (MUTHUKRISHAN *et al.*, 2019; CHONSIN *et al.*, 2015).

Reconhecendo os riscos que AHPND traz à produção mundial de camarão, desde 2011, muitas instituições e agências ao redor do mundo têm se esforçado na compreensão da enfermidade e na busca de tecnologias e boas práticas de manejo que ajudem a mitigar a ocorrência e o impacto da doença no setor (FAO, 2013).

2.5 Estratégias para o combate das vibrioses

Antimicrobianos, parasiticidas, probióticos e outros aditivos são utilizados na alimentação de animais aquáticos para tratar e prevenir doenças microbianas e parasitárias, bem como para melhorar a qualidade da água e/ou para promover o crescimento (RICO *et al.*, 2011). O tratamento mais comum usado para camarões suspeitos de estarem infectados com *Vibrio* spp. se baseia, principalmente, no uso de antibióticos (RICO *et al.*, 2011; WONGTAVATCHAI *et al.*, 2010; WEN *et al.*, 2014).

Antimicrobianos são demandados em grandes quantidades na carcinicultura, porém com o objetivo equivocado de promotores de crescimento (BAQUERO *et al.*, 2008). No entanto, sua aplicação na aquicultura, além de onerosa, pode ser prejudicial, agindo, por exemplo, na seleção de bactérias que são resistentes às drogas ou cepas mais virulentas e levando resíduos dessas drogas à efluentes e populações selvagens de diversos organismos (DECAMP & MORIARTY, 2005). Além disso, a escolha dos fármacos a serem utilizados por seres humanos e animais é influenciada pela resistência bacteriana aos antimicrobianos, visto que os resíduos das drogas utilizadas em tratamento de animais destinados ao consumo podem trazer riscos à consumidores diretamente e ao meio ambiente (ADAMS & BOOPATHY, 2013).

Pesquisadores buscam métodos mais eficazes de biocontrole para prevenção de doenças na carcinicultura a fim de reduzir os riscos de resistência bacteriana aos antibióticos, tais como vacinas, proteases (WONGTAVATCHAI *et al.*, 2010) e também a utilização de microrganismos probióticos que sejam capazes de competir com as populações de *Vibrio* spp. no ambiente de cultivo (WEN *et al.*, 2014; LOMELÍ-ORTEGA & MARTINEZ-DIAZ, 2014; MATEUS *et al.*, 2014).

O fato de grandes perdas produtivas na carcinicultura comprovadamente causadas pelo *Vibrio* como patógeno causador já é conhecido, portanto a prevenção como estratégia a

eventos de doenças, principalmente as vibrioses, resulta em redução de perdas econômicas e fortalecimento da atividade da carcinicultura marinha (REBOUÇAS *et al.*, 2017).

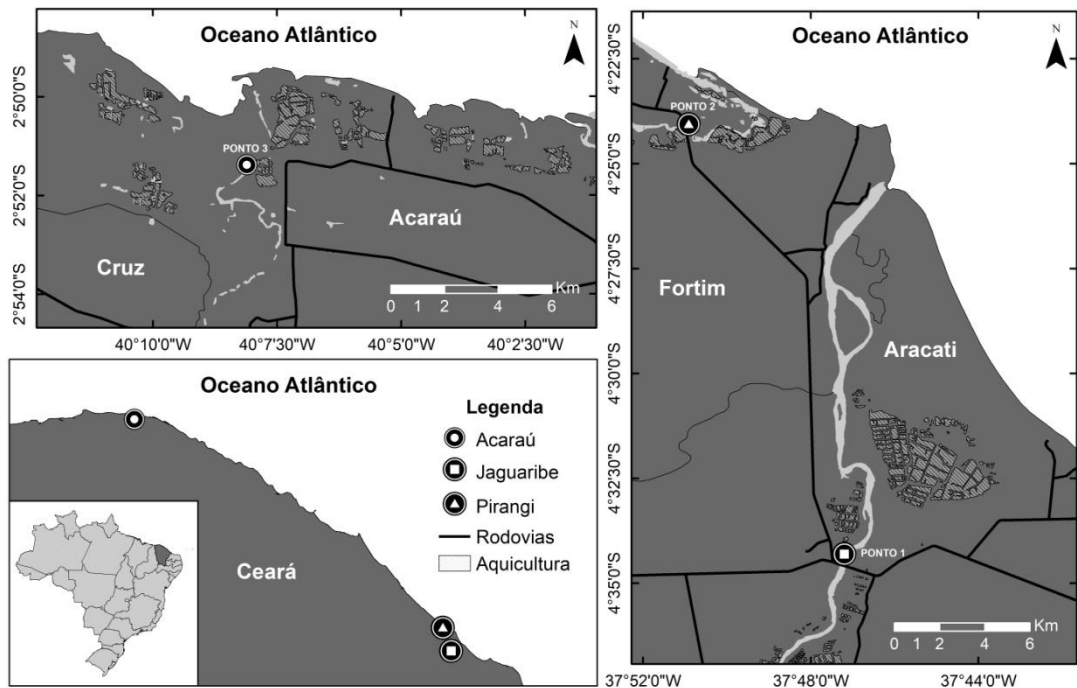
Reconhecendo os riscos que AHPND traz a produção nacional de camarão, é de suma importância conhecer a diversidade de espécies de *Vibrio* principalmente espécies com potencial para carrear plasmídios com genes que conferem fenótipos de virulência afetando os animais cultivados. O conhecimento gerado serve como base para a tomada de ações preventivas e mitigantes contra possíveis surtos das doenças relacionadas nas áreas de cultivo.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de coleta

As coletas foram realizadas nos meses de agosto e dezembro de 2019, nos Estuários dos Rios Jaguaribe ($4^{\circ}34'18.6''\text{S}$ $37^{\circ}47'11.8''\text{W}$) e Pirangi ($4^{\circ}24'03.9''\text{S}$ $37^{\circ}50'54.4''\text{W}$) no litoral leste e no Rio Acaraú ($2^{\circ}51'22.9''\text{S}$ $40^{\circ}08'06.1''\text{W}$) no litoral oeste do Estado do Ceará, (Figura 1). Os pontos de amostragem foram escolhidos para a presente pesquisa considerando os municípios com a maior produção de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará (IBGE, 2018).

Figura 1: Pontos de coleta de amostras de água e sedimento para verificação da presença de bactérias do gênero *Vibrio*. Ponto 1 no Rio Jaguaribe, Ponto 2 no Rio Pirangi e Ponto 3 no Rio Acaraú.



Fonte: Elaborado pelo autor com as informações geográficas do MAPBIOMAS (2020) e IPECE (2019).

3.2 Coleta das amostras

O período de coleta representa a estação de estio na Região. Foram coletadas um total de 12 amostras, sendo 6 de água e 6 de sedimento. As amostras de água foram coletadas à uma profundidade de 50 cm, utilizando garrafas de cor âmbar de 1 litro de capacidade, previamente esterilizadas. Três litros da água foram filtrados em 1 metro de gaze estéril, a qual foi inserida em 225 mL de água peptonada alcalina (APA) previamente adicionada de 1% (p/v) de cloreto de sódio (NaCl). As coletas das amostras de sedimento foram realizadas em uma profundidade média de 1 m com o auxílio de um coletor de sedimento, o qual apresenta um retentor da amostra (em material PVC) acoplado a um suporte de metal com válvula para saída de ar. Após o material ser coletado, foi inserido em um saco plástico estéril com fecho. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas, contendo gelo, até o laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) – UFC, e foram processadas, imediatamente.

3.3 Determinação de variáveis abióticas

Em cada coleta foram verificadas as variáveis físicas e químicas para as amostras de água: temperatura (°C), salinidade e pH. A temperatura foi verificada *in situ* com auxílio de um termômetro bastão de mercúrio (Incoterm) até sua estabilização. A salinidade e pH foram determinados em refratômetro digital (ATAGO S/MILL) e potenciômetro (MARCONI – PA 200P), respectivamente, no laboratório.

3.4 Processamento das amostras

3.4.1 Amostras de água

Para a realização das análises, inicialmente foram realizadas as diluições seriadas, que consistiu na inoculação de 1 mL dos 225mL iniciais com gaze (na qual consideramos como a diluição 10^{-1}) em 9 mL de APA 1%, prosseguindo então para as demais, onde no total foram realizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} .

3.4.2 Amostras de sedimento

Foram colocadas 25 gramas de sedimentos em 225 mL de APA 1%, onde com o auxílio de um agitador magnético a amostra foi agitada por aproximadamente 30 minutos. A amostra homogeneizada inicialmente foi tomada como a diluição 10^{-1} e por meio dela seguiu-se para as diluições seriadas, transferindo 1 mL do sobrenadante da lavagem da amostra para 9 mL de APA 1%. No total foram feitas sucessivas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} .

3.4.3 Inoculação inicial das amostras

A partir das diluições previamente preparadas foram retiradas alíquotas de 200 μ L de cada diluição para estriamento em placa de petri com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril em meio Ágar Tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS), seletivo para o crescimento de bactérias do gênero *Vibrio*. Cada diluição foi realizada em duplicata, por meio da técnica de *Spread-plate*. Em seguida, as placas inoculadas foram estocadas por 24 horas em estufas bacteriológicas a 36 °C (KAYSNER *et al.*, 2004).

3.5 Quantificação e caracterização de colônias

Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias foi realizada, em seguida foram caracterizadas quanto a sua capacidade de fermentar a sacarose, sendo identificadas e divididas em colônias sacarose positivas (com capacidade fermentadora) e sacarose negativas (sem capacidade fermentadora) (KAYSNER *et al.*, 2004).

A quantificação ocorreu através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP), conforme as recomendações de Downes & Ito (2001).

Os dados de contagem de colônias e variáveis abióticas foram submetidos ao teste de normalidade e em seguida análise de coeficiente de correlação de *Pearson* (SCHOBER *et al.*, 2018).

3.6 Identificação fenotípica e genotípica

A partir das placas com crescimento de colônias (sacaroses positivas e negativas) foram escolhidas colônias distintas para inoculação em tubos com Ágar Triptona de Soja (TSA) com 1% de NaCl, incubados em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas para

verificação de pureza das cepas e posterior caracterização morfotintorial (KAYSNER *et al.*, 2004).

A coloração de Gram é uma técnica morfotintorial utilizada para verificar as características das cepas isoladas, em esfregaços corados, preparados a partir das culturas de TSA contendo 1% de NaCl. As cepas que se revelaram no esfregaço como bacilos Gram-negativos, polimorfos, encurvados ou não, eram consideradas suspeitas como pertencentes ao gênero *Vibrio*.

3.7 Lavagem das placas de Petri

Após o isolamento das colônias selecionadas, as placas de petri foram lavadas com APA 1% estéril, para que o material genético das colônias não isoladas fosse conservado. O procedimento de lavagem consistiu no espalhamento de APA 1% nas superfícies das placas de Petri, com o auxílio de uma alça de *Drigasli*, e em seguida, transferiu-se uma alíquota de 2 mL do produto de lavagem para microtubos de centrifugação.

3.8 Identificação genotípica das bactérias do gênero *Vibrio* causadoras da AHPND

As cepas foram submetidas a técnicas de biologia molecular, para extração de DNA e amplificação de genes pertencentes ao gênero e a espécie *V. parahaemolyticus* e também aos genes relacionados a toxina referente a AHPND por meio da Técnica de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR).

3.8.1 Extração do DNA total

Para realização do processo de extração de DNA foi utilizado o Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

As culturas puras foram inoculadas em caldo Luria Bertani (LB) 1% de NaCl e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 horas com a finalidade de aumentar a densidade bacteriológica e também o produto da extração.

Após o crescimento das cepas inoculadas, retirou-se uma alíquota de 1 mL do inóculo para a extração do DNA total. A extração de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão de Tris-EDTA (45 mM; pH 7,8 [1 mM EDTA]), a 120V por 40

minutos e registrado em equipamento de fotodocumentação digital (Kodak® EDAS290). Todas as amostras de DNA extraídas foram mantidas a 4°C até a realização da PCR.

3.8.2 Amplificação do DNA para confirmação do gênero *Vibrio*

A partir do DNA total bacteriano extraído, as amostras foram testadas por meio da técnica de PCR para a confirmação do gênero *Vibrio*. Para isso, foram utilizados os iniciadores (*primers*) *vib727-F* (5'-AGG CGG CCC CCT GGA CAG A-3') e *vib1423-R* (5'-RCT TCT KKT GCA GCC CAC TCC CA-3') sob as condições de termociclagem em 30 ciclos: 94°C por 1 min., 57°C por 1 min., 72°C por 5 min. e, após, uma extensão final a 72°C por 30 min, devendo ser gerados amplicons de 650 pb (SOUSA *et al.*, 2006). As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (Modelo Veriti).

A reação de PCR foi preparada para um volume final de 12,5 µL (Tabela1), as etapas utilizadas na reação de PCR foram: uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos com uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos, por fim, o produto de PCR foi mantido a 4°C.

3.8.3 Detecção dos genes relacionados à AHPND

Os isolados bacterianos positivos para o gênero *Vibrio* foram testados para a presença dos genes utilizando os pares de iniciadores (oligonucleotídeos) sugeridos no manual da OIE (2019) os quais estão descritos na Tabela 2. Em todas as amplificações foi utilizada como controle, uma cepa não portadora de AHPND como referência: *Vibrio parahaemolyticus*, cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz-RJ (IOC 18950). Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela *CROMA bioTechnologies* (Brasil).

Tabela 1: Composição e concentrações empregadas nas reações de investigação molecular para amplificação dos genes da toxina *Pir*, detecção do plasmídeo *pVAI* e determinação do *VpAHPND*.

Reagentes da Reação	PCR
	Gene de virulência
Tampão (Buffer) 10X	2,5 µL
dNTP's (2,5 mM)	0,4 µL
IniciadorF (10mM)	0,5 µL
Iniciador R (10mM)	0,5 µL
MgCl2 (50 mM)	0,7 µL
Taq Polimerase (500 U)	0,2 µL
Amostra	0,1 a 1 ng
Volume da reação	12,5 µL

Fonte: OIE 2019

Tabela 2: Iniciadores e condições de termociclagem utilizados na investigação molecular das amostras do gênero *Vibrio* para os métodos AP1, AP2, AP3, VpPirA-284, VpPirB-392, TUMSAT-Vp3 e AP4 para detecção por PCR de bactérias portadoras do plasmídeo *pVAI* para AHPND.

Nome do método	Primers	Condições de termociclagem	Gene alvo	Tamanho do amplicon	Referência
AP1	AP1F: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3' ; AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'	94° C/5 min. 30 ciclos (94°C / 30 seg., 60°C / 30 seg., 72°C / 60 seg.);	<i>pVAI</i>	700 pb	Flegel & Lo, 2014
AP2	AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3' ; AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'	72°C / 10 min	<i>pVAI</i>	700 pb	
AP3	AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'	94° C/5 min. 30 ciclos (94°C / 30 seg., 53°C / 30 seg., 72°C / 40 seg.); 72°C / 5 min.	<i>PirA^{VP}</i>	333 pb	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' ; VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'	94° C/3 min. 35 ciclos (94°C / 30 seg., 60°C / 30 seg., 72°C / 30 seg.); 72°C / 7 min	<i>PirA^{VP}</i>	284 pb	Han <i>et al.</i> , 2015 ^a
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' ; VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'		<i>PirA^{VP}</i>	392 pb	
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: 5'-GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA-3' ; TUMSAT-Vp3 R: 5'-TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3'	95° C/2 min. 30 ciclos (95°C / 30 seg., 56°C / 30 seg., 72°C / 30 seg.);	<i>PirA^{VP}</i>	360 pb	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
AP4 Etapa1	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-AA-AAA-CAT-GAA-AC-3' ; AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'	94° C/2 min. 30 ciclos (94°C / 30 seg., 55°C / 30 seg., 72°C / 90 seg.); 72°C / 2 min	<i>VP_{AHPND}</i>	1269 pb	Dangtip <i>et al.</i> , 2015
AP4 Etapa2	AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3' ; AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TC-3'	94° C/2 min. 25 ciclos (94°C / 20 seg., 55°C / 20 seg., 72°C / 20 seg.);		230 pb	

3.8.4 Genes utilizados de para detecção de cepas de *V. parahaemolyticus*

Para a identificação da espécie de *V. parahaemolyticus* foi utilizado o iniciador do gene *tl* (hemolisina termolábil) (BEJ *et al.*, 1999). Os iniciadores foram sintetizados pela CROMA *bioTechnologies* (Brasil) (Tabela 3).

Tabela 3: Iniciador e condições de termociclagem utilizado na investigação molecular para espécie *V. parahaemolyticus*

Nome do método	Iniciador	Condições de termociclagem	Tamanho do amplicon	Referência
<i>tl</i>	F: 5'-AAA-GCG-GAT-TAT-GCA-GAA-GCA-GTG-3' R: 5'-GCT-ACT-TTC-TAG-CAT-TTT-CTC-TGC-3'	94° C/3 min. 30 ciclos (94°C / 1 min., 58°C / 1 min., 72°C / 1 min.); 72°C / 5 min.	450 pb	Bej <i>et al.</i> , 1999

tl= hemolisina termolábil; pb = par de base

3.9 Eletroforese

A confirmação da amplificação dos fragmentos do DNA de interesse (gênero *Vibrio*, espécie e genes relativos à plasmídeo e toxina AHPND) foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. Para isso, foi preparada uma mistura pela adição de 2 µL do corante Blue Juice, 1 µL do intercalante GelRed™, 1 µL de Tampão de corrida Acetato-EDTA (TAE 1X) e 1 µL da amostra de DNA amplificado. A mistura, com cada amostra, foi aplicada nos poços do gel de agarose, o qual foi submetido à corrida com voltagem de 100 V por 1 h. Para determinação do tamanho do amplicon, foi aplicado no primeiro poço um marcador 1 kb (DNA Ladder). Após a corrida, o gel foi fotodocumentado em sistema EDAS 120 (Kodak) para análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Quantificação de colônias

Foram isoladas um total de 109 cepas, dessas, 67 provenientes das amostras de água e 42 oriundas do sedimento. O ponto com maior número de isolados foi Rio Pirangi com 46 cepas, sendo 24 da água e 22 do sedimento. Rio Jaguaribe ficou em segundo com 34 isolados, 24 oriundas da água e 10 do sedimento. E em terceiro Rio Acaraú com um total de 29 cepas, sendo 19 de água e 10 de sedimento.

Os estuários estudados apresentam alta abundância de bactérias do gênero *Vibrio*. As contagens de UFC de *Vibrio* na água e sedimento estão detalhadas na tabela 5. As amostras de água do Rio Acaraú (Ponto 3) apresentaram o maior número de unidades formadoras de colônias (Figura 2). O crescimento de colônias bacterianas em amostras de sedimento só foi observado na segunda coleta do Rio Jaguaribe e as duas coletas do Rio Pirangi. Nas demais o crescimento foi inferior a 50 UFC/g.

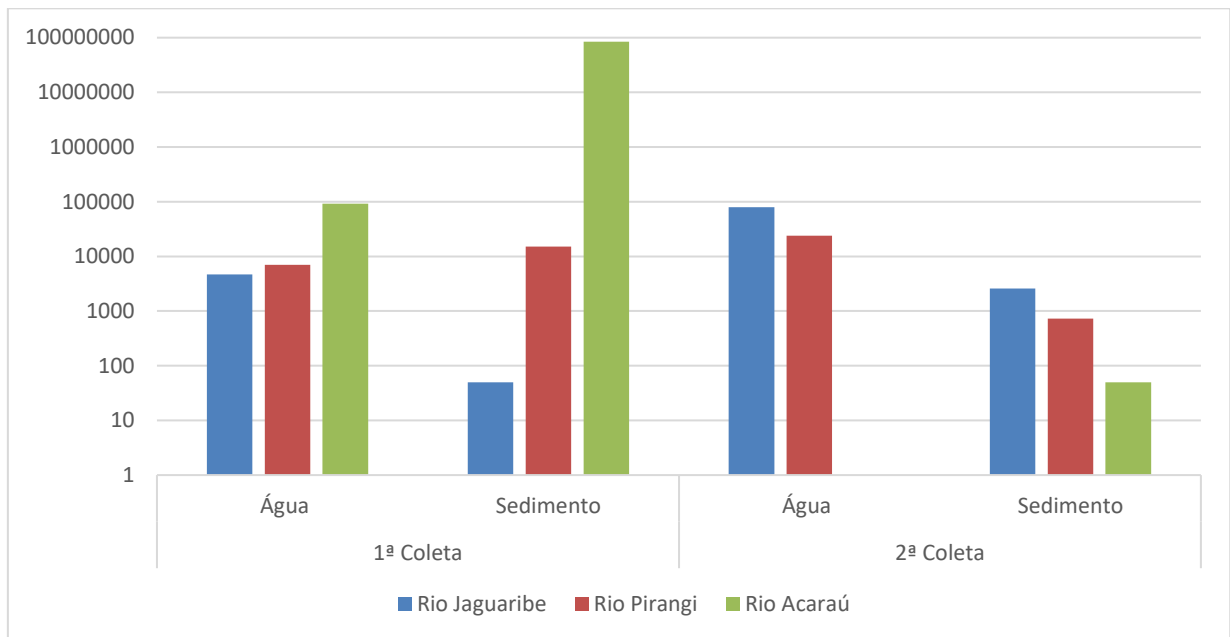
Tabela 4 – Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Vibrio* nos estuários durante o período de estio na primeira e segunda coleta.

Coletas	Locais de Coleta	Água UFC/mL	Sedimento UFC/g
1ª Coleta	Rio Jaguaribe	$4,70 \times 10^3$	< 25
2ª Coleta	Rio Jaguaribe	$7,95 \times 10^4$	$2,60 \times 10^3$
1ª Coleta	Rio Pirangi	$7,00 \times 10^3$	$1,52 \times 10^4$
2ª Coleta	Rio Pirangi	$2,40 \times 10^4$	$7,25 \times 10^2$ est
1ª Coleta	Rio Acaraú	$9,20 \times 10^4$	< 25
2ª Coleta	Rio Acaraú	$8,48 \times 10^7$	< 25

Est: Estimada

Fonte: Autor (2022)

Figura 2 - Contagem Padrão em Placas (CPP) das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Vibrio* nos estuários durante o período de estio.



Fonte: Autor (2022)

O gênero *Vibrio*, está presente nos estuários estudados, é abundante em ecossistemas marinhos e estuarinos e assume essencial importância em ambiente de carcinicultura. A distribuição dos víbrios em ambientes estuarinos próximos a fazendas produtoras de camarão é influenciada pela disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica proveniente dos efluentes aquícolas (COSTA *et al.*, 2010).

Os resultados da Contagem Padrão em Placa (CPP) foram superiores aos encontrados por Vieira *et al.*, (2010) durante o período de estio (agosto a novembro de 2008), que realizou coletas em quatro fazendas de camarão situadas nos estuários dos Rios Jaguaribe e Acaraú. Isto pode ter sido ocasionado pela diferença de mais de dez anos entre os trabalhos, interferindo da quantidade de matéria orgânica presente no estuário após esse período.

Nos três estuários analisados, a contagem de *Vibrio* na água foi superior à encontrada no sedimento com exceção da primeira coleta no estuário do Rio Pirangi. Este fato pode ter sido provocado por um acúmulo de matéria orgânica no solo no ponto da coleta. Segundo Neogi *et al.*, (2014) no ambiente estuarino, espécies de vibrio se ligam ao plâncton vivo, morto ou em degradação em busca de nutrição, sobrevivência e fuga de predadores.

Rocha, (2016) avaliou o perfil fenotípico de bactérias por meio de coletas de água e sedimento em estuários e fazendas de carcinicultura nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. O autor observou que todas as contagens de *Vibrio* total da água foram estatisticamente

superiores às do sedimento. Este fato pode estar relacionado a quantidade de nutrientes e oxigênio na água ser superior ao encontrado no sedimento, a morfologia das bactérias que promove mobilidade com tendência a serem planctônicas e sua dispersão na coluna d'água (NEOGI *et al.*, 2014; ROCHA, 2016).

4.2 Análise de variáveis abióticas

Os valores de salinidade apresentaram uma grande variação, entre 35 ppt e 54 ppt, de acordo com os locais de coleta. A temperatura mais elevada foi encontrada no estuário do Rio Jaguaribe durante a primeira coleta (35°C) e o valor mais baixo foi aferido no mesmo ponto durante a segunda coleta (28°C). Os valores de pH correspondentes as amostras coletadas, apresentaram valores entre 7,83 e 8,42, conforme a tabela 6.

Tabela 5 – Aferição de variáveis abióticas nos estuários durante o período de estio.

Coleta	Local	Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	pH
1ª Coleta	Jaguaribe	35	35	8,15
2ª Coleta	Jaguaribe	46	28	7,83
1ª Coleta	Pirangi	44	34	8,36
2ª Coleta	Pirangi	54	31	7,93
1ª Coleta	Acaraú	39	30	8,42
2ª Coleta	Acaraú	40	27	8,03

Fonte: Autor (2022)

Tabela 6 - Matriz de Correlação de Pearson para dados de variáveis abióticas e contagem de colônias bacterianas na água e sedimento.

	pH	Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	Vibrio na Água (LogUFC/ml)	Vibrio no Sedimento (LogUFC/g)
pH		-0,498 (0,314)	0,472 (0,345)	-0,244 (0,642)	-0,136 (0,797)
Salinidade (ppt)	-0,498 (0,314)		-0,208 (0,692)	-0,122 (0,818)	0,617 (0,192)
Temperatura (°C)	0,472 (0,345)	-0,208 (0,692)		-0,816 (0,047)	0,172 (0,744)
Vibrio na Água (LogUFC/ml)	-0,244 (0,642)	-0,122 (0,818)	-0,816 (0,047)		-0,423 (0,403)
Vibrio no Sedimento (LogUFC/g)	-0,136 (0,797)	0,617 (0,192)	0,172 (0,744)	-0,423 (0,403)	

O valor *p* da significância da correlação está entre parênteses.

Fonte: Autor (2022)

Os valores encontrados de variáveis ambientais e contagem de colônias do presente trabalho apresentaram distribuição normal. Depois de submetidos ao teste de correlação de *Pearson* (Tabela 6), é possível afirmar que existe correlação negativa significativa entre a temperatura e a contagem padrão em placas das unidades formadoras de colônias de *Vibrio* na matriz água. Dessa forma, quanto maior a temperatura, menor o número de colônias bacterianas.

Variáveis ambientais, como salinidade, temperatura e pH, são os fatores que afetam a diversidade do gênero bacteriano estudado nessa pesquisa e de acordo com a literatura estão correlacionadas com sua abundância nos estuários. Essa correlação é positiva entre as espécies desses microrganismos e a temperatura da água nos estuários (COSTA *et al.*, 2010; ROCHA, 2016; MENEZES *et al.*, 2017).

Rodrigues & Filho, (2012) estudaram a população de *V. parahaemolyticus* em ostras cultivadas no município de Cachoeira, Bahia. A salinidade se correlacionou positivamente com a abundância desses organismos, à medida que essa variável abiótica se apresentou mais elevada, aumentou a contagem de bactérias. Diferente do encontrado no presente trabalho, no qual os maiores valores de temperatura e salinidade ocorreram nos pontos P1 (35°C) e P2 (54 ppt), respectivamente, não se correlacionaram com as maiores contagens de UFC de *Vibrio* – que ocorreram no ponto P3. Este fato pode ser justificado pelo motivo de que algumas bactérias como as pertencentes ao gênero *Vibrio*, podem sobreviver em ambientes com condições ambientais desfavoráveis por um determinado período de tempo, apresentando-se

na forma de viável, mas não cultivável (VNC), estado onde os microrganismos possuem baixa atividade metabólica (ADAMS *et al.*, 2003).

O estuário do Rio Acaraú (ponto 3) apresentou maior contagem de *Vibrio* na água, bem como o maior índice de pH dos três pontos, corroborando com Costa *et al.*, (2010), os autores quantificaram e determinaram a distribuição de espécies do gênero *Vibrio* em amostras de água provenientes do estuário do Rio Coreaú, indicando que altos valores de pH foram o fator ambiental que mais contribuiu para o aumento da abundância de *Vibrio* no Rio Coreaú.

Vieira *et al.* (2010) não observaram correlação entre as variáveis físico-químicas analisadas e as respectivas contagens de *Vibrio* spp. para água e sedimento em fazendas de camarão situadas nos estuários dos Rios Jaguaribe e Acaraú.

Pesquisas recentes demonstram que variáveis abióticas como temperatura e salinidade exercem influência sobre a virulência e expressão do gene PirA em *V. parahaemolyticus* portador da AHPND (VpAHPND). Resultados indicaram que temperaturas mais baixas podem reduzir a virulência, afetando a produção da toxina, e que o aumento da salinidade é diretamente proporcional a capacidade de transcrição do gene PirA (LOPÉZ-CERVANTES *et al.*, 2021). Porém, no presente trabalho, não foi possível analisar a incidência e a virulência por não haver confirmado a presença de AHPND mesmo utilizando um protocolo completo proposto pela OIE.

Os mesmos autores reforçam que a influencia da salinidade sob a transcrição do gene PirA é mais dominante que a temperatura. Portanto durante períodos chuvosos, bem como em regiões onde a salinidade da água é inferior a 20ppt, a incidência da doença, portanto surtos de AHPND tendem a ser menos frequentes (LOPÉZ-CERVANTES *et al.*, 2021)

4.3 Amplificação do DNA para confirmação do gênero *Vibrio*

Foi realizada a extração de DNA das 109 cepas isoladas. Todas as 109 cepas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* e encaminhadas para detecção de plasmídeo e de toxinas referentes à doença AHPND.

A identificação genotípica tem a capacidade de fornecer informações valiosas sobre a comunidade microbiana e de superar as limitações de métodos baseados em culturas. São procedimentos simples e rápidos capazes de caracterizar populações microbianas, inclusive para estudos em nível de gênero e espécie (KIRK *et al.*, 2004).

Menezes *et al.* (2020), avaliaram o potencial patogênico de *Vibrio parahaemolyticus* provindos de amostras de água e sedimento de estuários dos Rios Jaguaribe e Pirangi no estado do Ceará. Assim como no presente estudo, os autores identificaram bactérias do gênero *Vibrio* nas amostras utilizando técnicas de PCR, indicando que é comum encontrar esse gênero de bactérias nos rios estudados.

4.4 Diagnóstico da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND)

Nos testes referentes aos métodos AP1 e AP2, que visam a detecção do plasmídeo (pVA1), quatro amostras (Rio Acaraú 4,7,12 e 13) apresentaram resultados positivos para o AP1 e apenas sete (Rio Pirangi 5, Rio Acaraú 13 e Rio Jaguaribe 16, 17, 19, 20 e 25) positivaram para o método AP2 (Tabela 7). Para os testes de PCR seguintes, nenhuma das amostras apresentou positividade, exceto pela amostra do Rio Pirangi 72 que positivou no passo dois do método AP4, utilizado para detecção do *V. parahaemolyticus* causador de AHPND.

Tabela 7: Amostras que apresentaram resultado positivo para algum método de PCR testado.

ORIGEM	CÓDIGO	MÉTODO						
		AP1	AP2	AP3	TUMSAT	VPIR A	VPIR B	AP4 PASSO 2
Rio Acaraú	4	+	-	-	-	-	-	-
Rio Acaraú	7	+	-	-	-	-	-	-
Rio Acaraú	12	+	-	-	-	-	-	-
Rio Acaraú	13	+	+	-	-	-	-	-
Rio Pirangi	5	-	+	-	-	-	-	-
Rio Jaguaribe	16	-	+	-	-	-	-	-
Rio Jaguaribe	17	-	+	-	-	-	-	-
Rio Jaguaribe	19	-	+	-	-	-	-	-
Rio Jaguaribe	20	-	+	-	-	-	-	-
Rio Jaguaribe	25	-	+	-	-	-	-	-
Rio Pirangi	72	-	-	-	-	-	-	+

Métodos AP1 e AP2 para detecção do plasmídeo. Métodos AP3, TUMSAT, VPIRA e VPIRB para detecção de genes da toxina Pir. Método AP4 para detecção da bactéria portadora da AHPND.

Fonte: Autor (2022)

É interessante evidenciar que as amostras que apresentaram resultados positivos, em pelo menos um método, são advindas das amostras de água, sendo quatro originárias do estuário do Rio Acaraú, seis originárias do estuário do Rio Jaguaribe e apenas uma do estuário

do Rio Pirangi. Este fato pode ter ocorrido pela maior contagem ter sido apresentada em amostras advindas da matriz água.

As amostras oriundas da lavagem das placas de petri com colônias que não foram isoladas também foram submetidos aos testes de PCR, mas nenhuma das amostras se mostrou positiva aos métodos testados.

Flegel & Lo (2014), que propuseram os métodos AP1 e AP2, utilizados para detectar o plasmídeo causador de AHPND, testaram a especificidade dos métodos, porém não garantem que haja sucesso na detecção de todos os isolados bacterianos causadores de AHPND, o que pode ter interferido nos resultados. Foi possível identificar o resultado positivo de algumas amostras para o método AP2, enquanto as mesmas apresentavam resultados negativos para o AP1. Este fato pode ser explicado pelas sequências de oligonucleotídeos utilizadas que eram direcionadas para fragmentos diferentes do DNA.

Nenhuma das amostras analisadas apresentou resultado positivo para o método AP3, desenvolvido por Sirikharin *et al.* (2015), que é utilizado para detecção das toxinas *PirA* e *PirB*. O mesmo aconteceu para Navaneeth *et al.* (2020), que utilizaram os métodos AP3 e AP4 para amostras isoladas de fazendas de camarão na Índia. As toxinas não foram identificadas nos 109 isolados de *Vibrio parahaemolyticus*.

Os métodos TUMSAT, VPIRA e VPIRB que, assim como AP3, são utilizados para detecção das toxinas, também não apresentaram resultados positivos nas amostras. Dessa forma entende-se que as cepas analisadas podem carregar o plasmídeo causador da AHPND, mas sem produzir a toxina. Tinwongger *et al.* (2014) mostram que os métodos possuem especificidade e se enquadram na região da toxina, porém não são capazes de confirmar a virulência das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* portador da AHPND e para determinar seu mecanismo de patogenicidade.

A detecção do plasmídeo é importante pelo fato de ser possível a sua transferência entre bactérias, inclusive de diferentes clados e em consequência, a transferência de características patogênicas à bactérias anteriormente não patogênicas, incluindo a capacidade infecciosa de AHPND (RESTEPRO *et al.*, 2014).

Para o método AP4, que é utilizado para detectar *Vibrio parahaemolyticus* portador da AHPND, apenas a amostra 72 apresentou resultado positivo. Este método é considerado mais rápido e preciso do que o método AP3 para detecção da doença em estágios iniciais ou infecções leves (DANGTRIP *et al.*, 2015). Porém não é possível afirmar que a amostra isolada é de uma cepa causadora de AHPND sem que haja um bioensaio para confirmar a patogenicidade do agente causador (OIE, 2019).

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho não é possível afirmar que foi detectado um caso positivo de AHPND. Por mais que tenhamos identificado a presença do plasmídeo pVA1 através dos testes, não foi identificada a presença de genes relacionados as toxinas VPirA e VPirB. Dentre as amostras testadas, a única que apresenta suspeita, é a amostra 72, visto que demonstrou atender um dos pré-requisitos estabelecidos pela OIE.

4.5 Identificação de *V. parahaemolyticus*

Foi realizada PCR para identificação da espécie *Vibrio parahaemolyticus* nas amostras que apresentaram resultado positivo para algum método de PCR conforme a tabela 7. Nenhuma das 11 cepas testadas apresentou resultado positivo para a espécie *V. parahaemolyticus*.

A espécie *V. parahaemolyticus* é citada no manual da OIE (2019), como um dos principais portadores da AHPND, podendo infectar o camarão cultivado e atingir até 100% de mortalidade em 30 dias. Soto-Rodriguez *et al.* (2015) analisaram amostras de camarões moribundos afetados pela AHPND advindos de fazendas no noroeste do México e identificaram *V. parahaemolyticus* através do gene *tlh*, confirmando sua capacidade de portar a toxina que desencadeia a AHPND. Gonzalez-Meza *et al.* (2022) realizaram um ensaio em laboratório incitando a infecção de *V. parahaemolyticus* portador da AHPND em camarões e constatou mortalidade de 40% da população testada.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi constatado que bactérias do gênero *Vibrio* foram detectadas em amostras dos três estuários estudados. Sua abundância foi maior em água do que em sedimento com exceção da primeira coleta no estuário do Rio Pirangi. Apesar de não ter sido detectada a toxina entre os isolados de *Vibrio*, a partir dos resultados obtidos sabe-se que o plasmídeo que carrega os genes da toxina circula entre as populações de *Vibrio* em estuários com presença maciça de atividade de cultivo de camarão marinho.

REFERÊNCIAS

- ABCC. Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Socioeconômicos, Sustentabilidade Ambiental, Entraves e Oportunidades. **Revista ABCC**, Natal, Janeiro, p80. 2011.
- ADAMS, B. L.; BATES, T. C.; OLIVER, J. D. Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, [S.L.], v. 69, n. 12, p. 7462-7466, dez. 2003. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.12.7462-7466>, 2003.
- ADAMS, D. & BOOPATHY, R. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. **Biologia (Poland)**, v. 68, n. 6, p. 1017–1021, 2013.
- AHMED, J. *et al.*, Acute Hepatopancreatic Necrosis Diseases (AHPND) as Challenging Threat in Shrimp. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. [S.L.] v. 12, n. 1, p. 978–991, 2021.
- ALBUFERA, U. *et al.*, Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. **Infection, Genetics, Evolution**, Amsterdam, v.9, n.3, p.322-327, may 2009.
- BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, [S.L.] v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008.
- BEJ, A. *et al.*, Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. **Journal of Microbiological Methods**, Netherlands, v. 36, p. 215-225, 1999.
- BONDAD-REANTASO, M. G. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of penaeid shrimps: global perspective. In **Addressing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other transboundary diseases for improved aquatic animal health in Southeast Asia**. Southeast Asian Fisheries Development Center/Aquaculture Department, Iloilo, Philippines., p. 15-23. 2016.
- CHONSIN, K. *et al.*, Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. **FEMS Microbiology Letters**, Tailandia. v. 363, n. 2, p. 1–8, 2015.
- CHUMPOL, S. *et al.*, In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. **Aquaculture research**, [S.L.]. v. 48, n. 6, p. 3182-3197, 2017.
- COSTA, R. A. *et al.*, Quantificação e distribuição de espécies de vibrio na água de um estuário do Ceará-Brasil impactado pela criação de camarão. **Revista Brasileira de Oceanografia**, [S.L.]. v. 58, n. 3, 2010.

COSTA, S. W. *et al.*, Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasil. v. 45, n. 12, p. 1521–1530, 2010.

DANGTIP, S. *et al.*, AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture Reports**, [S.L.]. v. 2, p. 158-162, 2015.

DECAMP, O. & MORIARTY, D.J.W.P. Probióticos como alternativa anti-microbiana: limitações e potencial. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, [S.L.]. ano 7, nº 4, p.58-59, 2005.

DOWNES M. P. & ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**. 4th ed. Washington, DC, 2001.

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [citado 15 de Maio 2020]. Disponível em: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.html>. Acesso em: 15 mai. 2020

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome: FAO - Fisheries and Aquaculture Department. p.197, 2010.

FAO. **Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp**. Hanoi, Vietnã, 25-27 Junho, 2013.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018**-Meeting the sustainable development goals. [S.L.]. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2018.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 – Sustainability in action**. Rome: FAO - Fisheries and Aquaculture Department, 2020.

FLEGEL, T. W.; LO, CHU FANG. Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific**, Thailand, 2014.

FOES, Geraldo Kipper. **Crescimento compensatório do camarão-branco *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) no extremo Sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Programa de pós graduação em Aquicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008 p. 18-22.

GOMEZ-GIL, B. *et al.*, Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. **Genome Announc**. México, v. 2, n. 2, p. e00055-14, 2014.

GONZÁLEZ-MEZA, M. G. *et al.* Dietary supplementation effect of three microalgae on *Penaeus vannamei* growth, biochemical composition, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND). **Latin American Journal of Aquatic Research**, [S.L.]. v. 50, n. 1, 2022.

- HAN, J. *et al.*, *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. **Diseases of aquatic organisms**, [S.L.]. v. 113, n. 1, p. 33-40, 2015.
- ICAR. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease / Early Mortality Syndrome (AHPND/EMS). **CIBA** - Extension Series No. 50, Chennai. 2016.
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018 PPM. **IBGE**, Brasil. p. 1–8, 2018.
- JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **Journal of the World Aquaculture Society**, India, v. 37, n. 4, p. 523–532, 2006.
- JONES, J. L. *et al.*, Effects of ambient exposure, refrigeration, and icing on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* abundances in oysters. **International journal of food microbiology**, [S.L.]. v. 253, p. 54-58, 2017.
- KAYSNER, C.A. *et al.*, **Bacteriological Analytical Manual (BAM): Vibrio**. 2004.
Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070830.htm>.
Acesso em: 13 mai. 2021
- KIRK, J. L. *et al.*, Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, [S.L.]. v. 58, n. 2, p. 169–188, 2004.
- KUMAR, B. K. *et al.*, Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture**, [S.L.]. v. 433, n. November 2013, p. 247–251, 2014.
- LOMELÍ-ORTEGA, C.O. & MARTÍNEZ-DÍAZ, S.F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture**, [S.L.]. v. 434, p. 208– 211, 2014.
- LONGO, S. B. *et al.*, Aquaculture and the displacement of fisheries captures. **Conservation Biology**, [S.L.]. v. 33, n. 4, p. 832–841, 11 ago. 2019.
- LOPÉZ-CERVANTES, G. *et al.*, Temperature and salinity modulate virulence and PirA gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. **Aquaculture International**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 743-756, 26 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-021-00654-0>.
- LUANGTRAKUL, W. *et al.*, Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes, a newly identified target tissue, involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. **PLOS Pathogens**, [S.L.]. v. 17, n. 3, p. e1009463, 2021.
- MATEUS, L. *et al.*, Efficiency of phagecocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. **Aquaculture**, [S.L.]. v. 424–425, p. 167–173, 2014.

- MENEZES, F. G. R. *et al.* Pathogenic potential of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from tropical estuarine environments in Ceará, Brazil. **Journal of Tropical Pathology**, [S.L.]. v. 49, n. 2, p. 94–104, 2020.
- MENEZES, F. G. R. *et al.*, Pathogenic *Vibrio* species isolated from estuarine environments (Ceará, Brazil) – antimicrobial resistance and virulence potential profiles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.]. v. 89, n. 2, p. 1175–1188, 2017.
- MORIARTY, F. Ecotoxicology. **Human toxicology**, [S.L.]. v. 7, n. 5, p. 437-441, 1988.
- MUTHUKRISHNAN, S. *et al.*, Horizontal gene transfer of the *pirAB* genes responsible for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) turns a non- *Vibrio* strain into an AHPND-positive pathogen. **bioRxiv**, n. December, [S.L.]. p. 2019.12.20.884320, 2019.
- NASCIMENTO, I. A. Manguezal E Carcinicultura: O Conflito Da Ecompatibilidade. **Diálogos&Ciência**, [S.L.]. v. 5, n. 10, p. 1–15, 2007.
- NAVANEETH, K. A. *et al.*, Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from shrimp farms of Southeast coast of India with special reference to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) status. **Aquaculture**, [S.L.]. v. 518, n. December 2019, p. 734813, 2020.
- NEOGI, S. B. *et al.*, The role of wetland microinvertebrates in spreading human diseases. **Wetlands Ecology and Management**, [S.L.].v. 22, 461–491, 2014.
- NUNAN, L. *et al.*, Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S.L.].v. 111, n. 1, p. 81–86, 2014.
- OIE. Chapter 2.2.1 - Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris: OIE, 2019. p. 1–12. 2019.
- OSTRENSKY, A.; ROBERTO, B. J.; DORIS, S. Estudo setorial para consolidação de uma aqüicultura sustentável no brasil. **Grupo integrado de aqüicultura e estudos ambientais**, n. 1, p. 279, Curitiba, 2007.
- REBOUÇAS, R. H. *et al.*, *Vibrio* spp . Como patógenos na carcinicultura: alternativas de controle. **Arquivos de Ciências do Mar**, [S.L.]. v. 50, n. 1, p. 163, 2017.
- RESTREPO, L. *et al.*, *PirVP* genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal *Orientalis* clade. **Scientific Reports**, [S.L.]. v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- RICO, A. *et al.*, Microbial immunostimulants reduce mortality in White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. **Aquaculture**, [S.L.]. v. 320, n. 1-2, p. 51–55, 2011.
- ROCHA, I. P.; MAIA, E. P. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira. In: **Aquicultura Brasil**, 98., 1988, Recife. Anais. ABRAq. Recife, p. 213-236. 1988.

ROCHA, I. de P.; RODRIGUES, J.; AMORIN, L. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, Natal, v.6, p.30-36, 2004.

ROCHA, I.; BORBA, M.; NOGUEIRA, J. O Censo da Carcinicultura Nacional em 2011. **Panorama da Aquicultura**, [S.L.]. 2013.

ROCHA, R. D. S. **Caracterização polifásica da comunidade bacteriana heterotrófica de ambiente de carcinicultura frente às tetraciclina**s. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

RODRIGUES, L. DE A. P.; FILHO, C. D. C. **Avaliação Da Ocorrência De *Vibrio parahaemolyticus* Em Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) Cultivadas na Baía de Todos os Santos**. [S.L.]. v. 14, n. 71, p. 197–207, 2012.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Anesthesia & Analgesia**. [S.L.]. V. 126, N. 5, p. 1763–1768, 2018.

SERNAPESCA. **Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura**. Informe sobre uso de antimicrobianos em La salmonicultura nacional 2012. [S.L.]. p. 13, 2013.

SIRIKHARIN, R. *et al.*, Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. **PloS one**, [S.L.]. v. 10, n. 5, 2015.

SOUSA, O. V. *et al.* The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceara, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.]. v. 52, n. 12, p. 1725-1734, 2006.

SOTO-RODRIGUEZ, S. A. *et al.* Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.L.]. v. 81, n. 5, p. 1689–1699, 2015.

TINWONGGER, S. *et al.*, Development of PCR diagnosis for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish disease research** [S.L.].v. 49, n. 4, p. 159-164, 2014.

TRAN, L. *et al.*, Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S.L.]. v. 105, n. 1, p. 45–55, 2013.

VIEIRA, R. H. S. DOS F. *et al.*, *Vibrio* na água e sedimento de viveiros de quatro fazendas de carcinicultura no estado do Ceará, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S.L.]. v. 47, n. 6, p. 454–460, 2010.

WAINBERG, A. A.; CAMARA, M. R. Carcinicultura no litoral oriental do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil: interações ambientais e alternativas mitigadoras. In: **Aquicultura Brasil**, Recife. Anais. p. 527-544,1998.

- WEN, C. *et al.*, Evaluating the potential of marine Bacteriovorax sp. DA5 as a biocontrol agent against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae. **Veterinary Microbiology**, [S.L.]. v. 173, n. 1–2, p. 84–91, 2014.
- WONGTAVATCHAI, J.; LÓPEZ-DÓRIGA, M. V.; FRANCIS, M. J. Effect of AquaVacTMVibromaxTM on size and health of post larva stage of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and Black Tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, [S.L.]. v. 308, n. 3–4, p. 75–81, 2010.
- YANG, L. *et al.*, The low-saltstimulon in *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.]. v. 137, n. 1, p. 49–54, 2010.
- ZHANG, X.-J. *et al.*, Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* Associated with Mass Mortality of Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) . **Journal of Shellfish Research**. [S.L.]. , v. 33, n. 1, p. 61–68, 2014.
- ZIMMERMANN, S. O melhoramento genético de tilápias em sistema de bioflocos no brasil. **Associação brasileira dos criadores de camarão**, [S.L.]. p. 1–88, nov. 2017.
- ZORRIEHZAHRA, M. J. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, [S.L.]. v. 3, n. 2s, p. 64–72, 2015.