



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**JAMILLE MARTINS FORTE**

**MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* e  
*Farfantepenaeus brasiliensis* EM AMBIENTES DE CULTIVO E NATURAL**

**FORTALEZA**

**2019**

JAMILLE MARTINS FORTE

MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus  
brasilensis* EM AMBIENTES DE CULTIVO E NATURAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Manejo de ecossistemas para a produção biológica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F841m Forte, Jamille Martins.  
Microbiota intestinal de camarões *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus brasiliensis* em ambientes de cultivo e natural / Jamille Martins Forte. – 2019.  
118 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.  
Coorientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.
1. Camarões. 2. Atividade enzimática. 3. Microbiota cultivável. 4. Ambientes de cultivo. 5. Ambientes estuarinos. I. Título.

CDD 551.46

---

JAMILLE MARTINS FORTE

MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus brasiliensis* EM AMBIENTES DE CULTIVO E NATURAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Manejo de ecossistemas para a produção biológica.

Aprovada em: 22/01/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Presidente)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Vicente Vieira Faria (Membro Interno)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes (Membro Externo)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Alitiane Moura Lemos Pereira (Membro Externo)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

---

Dr. Rafael dos Santos Rocha (Membro Externo)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, ao Fagner Nogueira e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Nossa Senhora de Fátima e ao Sagrado Coração de Jesus por terem me proporcionado saúde, força, fé e uma mente sã para acreditar que a ciência e a religião podem ser conciliadas.

Aos meus pais, especialmente a minha mãe Rosa, por todo apoio nos momentos difíceis, por todas as demonstrações de persistência e resiliência quando o momento pedia para desistir. Por continuar me ensinando que tudo na vida passa e que se permita aproveitar os momentos bons. Todos os dias, a vejo e peço que um dia eu também saiba passar os seus ensinamentos. Saber como, muitas vezes, a necessidade de falar uma palavra mais dura para que nos reergamos e também as palavras mais doces como uma forma de reconhecimento, posso dizer mãe, todas as suas palavras e atitudes são necessárias e inspiradoras para mim. Vou amá-la sempre!

Ao Fagner Nogueira, meu companheiro, namorado e grande amigo. Por tantas vezes, durante os insucessos da vida, mostrar-me a razão quando o sentimento estava querendo vir à tona. Por enxugar minhas lágrimas diante do medo e frustrações. Por toda ajuda no trabalho e na vida pessoal. Pelo homem que você é, sempre prestativo, racional e amoroso. Tenho certeza que esta jornada não teria a mesma desenvoltura sem você. Amo-te!

Aos amigos que o laboratório CEDECAM me trouxe, os veteranos: Maximiliano (Max, *Brother*), Rubens Feijó, Janaína Santiago, André Santiago, Mayara Barreto (May), João Mafaldo, Graça Coelho (Gracinha), Roberto Aurelio e Juliana Gaeta por todos os momentos de alegria, ajuda e lamentações compartilhadas com vocês no laboratório. Permitam-me, agradecer com mais ênfase a Gracinha, além de prestar seus serviços a sociedade como funcionária pública, exerce sua humanidade todos os dias a todos nós do laboratório e do LABOMAR. Seu poder de manter sempre a frente a santidade nos faz acreditar em dias melhores e nos fortalece para as dificuldades do dia a dia. Sua empatia com o próximo sempre me fez rever meus pensamentos antes de demonstrá-los. Agradeço por fazer parte da minha vida. Deus a abençoe sempre!

Aos amigos mais novos: Ingrid Luana por se mostrar uma menina mulher tão forte e ao mesmo tempo tão meiga, agradeço por toda ajuda e conselhos. Por favor, mantenha-se sempre cativante, um grande abraço. Rafael Rocha, obrigada por toda ajuda prestada, pelos ensinamentos e contribuições sobre o universo da microbiologia e pelas críticas do mundo cinematográfico. Aos demais que entraram recente no laboratório, tenho certeza que farão grandes progressos na ciência, sejam sempre bem-vindos a nossa família CEDECAM.

Ao professor Rodrigo Maggioni, ao encerrar esta etapa da minha vida, estive sob sua orientação por um pouco mais de dez anos. Ao decorrer de todo este tempo, agradeço por todos os ensinamentos, ajuda e por ter me acompanhado durante a maior parte da minha vida acadêmica. Sempre serás um exemplo de profissional.

A professora Oscarina, que foi minha co-orientadora durante o doutorado. Agradeço primeiramente por ter acreditado em mim para o desenvolvimento do projeto, como também, por ter me proporcionado passar uma boa parte da pesquisa em seu laboratório. Aprendi muito com toda a equipe do LAMAP, especialmente a Cristiane (Cris) que foi responsável por administrar todos os procedimentos, a Jade por ter me ajudado na parte dos fungos, a Gleire por sua participação quando ainda não sabíamos como iniciar a pesquisa. A todos do LAMAP que contribuíram para que este trabalho tenha sido concluído. Muito obrigada!

Ao Programa de Ciências Marinhas Tropicais (LABOMAR/UFC) pela estrutura oferecida, pelos professores e atividades desenvolvidas que me fizeram desenvolver mais como pesquisadora. A secretária da pós-graduação Isabela pela ajuda prontamente oferecida durante os trâmites exigidos na pós.

A todos os servidores que fazem do LABOMAR um lugar de comprometimento científico e ao mesmo tempo familiar.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.” (Clarisse Lispector)

## RESUMO

O presente trabalho analisou a comunidade microbiana intestinal em quatro ambientes diferentes (água verde, bioflocos, água clara e natural), e verificou a associação e a ocorrência de duas viroses (WSSV e IMNV) em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus brasiliensis*. Adotou-se métodos microbiológicos e moleculares para isolamento e identificação das cepas. O sistema de cultivo de *L. vannamei* em água verde mostrou contagens microbianas maiores para o conteúdo intestinal, evidenciando os grupos lipolíticas, BHC e amilolíticas, assim como a presença de fungos no conteúdo intestinal. O gênero *Vibrio* esteve presente em todos os grupos funcionais analisados. Tanto espécies não patogênicas como potencialmente patogênicas na carcinicultura foram encontradas. Os maiores crescimentos foram associados aos animais infectados pelo IMNV ( $6,76 \times 10^2$  a  $1,14 \times 10^5$  cópias de IMNV. $\mu\text{g}^{-1}$  de RNA). Para os sistemas de cultivo em bioflocos e água clara, o perfil microbiano intestinal do *L. vannamei* apresentou maiores contagens microbianas no sistema de bioflocos do que no sistema de água clara. O crescimento de fungos foi evidenciado na água, no tecido e no conteúdo intestinal para ambos os sistemas de cultivo. Diferenças significativas entre os ambientes foram encontrados para os grupos de bactérias amilolíticas, lipolíticas e *Bacillus*. Todos os camarões em água clara foram positivos para o IMNV. Finalmente, em ambiente natural, a espécie *Farfantepenaeus brasiliensis* apresentou contagens microbianas superiores para as bactérias celulolíticas e BHC. A presença de fungos foi maior no intestino do que na água. Dentre os 45 camarões analisados, 21 foram positivos para o IMNV com uma média de carga viral  $7,65 \times 10^3$  cópias virais /  $\mu\text{g}$  RNA RT-qPCR. Este é o primeiro registro do IMNV para essa espécie no Rio Pacoti, Ceará. No entanto, não foi encontrada uma relação significativa entre o crescimento microbiano e a presença do vírus em *F. brasiliensis*. Em conclusão, para os quatro ambientes analisados, a maior prevalência de *Vibrio* se manteve em todos os grupos funcionais estudados. Para todos os ambientes e ambas as espécies a constituição microbiana intestinal foi similar em termos de diversidade, mas diferente em termos quantitativos. Além disso, o vírus do IMNV esteve presente em todos os ambientes. Os resultados obtidos nesta pesquisa servem como uma ferramenta para a obtenção de condições ideais de cultivo, através do conhecimento da comunidade microbiana do ambiente e do intestino de camarões sob condições de cultivo intensivo e natural.

**Palavras-chave:** Camarões. Atividade enzimática. Microbiota cultivável. Ambientes de cultivo. Ambientes estuarinos.

## ABSTRACT

The present work analyzed the intestinal microbial community in four different environments (green water, BFT, clear water and natural), and verified the association and occurrence of two viruses (WSSV and IMNV) in the marine shrimp species *Litopenaeus vannamei* and *Farfantepenaeus brasiliensis*. Microbiological and molecular methods were used to isolate and identify the microbial strains. In green water, *L. vannamei* showed higher microbial counts for intestine contents, with dominance by lipolytic, BHC and amylolytic groups, as well as the presence of fungi. The genus *Vibrio* was present in all functional groups analyzed. Non-pathogenic as well as potentially pathogenic species in shrimp farming were found. The highest growths were associated with the animals infected by the IMNV ( $6.76 \times 10^2$  to  $1.14 \times 10^5$  copies of IMNV. $\mu\text{g}^{-1}$  RNA). When considering BFT and clear water systems, the intestinal microbial profile of *L. vannamei* showed higher microbial counts for BFT. Fungal growth was observed in water, tissue and intestinal contents for both culture systems. Significant differences between environments were found for the groups of amylolytic, lipolytic and Bacillus bacteria. All shrimp in clear water were positive to IMNV. Finally, in natural environment *F. brasiliensis* presented higher microbial counts for cellulolytic and BHC bacteria. The presence of fungi was higher in the gut than in the water. From 45 shrimp analyzed, 21 were positive for the IMNV with a mean viral load of  $7.65 \times 10^3$  copies /  $\mu\text{g}$  RNA RT-qPCR. This was the first record of IMNV for this species in the Pacoti River, Ceará. In conclusion, *Vibrio* was the most prevalent genus among functional groups and environments studied. The intestinal microbial composition in terms of diversity seems to be similar among all environments; however, it is different in terms of proportions. In addition to that, IMNV was present in all environments. The results obtained here will help to achieve ideal conditions of farming, through the knowledge of the microbial community from the environment and shrimp gut under artificial and natural conditions.

**Keywords:** Shrimps. Enzymatic activity. Microbiota cultivable. Growing environments. Estuarine environments.

## LISTA DE FIGURAS

### *Antecedentes e justificativas*

- Figura 1** – Anatomia externa do camarão peneídeos..... 22
- Figura 2** – Ciclo de migratório dos camarões peneídeos..... 24
- Figura 3** – A: Mapa de distribuição da espécie (em vermelho), B: Foto representativa do *L. vannamei*, C: Desenho ilustrativo da visão lateral da carapaça, visão dorsal do petasma e do télico, respectivamente..... 25
- Figura 4** – A: Mapa de distribuição da espécie (em vermelho), B: Foto representativa do *Farfantepenaeus brasiliensis*, C: Desenho ilustrativo do sulco adostral, petasma e télico, respectivamente, D: Foto representativa do sulco adostral em lupa..... 27
- Figura 5** – O sistema digestivo. *Foregut*: Prov, proventriculus; Oes, esôfago; M, boca. *Midgut* (MG): AD, diverticulum anterior; DG: glândula digestiva. *Hindgut*: PD, diverticulum posterior; R, reto; A, ânus ..... 29
- Figura 6** – Secção transversal através da região tubular do intestino médio. LMusc, músculo longitudinal; PM, membrana peritrófica; CEpith, epitélio colunar..... 30
- Figura 7** – Porção final do intestino, *hindgut* PMG, posterior a *midgut*; PostDiv, diverticulum posterior; R, reto; T, telson; U, urópodes..... 30

### *Capítulo 3*

- Figura 1** – Mapa de localização da área de coleta amostral do município do Eusébio, Ceará, Brasil..... 88

## LISTA DE GRÁFICOS

### Capítulo 1

- Gráfico 1** – Total de unidades formadoras de colônia (UFC) (N total = 45 camarões) de amostras intestinais do *Litopenaeus vannamei* e na água de cultivo em sistema de água verde (SAV)..... 51
- Gráfico 2** – Crescimento bacteriano em intestinos individuais do *Litopenaeus vannamei*. N = 13 camarões; cada barra =  $\text{Log}_{10}$  da média UFC.g<sup>-1</sup> de intestino, Barra de erro = média ± erro padrão; P < 0.05; ANOVA - one way..... 52
- Gráfico 3** – Distribuição dos isolados bacterianos de acordo com os grupos de interesse (*Bacillus* spp., BHC e *Vibrio* spp.) e atividades enzimáticas. A identificação das sequências foi através do RDP (Ribossomal Database Project) seqmact (Similaridade e S\_ab score próximos a 1..... 53
- Gráfico 4** – Identificação de sequências a nível de gênero, de acordo com as classificações da base de dados do BLAST e RDP. O círculo interno representa as ordens identificadas e o círculo externo os respectivos gêneros 54

### Capítulo 2

- Gráfico 1** – Total de unidades formadoras de colônias (UFC) da água de cultivo em sistema de água clara (AC) e no sistema de Bioflocos (BFT). Acima da barra: valores logaritimizadas de contagens de colônias..... 64
- Gráfico 2** – Crescimento microbiano médio da microbiota residente em sistema de água clara (AC) e no sistema de Bioflocos (BFT). N = 3 pools de 15 camarões. Cada barra =  $\text{Log}_{10}$  da média UFC / g de intestino e barra de erro= desvio médio padrão..... 65
- Gráfico 3** – Crescimento microbiano médio da microbiota transitória em sistema de água clara (AC) e no sistema de Bioflocos (BFT). N = 3 pools de 15 camarões. Cada barra =  $\text{Log}_{10}$  da média UFC / g de intestino e barra de erro= desvio médio padrão..... 66
- Gráfico 4** – Porcentagem relativa de abundância bacteriana intestinal a nível de classe em sistema de cultivo água clara ..... 67

<b>Gráfico 5</b> – Classificação de gêneros bacterianos de acordo com a seleção de gêneros ( <i>Bacillus</i> spp., BHC e <i>Vibrio</i> spp.) e atividade enzimática para o ambiente de água clara .....	68
---	----

### **Capítulo 3**

<b>Gráfico 1</b> – Crescimento microbiano médio da microbiota residente e transitória no estuário do rio Pacoti (CE). N = 3 pools de 15 camarões. Cada barra = Log10 da média UFC / g de intestino e Log10 da média UFC / ml de conteúdo intestinal e água do ambiente, barra de erro= desvio médio padrão.....	82
<b>Gráfico 2</b> – Identificação de sequências a nível de gênero, de acordo com as classificações da base de dados do BLAST e RDP. O círculo interno representa as ordens identificadas e o círculo externo representa os gêneros.	83
<b>Gráfico 3</b> – Porcentagem relativa de abundância bacteriana intestinal a nível de classe no ambiente estuarino.....	84
<b>Gráfico 4</b> – Porcentagem relativa de abundância bacteriana intestinal a nível de gênero no ambiente estuarino.....	84

## LISTA DE TABELAS

### *MATERIAIS E MÉTODOS GERAL*

- Tabela 1** – Condições de cultivo e técnicas utilizadas para o crescimento bacteriano de gêneros específicos e atividade enzimática no intestino do *Litopenaeus vannamei*..... 97
- Tabela 2** – Sequências de primers e sondas Taqman para PCR em tempo Real (RT-PCR) usados para a detecção do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e da síndrome da mancha branca (WSSV) nos ambientes de cultivo SAV..... 99
- Tabela 3** – Sequências de primers de PCR convencional (*nested*) usados para a detecção do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) nos ambientes de cultivo em Bioflocos (BFT) e água Clara (AC)..... 100

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** – Árvore Neighbor-Joining baseada no método de distância Kimura 2 – parâmetros (KIMURA, 1980), incluindo sequências de 16S rRNA de maior similaridade de acordo com a classificação do banco de dados do RDP (Ribossomal Database Project) e GenBank. Números plotados nos ramos indicam os valores de bootstrap (1.000 repetições), apenas os valores maiores que 60 foram plotados. ♦ Sequências em estudo e/ou agrupadas com sequências do banco de dados. ◇ Sequências agrupadas no mesmo ramo: VIB02, VIB10 - 11, VIB14 – 15, PR01 – 08, LIP03 – 04, LIP07 – 09, CEL01, CEL03, AL09, AM03, AM07, BAC06, BAC09, BHC07 – 10, *V. corallilyticus* (AJ440005), *V. proteolyticus* ATCC 15338T (X74723), *V. azureus* strain NBRC 104587 (NR\_114268.1), *V. mytili* (X99761), *V. natriegens* (X74714), *V. nigripulchritudo* (X74717), *V. parahaemolyticus* clone Vp23 (AF388386), *Vibrio probioticus* (AJ345063), *Vibrio rumoiensis* (AB013297), *V. variabilis* (GU929924), *V. vulnificus* ATCC 27562 T (X76333). □ Sequências agrupadas no mesmo ramo: AL05, AL08, AM09, BHC05 – 06, *Staphylococcus warneri* (L37603), *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus (AB233326) ..... 106
- Anexo 2** – Identificação das sequências homólogas oriundas do SAV das regiões V6–V8 16S rRNA. Porcentagem (%) do total de sequências obtidas por grupo funcional de acordo com a ferramenta Ribosomal Database Project (RDP) *Classifier*; Identidade e S<sub>ab</sub> score (similaridade par a par) de acordo com a classificação procariótica do 16S BLAST e RDP *Seqmatch*, respectivamente..... 108
- Anexo 3** – Identificação de cepas isoladas da microbiota residente do cultivo em água clara. Porcentagem (%) de sequências descritas conforme análise do *Classifier*, Similaridade e S<sub>ab</sub> score (similaridade par a par) conforme a análise *Seqmatch* da base de dados do RDP (Ribosomal Database Project) e o número de acesso *Genbank*..... 110

<b>Anexo 4</b> – Identificação de cepas isoladas da microbiota cultivável do ambiente estuarino do rio Pacoti, Ceará. Porcentagem (%) de sequências descritas conforme análise do <i>Classifier</i> , Similaridade e S_ab score (similaridade par a par) conforme a análise <i>Seqmatch</i> da base de dados do RDP (Ribosomal Database Project) e o número de acesso <i>Genbank</i> .....	111
--	-----

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>2 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS</b> .....	20
2.1 Dados de produção por captura e cultivo de pescados .....	20
2.2 Camarões marinhos peneídeos na costa nordeste do Brasil .....	21
2.3 Anatomia externa e identificação morfológica de camarões peneídeos .....	22
2.4 Reprodução e ciclo de vida.....	23
2.5 <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931) .....	24
2.6 <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> (LATREILLE, 1817) .....	26
2.7 Sistema digestivo de camarões peneídeos .....	28
2.8 Aspectos gerais da microbiota no trato digestivo em camarões peneídeos.....	30
2.9 Sistemas de cultivo abordados neste estudo e adotados na carcinicultura .....	35
2.9.1 Sistema de cultivo autotrófico .....	35
2.9.2 Sistema de cultivo mixotrófico .....	35
3 Principais doenças virais em camarões marinhos no nordeste do Brasil.....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
<b>4 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS</b> .....	47
<b>6 RESULTADOS</b> .....	48
<b>CAP 1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA CULTIVÁVEL DO INTESTINO DO <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) MEDIANTE A DOENÇAS VIRAIS EM SISTEMAS DE CULTIVO DE ÁGUA VERDE</b> .....	48
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	49

2.1	Sistema de cultivo autotrófico - água verde (SAV) .....	49
2.2	Amostragem .....	50
3	RESULTADOS.....	50
4	DISCUSSÃO .....	55
5	CONCLUSÃO .....	57
	REFERÊNCIAS .....	58
<b>CAP 2 PERFIL MICROBIANO DA ÁGUA E DO INTESTINO DO CAMARÃO</b>		
<b>BRANCO DO PACÍFICO <i>Litopenaeus vannamei</i> INFECTADO POR WSSV</b>		
<b>CULTIVADO EM SISTEMAS INTENSIVOS DE</b>		
<b>PRODUÇÃO.....</b>		
		62
1	INTRODUÇÃO.....	62
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	63
2.1	Sistema de cultivo em Bioflocos (BFT).....	63
2.2	Sistema de cultivo em Água clara (AC) .....	63
2.3	Amostragem .....	63
3	RESULTADOS .....	64
4	DISCUSSÃO .....	69
5	CONCLUSÃO .....	72
	REFERÊNCIAS .....	73
<b>CAP 3 COMUNIDADE MICROBIANA CULTIVÁVEL INTESTINAL DO</b>		
<b>CAMARÃO NATIVO <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> (LATREILLE, 1817)</b>		
<b>NO ESTUÁRIO DO RIO PACOTI, CEARÁ .....</b>		
		78
1	INTRODUÇÃO.....	78
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	79
2.1	Obtenção dos animais .....	79
2.2	Amostragem .....	79
3	RESULTADOS .....	81
4	DISCUSSÃO .....	85
5	CONCLUSÃO .....	88
	REFERÊNCIAS .....	89
	<b>MATERIAIS E MÉTODOS GERAL.....</b>	<b>96</b>

• Insensibilização dos animais, separação da microbiota transitória e residente, coleta de água e amostragem para detecção viral.....	96
• Cultivo dos microrganismos.....	96
• Extração de DNA/RNA total e síntese de fita simples de cDNA.....	98
• qPCR .....	98
• Extração de DNA e PCR convencional ( <i>Nested-PCR</i> ) .....	99
• Extração do DNA genômico bacteriano .....	100
• Identificação das cepas bacterianas .....	100
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	105
<b>ANEXOS</b> .....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de crustáceos no Brasil é principalmente representada por camarões marinhos oriundos da pesca extrativa marinha e do cultivo. Grande parte da produção nacional de camarões marinhos selvagens em 2011 foi representada pelo camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e o camarão-rosa (*Farfantepenaeus notialis* e *Farfantepenaeus brasiliensis*) (BRASIL, 2011). Em relação a aquicultura, o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) representa a maior parte da produção mundial de crustáceos (FAO, 2018). No Brasil, a espécie domina a produção de crustáceos tendo a região nordeste como a mais produtiva do país com destaque para os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte (ABCC, 2016).

Os camarões marinhos têm sido amplamente estudados, principalmente para o setor de produção em cativeiro. Principalmente em pesquisas voltadas a problemas do setor produtivo. Um dos pontos alvo desse estudo encontra-se no ambiente circundante, pois este exerce uma grande influência na formação e desenvolvimento da microbiota intestinal de animais aquáticos, refletindo uma conexão entre a microbiota intestinal e o ambiente (HARRIS, 1993; BAUER *et al.*, 2006; TZUC *et al.*, 2014).

Microrganismos benéficos, comensais e patogênicos fazem parte da grande complexidade da microbiota intestinal (DILLON; DILON, 2004; STECHER; HARDT, 2011). Dentre eles, as bactérias estão entre os principais microrganismos descritos na associação entre invertebrados aquáticos e o intestino (TZUC *et al.*, 2014). No sistema gastrointestinal, bactérias possuem a capacidade de produzir diferentes tipos de enzimas extracelulares atuantes no processo digestivo, auxiliando na degradação dos componentes alimentares (SCHULZE *et al.*, 2006; TZUC *et al.*, 2014). Muitas destas enzimas também são associadas a fatores de virulência (QUESADA-HERRERA *et al.*, 2004). Os fungos também fazem parte da microbiota intestinal, no entanto muitas espécies são relatadas como parasitas em organismos aquáticos (OVERSTREET, 1973; RAMAIAH, 2006; DEWANGAN *et al.*, 2015).

Os vírus também estão presentes na microbiota intestinal, representando em sua maioria consideráveis perdas de produção industrial de camarão na região nordeste do Brasil provocadas por patógenos como o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e o mais recente vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (NUNES *et al.*, 2004; NUNES; FEIJÓ, 2016). Estudos anteriores revelaram que algumas doenças bacterianas e virais estão associadas ao desequilíbrio da microbiota intestinal em animais voltados para aquicultura (PHUOC *et al.*,

2009; WIDANARNI; YUHANA, 2014; LI *et al.*, 2016; RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016). Portanto, a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal é uma condição indispensável para a saúde do hospedeiro, sendo neste caso, ambos camarões selvagens e de cultivo (RUNGRASSAMEE *et al.*, 2014).

A microbiota intestinal contribui para a nutrição e saúde do hospedeiro. Isto porque o combate a colonização de patógenos oportunistas, a manutenção do sistema imune estão entre as principais funções fisiológicas exercidas pela microbiota intestinal para camarões cultivados e selvagens, proporcionando um maior crescimento e taxa de sobrevivência (LUIS-VILLASENOR *et al.*, 2013; TZENG, T. *et al.*, 2015; RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2016).

Nesta pesquisa, a microbiota intestinal de camarões *L. vannamei* e *F. brasiliensis* foi estudada em quatro tipos de ambientes. Sendo três pertencentes a sistemas de cultivo, com o camarão *Litopenaeus vannamei* e ao ambiente natural estuarino com o camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*. Para o isolamento e identificação de cepas bacterianas, processos microbiológicos e moleculares foram realizados para a caracterização de bactérias pertencentes a grupos funcionais específicos (*Bacillus* spp., Bactérias Heterotróficas Cultiváveis, conhecidas como BHC e *Vibrios* spp.) e produtoras de enzimas extracelulares (ácido-lácticas, amilases, proteases, lipases e celulasas).

O sistema de cultivo em água verde foi abordado no **capítulo 1**, no qual se refere a um tipo de ambiente fertilizado apenas com resíduos acumulados (ração e fezes) e atividade fotossintética comumente adotado em estruturas simples de cultivo. Nesse ambiente, as fontes de alimentos naturais disponíveis foram desenvolvidas naturalmente na água do cultivo ou obtidas através de trocas de água (FAÇANHA *et al.*, 2016).

No **capítulo 2** os sistemas de produção em bioflocos (BFT) e água clara (AC) são analisados em relação ao perfil microbiano intestinal e do ambiente. Considerando que o sistema BFT apresenta uma complexa interação entre matéria orgânica e microrganismos, o sistema de água clara possui baixa concentração de matéria orgânica e intensa filtragem externa (CRAB *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2010). Diante disso, além da caracterização microbiana foi verificado a mudança do perfil microbiano em intestinos de camarões submetidos a diferentes ambientes de cultivo.

A caracterização da microbiota intestinal da espécie *Farfantepenaeus brasiliensis* foi abordada no **capítulo 3**. As condições disponíveis dentro do ambiente natural podem levar

ao desenvolvimento de microrganismos estáveis na microbiota intestinal do hospedeiro e o conhecimento da comunidade microbiana nestes ambientes pode fornecer informações sobre o papel biológico destes microrganismos na natureza (VAN DER WAIJ, 1992; EMERENCIANO *et al.*, 2015).

## REFERÊNCIAS

- ABCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Um novo despertar da carcinicultura brasileira, mantedo os compromissos com a sustentabilidade ambiental, contribuição social e qualidade sensorial do camarão cultivado**. Natal: ABCC, p. 104, 2016.
- BRASIL. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília: República Federativa do Brasil.
- BAUER, E.; WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A. Influence of the Gastrointestinal Microbiota on Development of the Immune System in Young Animals Further Reading. **Curr. Issues Intestinal Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 35–51, 2006.
- CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**, v. 270, p. 1–14, 2007. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.006
- DEWANGAN, N. K.; GOPALAKRISHNAN, A.; KANNAN, D.; SHETTU, N.; SINGH, R. R. Black gill disease of pacific white leg shrimp. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 10, p. 761–765, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.12980/jclm.3.2015j5-70>>. Acesso em: 15 jan 2018.
- DILLON, R. J.; DILON, V. M. The Gut Bacteria of Insects : Nonpathogenic Interactions THE GUT BACTERIA OF INSECTS : Nonpathogenic Interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 71–92, 2004.
- EMERENCIANO, M.; MIRANDA-BAEZA, A.; MART, L. R.; MART, M. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. **Reviews in Aquaculture**, v. 7, p. 131–148, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/raq.12058>>. Acesso em: 15 jan 2018.
- FAÇANHA, F. N.; OLIVEIRA-NETO, A. R.; FIGUEIREDO-SILVA, C.; NUNES, A. J. P. Effect of shrimp stocking density and graded levels of dietary methionine over the growth performance of *Litopenaeus vannamei* reared in a green-water system. **Aquaculture**, v. 463, p. 16–21, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.024>>. Acessado em: 04 jan 2018.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Roma: FAO, p. 227, 2018.
- HARRIS, J. M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. **Microbial Ecology**, v. 25, n. 3, p. 195–231, 1993.
- LI, K.; LIU, L.; CLAUSEN, J. H.; LU, M.; DALSGAARD, A. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis* spp.) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. **Aquaculture**, v. 457, p. 91–99, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.008>>. Acesso em: 15 nov 2017.
- LUIS-VILLASENOR, I. E.; CASTELLANOS-CERVANTES, T.; GOMEZ-GIL, B.; *et al.* Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: Modulation

of the bacterial community. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 257–265, 2013. doi: 10.1007/s11274-012-1177-0

MARTINS, M.; EDING, H.; VERDEGEM, J.; *et al.* New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. **Aquacultural Engineering**, v. 43, n. 3, p. 83–93, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>> Acesso em: 15 out 2018.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37–57, 2004.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, n. 2, p. 30 - 36, 2016.

OVERSTREET, R. M. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. **Aquaculture**, v. 2, n. 2, p. 105–140, 1973.

PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C. *et al.* Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, n. 1–2, p. 61–68, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.004>>. Acessado em: 04 jan 2018.

QUESADA-HERRERA, A., POZO, M., ROSA-PLACENCIA, J., 2004. **Selección de probióticos bacterianos para su uso en el cultivo de camarón**. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Comunicación Técnica CIVA 2004, pp. 97–100. Disponível em: <<http://www.civa2004.org>>. Acesso em: 15 nov 2017.

RAMAIAH, N. A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 35, n. 4, p. 380–387, 2006.

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; CHAIYAPECHARA, S. Characterization of Intestinal Bacteria in Wild and Domesticated Adult Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91853, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091853>>. Acessado em: 16 jan 2018.

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; KAROONUTHAISIRI, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 12–19, 2016. doi: 10.1016/j.jip.2015.11.004

SCHULZE, A. D.; ALABI, A. O.; TATTERSALL-SHELDRAKE, A. R.; MILLER, K. M. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. **Aquaculture**, v. 256, p. 50–73, 2006. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.008

STECHER, B.; HARDT, W. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 82–91, 2011. doi: 10.1016/j.mib.2010.10.003

TZENG, T.; PAO, Y.; CHEN, P.; WENG, F. C. Effects of Host Phylogeny and Habitats on Gut Microbiomes of Oriental River Prawn (*Macrobrachium nipponense*). **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132860, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0132860

TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; ROJAS HERRERA, R.; GAXIOLA CORTÉS, G.; ORTIZ, M. L. A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, p. 280, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4062704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 out 2018.

VAN DER WAIJ, D. Mechanisms involved in the development of the intestinal microflora in relation to the host organism; consequences for colonization resistance. **In: \_\_\_\_\_**. **Molecular Biology of Bacterial Infection**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, p. 1-12.

WIDANARNI, A. O.; YUHANA, M. The Use of Synbiotics to Prevent IMNV and *Vibrio harveyi* Co-Infection in *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Biosciences**, v. 21, n. 3, p. 127–134, 2014. Institut Pertanian Bogor. Disponível em: <<http://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati>>. Acessado em: 04 jan 2018.

ZHENG, Y.; YU, M.; LIU, Y.; *et al.* Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. **Aquaculture**, v. 451, p. 163–169, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>>. Acessado em: 04 jan 2018.

## 2. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

### 2.1 Dados de produção por captura e cultivo de camarões

Desde meados da década de 1990, a produção de pescados de captura global tem estabilizado cerca de 90 milhões de toneladas, mais especificamente 92 milhões de toneladas em 2016, com a pesca marinha contribuindo cerca de 80,3 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2018). O destaque da pesca marinha, direciona para as principais espécies capturadas de peixes como o atum e os seus similares com quatro milhões de toneladas capturados em 2016, juntamente, com a captura de cartilagosos (tubarões, raias e quimeras) com dados ainda estáveis entre 700 a 800 milhões de toneladas desde 2005 e os cefalópodes com um excedente de seis milhões de toneladas (FAO, 2018). Em relação aos crustáceos, as capturas de camarão se mantiveram estáveis em aproximadamente seis milhões de toneladas desde 2012, contribuindo para o consumo humano (7,9 bilhões) (FAO, 2018).

O Brasil apresentou 705.000 toneladas em volume de produção de pescados oriundos da pesca extrativa marinha e continental (FAO, 2018). A produção nacional de pescados mostrou que a aquicultura continental representou a maior parte da produção com 507.500 toneladas, seguido pela pesca extrativa marinha com 480.000 toneladas, pesca extrativa continental 225.000 toneladas e a aquicultura marinha com 73.000 toneladas (FAO, 2018). Apesar da captura de 34.050 toneladas de camarões selvagens em 2016, o Brasil representou um volume de captura muito baixa em relação aos 35 maiores países produtores de camarões selvagens no mundo (FAO, 2018). No entanto, quase a metade da produção de crustáceos nacional é representada pela captura do camarão-sete-barbas e o camarão-rosa em 2011, seguida pela lagosta com 12% do total capturado (BRASIL, 2011).

De acordo com os dados de produção aquícola nacional fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) durante o período de 2015 a 2016, a região do Nordeste destaca-se com 27,24% da produção nacional, com os estados do Maranhão (24.588 toneladas) e Ceará (42.802 toneladas) os maiores produtores em 2016. A região norte foi a mais produtiva com 140.865 toneladas, seguida pela região sul com 125.453 toneladas (IBGE, 2016).

No tocante a aquicultura, o setor contribuiu significativamente para o aumento e consumo de espécies que já foram capturadas intensamente, tais como os camarões que representam um valor estimado de produção de 4.156 milhões de toneladas (US\$ 24,40 bilhões) em 2016 (FAO, 2018). A produção de espécies marinhas é dominada pelo camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) com 4.155 milhões de toneladas e o segundo mais produzido, o camarão tigre gigante (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798) fica a frente com 701,081 mil (12,3%) em 2016 (FAO, 2018).

Para o Brasil, o cultivo de crustáceos representou 52.200 toneladas em 2016 (FAO, 2018). De acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) do IBGE, o estado do Ceará teve uma estimativa de produção de 25.431 toneladas de camarões junto ao estado do Rio Grande do Norte com 14.656 toneladas (IBGE, 2016), sendo que ambos representam mais de 70% da produção nacional (ABCC, 2016).

## 2.2 Camarões marinhos peneídeos na costa nordeste do Brasil

A Subordem Dendrobranchiata é dividida em seis famílias: Penaeidae, Siccyoniidae, Solenoceridae, Aristeidae, Sergestidae e Luciferidae. A família Penaeidae abriga os camarões marinhos, nos quais são conhecidos por representarem o grupo de interesse comercial, pois cerca de dez espécies de camarões apresentam a capacidade de desenvolvimento em cativeiro, nos quais todos os camarões comerciais cultivados envolvem os peneídeos (GILLETT, 2008), tornando esta família entre as maiores em proporções de capturas de camarões no mundo (D'INCAO, 1999; FAO, 2012).

As principais espécies de camarões peneídeos marinhos de interesse econômico encontrados na costa atlântica brasileira estão agrupadas nos gêneros *Farfantepenaeus*, *Litopenaeus* e *Xiphonaeus*, considerando o primeiro gênero, as espécies *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967); *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817); *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) e *Farfantepenaeus notialis* (Perez-Farfante, 1969). O segundo gênero engloba a espécie *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936), monoespecífica do gênero *Litopenaeus* no Brasil, e por fim, a espécie *Xiphonaeus kroyeri* (Heller, 1862) (DIAS-NETO, 2011).

## 2.3 Anatomia externa e identificação morfológica de camarões peneídeos

Os gêneros encontrados no Brasil, *Litopenaeus* e *Farfantepenaeus* possuem estruturas específicas que permitem duas distinções. O gênero *Litopenaeus* possuem o téllico aberto e o sulco adostril curto, enquanto o gênero *Farfantepenaeus* possui o téllico fechado, sulco adostril prolongado, apresentando a mesma largura ao longo da extensão até atingir a porção posterior da carapaça e uma mancha vermelha entre o 3º e o 4º somito abdominal (PÉREZ-FANFANTE E KENSLEY, 1997; GUSMÃO *et al.* 2000).

Os peneídeos (Figura 1) estão classificados sistematicamente de acordo com o Catálogo Sistemático de Espécies da Organização das Nações Unidas para Alimentação e

Agricultura - FAO (HOLTHUIS, 1980):

Classe MALACOSTRACA Latreille, 1806

Subclasse EUMALACOSTRACA Grobben, 1892

Superordem EUCARIDA, Calman, 1904

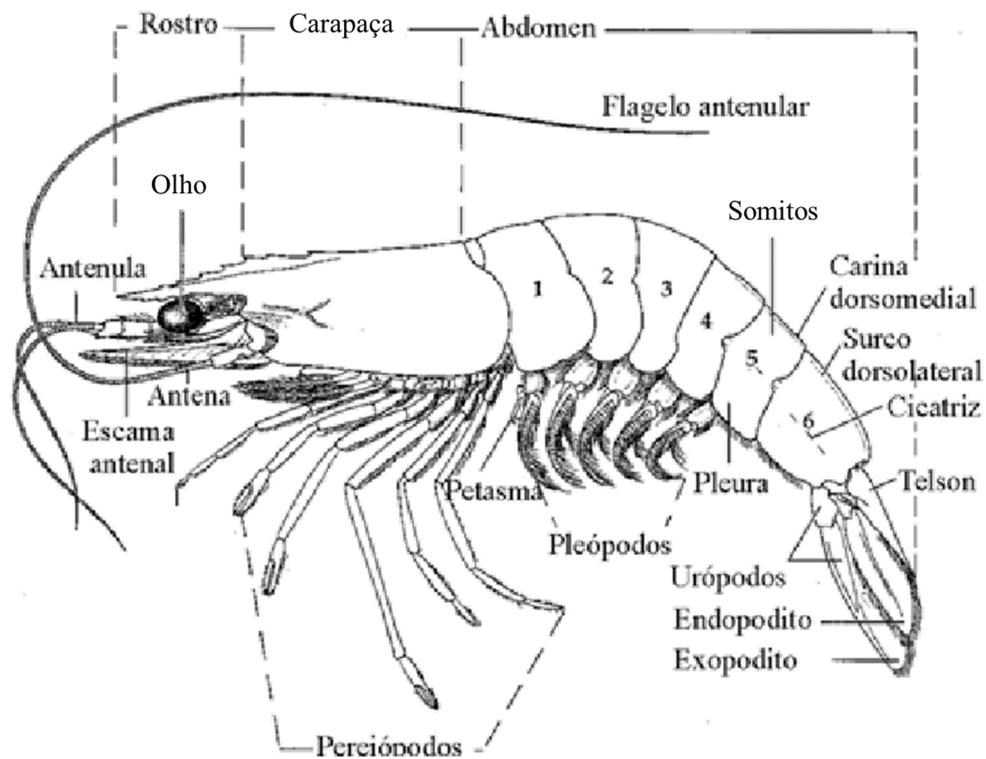
Ordem DECAPODA Latreille, 1903

Subordem DENDROBRANCHIATA Bate, 1888

Superfamília PENAEIOIDEA Rafinesque, 1815

Família PENAEIDAE Rafinesque, 1815

**Figura 1** – Anatomia externa do camarão peneídeo



Fonte: Adaptação de PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY (1997).

## 2.4 Reprodução e ciclo de vida

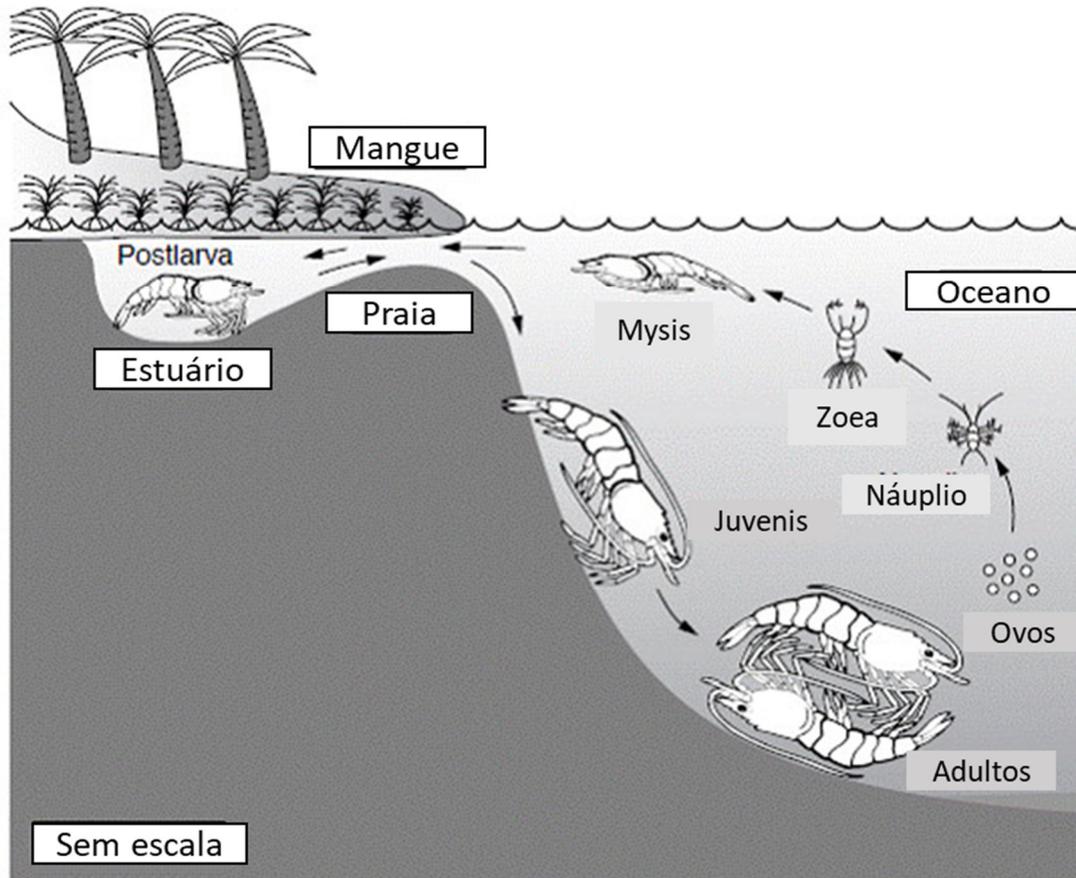
Nos camarões, para a realização da cópula o macho apresenta apêndices modificados para segurar a fêmea e o petasma, órgão copulador formado a partir de endopoditos do primeiro par de pleópodos, responsável pela implantação de espermátóforos no interior do órgão receptor feminino, o téllico, formado por duas expansões no último segmento torácico (RUPPERT; BARNES, 1996; DIAS-NETO, 2011).

A fecundação dos ovos é externa, sendo liberados para o ambiente e o seu tempo de incubação varia de acordo com o grupo de camarões estudado (RUPPERT; BARNES, 1996). A maturação e a desova de camarões peneídeos ocorrem em águas marinhas, observando-se nas fêmeas modificações macroscópicas do ovário, que se apresentam nos estágios iniciais, translúcidos com diâmetro inferior ao intestino; passando por estágios posteriores quando se apresentam fortemente pigmentados evoluindo para ocupar toda a porção dorsal do corpo (D'INCAO, 1999).

Os peneídeos apresentam um ciclo de vida divididos em dois ciclos migratórios, um que ocorre em mar aberto, onde as fêmeas amadurecem e desovam no oceano (Figura 2). Os ovos são bentônicos, as larvas são planctônicas e desenvolvem-se na coluna d'água passando por estágios larvais até a fase de pós-larva. A partir desta fase, as pós-larvas estão aptas para habitar o estuário, tornando-se bentônicas, alcançando rápido crescimento em águas rasas, com temperaturas elevadas e abundante alimentação. O segundo movimento ocorre quando os camarões atingem a fase de juvenis a pré-adultos, migrando das áreas estuarinas para as áreas de reprodução no oceano, reiniciando o ciclo reprodutivo (RUPPERT; BARNES, 1996; D'INCAO, 1999; DIAS-NETO, 2011).

As principais espécies alvo deste estudo foram *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus brasiliensis*, as quais são apresentadas a seguir.

**Figura 2** – Ciclo migratório dos camarões peneídeos.



Fonte: Rosenberry (2009)

### 2.5 *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

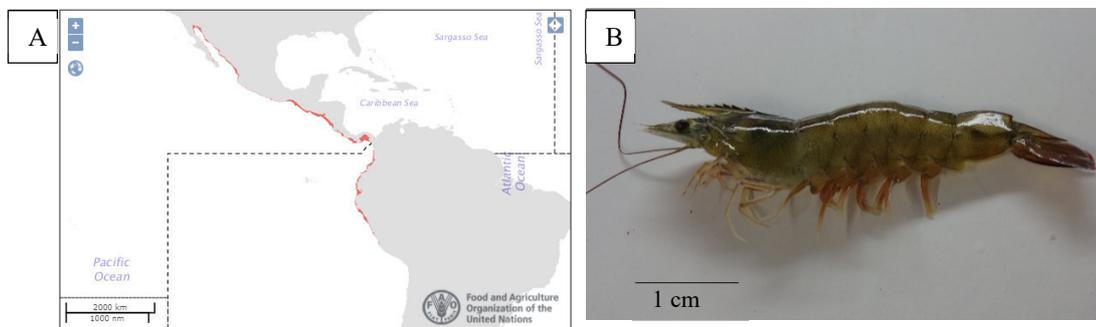
O organismo pertencente a ordem Decapoda (LATREILLE, 1802) (Figura 3B) é restrito ao oceano Pacífico e sua distribuição natural ocorre do México (Província de Sonora) até o Peru (Sul de Tumbes) (Figura 3A) em regiões onde apresentam uma temperatura acima de 20°C ao longo do ano (BENZIE, 2000). A espécie *L. vannamei* apresenta uma descrição estrutural na qual evidenciamos o rostrum com 1 ou 2 dentes ventrais, carapaça com espinhos hepáticos e antenais pronunciados, ausência do espinho orbital, carena adrostral curtos e téllico aberto (Figura 3C) (PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997).

Conhecido como camarão branco do Pacífico, o *Litopenaeus vannamei* é uma espécie que vive em habitats marinhos tropicais. Este crustáceo pode ser encontrado em fundos lamosos, desde regiões do infralitoral até 72 m de profundidade e o máximo comprimento de 230 mm em ambiente natural (FAO, 2006).

No litoral brasileiro, o *L. vannamei* é considerada exótico e foi introduzido na década de 80 no estado do Rio Grande do Norte, mas só na década de 90 a atividade da carcinicultura ganhou força de produção quando foram dominadas as técnicas de reprodução, larvicultura e engorda desta espécie (GESTEIRA; PAIVA, 2003). A decisão de importar pós-larvas de *L. vannamei* veio do êxito de produção mostrado pelo Equador e Panamá e a sua capacidade de adaptação em diferentes ambientes de cultivo da região ocidental, assim como seu elevado grau de rusticidade e rápido crescimento em todas as fases de desenvolvimento, alcançando níveis de produção muito superior às diversas tentativas produção de espécies nativas no Brasil (BRASIL, 2001).

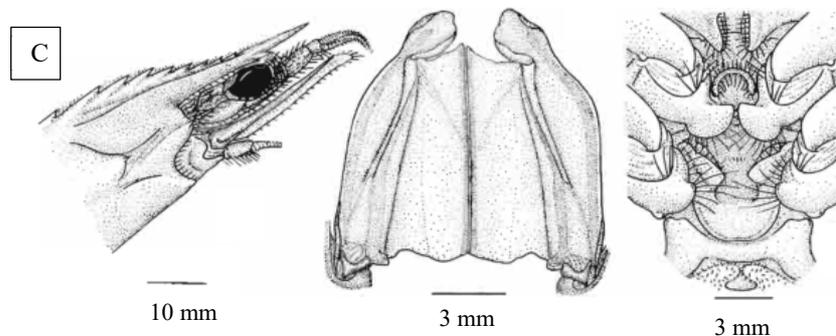
Ao longo do tempo, mesmo com a grande aceitação do mercado internacional ao camarão marinho cultivado no Brasil. O cultivo de camarões passou por algumas intempéries, atualmente já superadas, como a ação antidumping dos EUA, valorização da moeda nacional e ao surto patológico de mancha branca em Santa Catarina (SUSSEL *et al.*, 2010).

**Figura 3** – A: Mapa de distribuição do camarão *L. vannamei* (em vermelho), B: Foto representativa do *L. vannamei*, C: Desenho ilustrativo da visão lateral da carapaça, visão dorsal do petasma e do télico, respectivamente.



Fonte: FAO (2006)

Fonte: Autor (2016)



Fonte: Pérez-Farfante (1988)

## 2.6 *Farfantepeneus brasiliensis* (LATREILLE, 1817)

A espécie *Farfantepeneus brasiliensis* também é pertencente a ordem do decápodes conhecida como camarão rosa no Brasil, apresenta ampla distribuição, desde a Carolina do Norte nos EUA até o Rio Grande do Sul no Brasil (Figura 4A) (PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997). Registros de dados pesqueiros nacionais foram encontrados em todos os estados costeiros, do Amapá ao Rio Grande do Sul (DIAS-NETO, 2011). Além disso, o organismo representa importância comercial para a pesca artesanal e industrial, tornando-se uma das principais espécies de camarão capturadas na costa brasileira e mexicana (D'INCAO *et al.* 2002; PÉREZ-CASTAÑEDA; DEFEO, 2005).

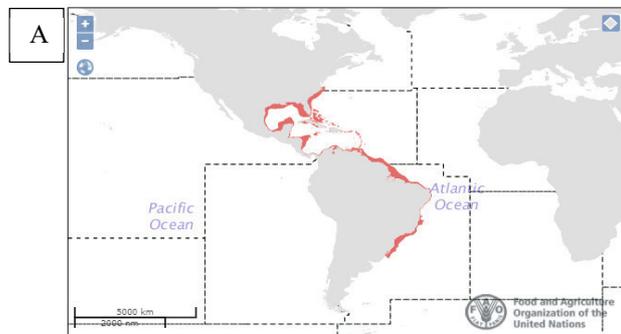
Na região sudeste do Brasil ocorre uma distribuição sazonal do gênero *Farfantepeneus* entre os meses de janeiro a maio, período que compreende a migração de camarões do estuário para baía (DA COSTA *et al.*, 2016). Registros de captura mostram que a espécie *F. brasiliensis* pode ser capturada em ambientes marinhos mais salinos variando de 15 – 30 ppm (BRANCO; VERANI, 1998).

As espécies que compõem o gênero *Farfantepeneus* se estratificam em relação ao tipo de fundo. Os camarões menores ocorrem principalmente em fundos arenosos. Os camarões adultos em sua maioria são capturados em fundos de lama ou de lama e areia. Em relação a profundidade, podem ser encontrados em plataformas costeiras de até 65 m (ZENKER; AGNES, 1977; DIAS-NETO, 2011).

A espécie apresenta evidentes características morfológicas, como os sulcos adrostrais e carena longos, estendendo-se quase à margem posterior da carapaça. Cor rosa ou vermelho amarronzado. Geralmente com uma mancha escuro intenso marrom ou vermelho acastanhado lateral na junção do terceiro e quarto segmento abdominal (Figuras 4B, C, D) (PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997).

Na perspectiva de implementar a carcinicultura no Nordeste do Brasil, várias tentativas de domesticação foram utilizadas em espécies nativas, dentre elas a espécie *F. subtilis* apresentou o melhor desenvolvimento, porém os requerimentos nutricionais para a fase de crescimento deixou a desejar (GESTEIRA; PAIVA, 2003). No entanto, algumas pesquisas retomaram esta iniciativa e mostram que também a espécie *F. brasiliensis* apresenta um forte potencial para ser cultivado, principalmente em condições semi-intensivas, como uma forma alternativa mais acessível de produção (LOPES *et al.*, 2009).

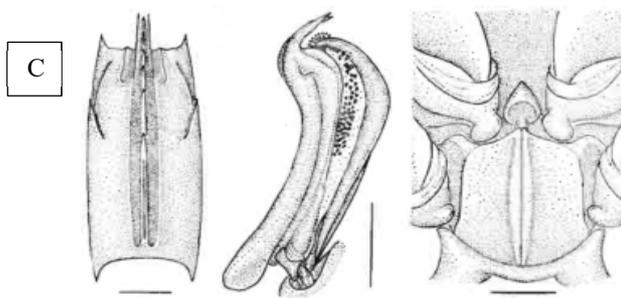
**Figura 4** – A: Mapa de distribuição do camarão *F. brasiliensis* (em vermelho), B: Foto representativa do *Farfantepenaeus brasiliensis*, C: Desenho ilustrativo do sulco adostral, petasma e tólico, respectivamente, D: Foto representativa do sulco adostral em lupa.



Fonte: FAO (2006)



Fonte: Autor (2017)



Fonte: Pérez-Farfante (1988)



Fonte: Autor (2017)

## 2.7 Sistema digestivo de camarões peneídeos

A morfologia do trato digestivo de camarões peneídeos é típica dos decápodes (DALL *et al.*, 1990; MUHAMMAD *et al.*, 2012). A divisão do sistema digestivo é dividida em três porções: anterior, chamada de *foregut*, a média, *midgut* e a final, *hindgut* (Figura 5). A seguir, um quadro geral sobre as estruturas do sistema digestivo de peneídeos está fundamentado no estudo realizado por DALL *et al.* (1990).

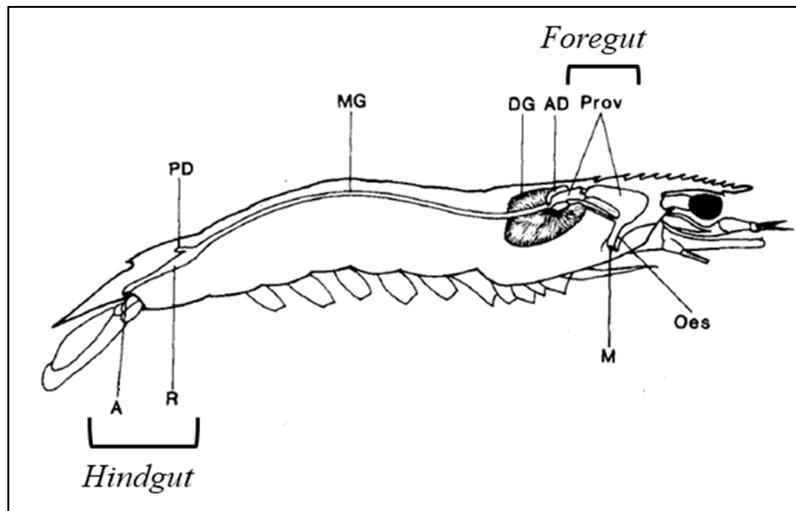
A porção designada a anterior, consiste na estrutura conhecida como *proventriculus*, região inicial do sistema digestivo a qual inclui o esôfago, estômago e estruturas associadas (câmara cardíaca e pilórica). A câmara cardíaca, localizada na região anterior do *proventriculus* é distensível, armazenando alimento e levando a uma fila de pequenos dentes e a um dente mediano dorsal único. A câmara pilórica, na região posterior do *proventriculus* sendo mais estreita, atuando sobre esta região a glândula digestiva (hepatopâncreas), para logo em seguida

ser direcionado a *midgut*.

O intestino médio, apresenta funções principais de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes, como papel funcional principal do hepatopâncreas. Esta glândula digestiva apresenta dois lobos compactos e multitubular, no qual cada túbulo exibe quatro tipos de células: E, R, F e B em ordem de diferenciação do lúmen a região basal, respectivamente. As células E são embrionárias indiferenciadas e as células R, F e B fazem parte da produção e absorção de enzimas e outros elementos digestivos que são liberadas no intestino. Toda a porção restante do intestino médio é um tubo reto, iniciando no final do cefalotórax, através do abdômen, terminando no reto. O tubo é acompanhado por um epitélio simples e uma membrana peritrófica é secretada da porção anterior (Figura 6).

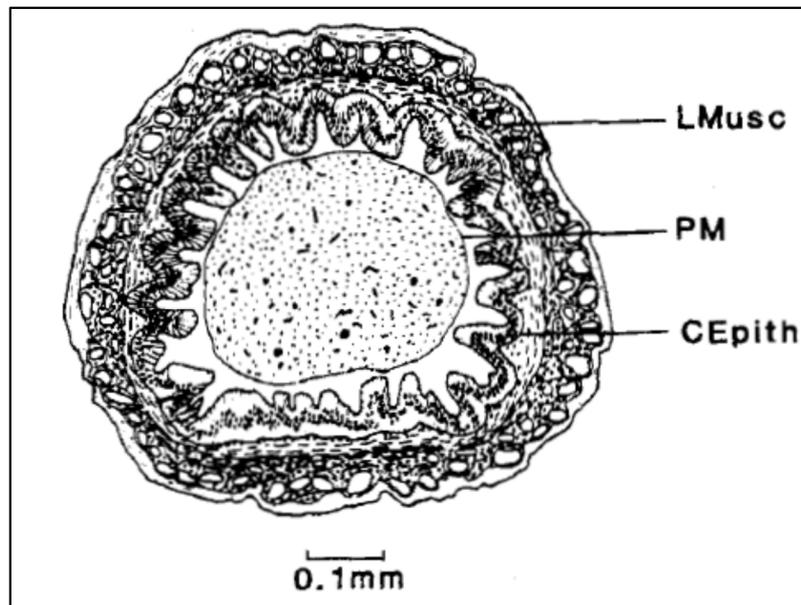
A porção final do intestino, apresenta o reto em uma região muscular curta revestida por alças cuja função é armazenar as fezes na membrana peritrófica, para em seguida expelir a massa fecal (Figura 7).

**Figura 5** – O sistema digestivo. *Foregut*: Prov, proventriculus; Oes, esôfago; M, boca. *Midgut* (MG): AD, diverticulum anterior; DG: glândula digestiva. *Hindgut*: PD, diverticulum posterior; R, reto; A, ânus.



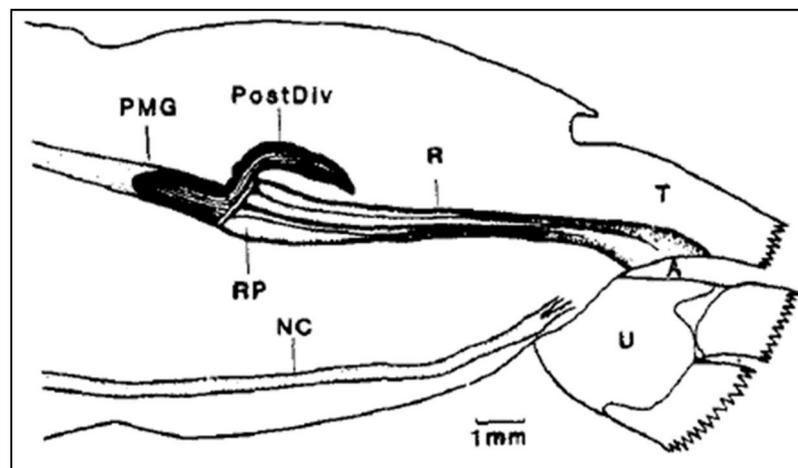
Fonte: Adaptação de Dall *et al.* (1990).

**Figura 6** – Secção transversal através da região tubular do intestino médio. LMusc, músculo longitudinal; PM, membrana peritrófica; CEpith, epitélio colunar.



Fonte: Dall *et al.* (1990).

**Figura 7** – Porção final do intestino, *hindgut* PMG, posterior a *midgut*; PostDiv, diverticulum posterior; R, reto; T, telson; U, urópodes.



Fonte: Dall *et al.* (1990).

## 2.8 Aspectos gerais da microbiota no trato digestivo em camarões peneídeos

De acordo com Fraune e Bosch (2010), a constante interação entre o hospedeiro animal e sua microbiota mostra evidências que evoluíram de maneira simbiótica e homeostática.

A colonização inicial de microrganismos no trato digestivo é estabelecida

gradualmente desde o nascimento do hospedeiro vertebrado e invertebrado (HARRIS, 1993; BAUER *et al.*, 2006; TZUC *et al.*, 2014). Diferente de animais terrestres amnióticos, o desenvolvimento ontogenético precoce dos estágios larvais de animais aquáticos ocorre na água do ambiente, juntamente ao seu trato digestivo que ainda não está completamente desenvolvido e o sistema imunológico incompleto (GATESOUBE, 1999).

A função primária dos microrganismos no trato intestinal é a digestão de substratos de alimentos ingeridos. Entre as relações simbióticas entre a comunidade microbiana e o hospedeiro, a principal se mostra como a nutrição. Condições ideais de nutrição são proporcionadas através do desenvolvimento de microrganismos no ambiente intestinal e homeostático, o hospedeiro se beneficia da digestão de alimentos ingeridos e absorção de nutrientes essenciais mediada pelos microrganismos do trato digestivo (HARRIS, 1993; KAU *et al.*, 2012). Entre os invertebrados aquáticos, uma diferença extrema pode ser encontrada entre os animais de água doce e marinho. Condições salinas no ambiente externo podem apresentar meios semelhantes de habitat em comparação ao trato intestinal de animais marinhos (HARRIS, 1993).

Além da digestão, a microbiota do trato intestinal realiza outras funções fisiológicas que contribuem para o estado geral de saúde do hospedeiro, dentre elas destacamos a estimulação do sistema imune, resistência a doenças, produção de células epiteliais, armazenamento de energia e o desenvolvimento intestinal em mamíferos (KAU *et al.*, 2012), peixes (NAYAK, 2010; GIATSISS *et al.*, 2015), ostras (KING *et al.*, 2012) e camarões marinhos cultivados e selvagens (LUIS-VILLASENOR *et al.*, 2013; WANG, C. *et al.*, 2014; TZENG, T. *et al.*, 2015; RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2016).

A microbiota intestinal pode ser classificada como residente e transitória. O fluxo de água e a ingestão de alimentos fazem com que a microbiota transitória, sobreviva a passagem do intestino, onde algumas proliferam no local e outras são eliminadas com as fezes. Já a microbiota residente apresenta comparativamente uma dinâmica mais estável no intestino (HARRIS, 1993; BALCÁZAR *et al.*, 2006).

Dentro da grande diversidade e complexidade da microbiota do trato digestivo são encontrados microrganismos benéficos, comensais e patogênicos (DILLON; DILON, 2004; STECHER; HARDT, 2011). Em organismos aquáticos em geral, a microbiota intestinal apresenta uma maior dominância de bactérias anaeróbias facultativas (GATESOUBE, 1999; KING *et al.*, 2012; TZUC *et al.*, 2014).

No ambiente aquático, as bactérias estão entre os principais microrganismos descritos na associação entre invertebrados aquáticos e o intestino. Por isso, uma microbiota

em equilíbrio pode trazer bactérias benéficas e neutras, assim como as patogênicas e obrigatórias para o animal (SCHULZE *et al.*, 2006). Estes microrganismos entram no trato digestivo através da água e do alimento que se mostram em grande abundância populacional bacteriana (GATESOUBE, 1999; KAR; GHOSH, 2008; TZUC *et al.*, 2014).

Este efeito benéfico pode ser reforçado para o hospedeiro como uma forma de suplementação de microrganismos vivos, principalmente bactérias, que são administrados para o trato gastrointestinal em níveis adequados com o objetivo de melhorar a saúde do hospedeiro aquático, sendo este processo denominado de probióticos (GATESOUBE, 1999; MOHAPATRA *et al.*, 2013). Os probióticos têm se apresentado como uma alternativa livre de antibióticos e antimicrobianos no combate de doenças e estimulação do sistema imune em organismos aquáticos cultivados (GATESOUBE, 1999; BALCÁZAR *et al.*, 2006; NAYAK, 2010; ZHENG *et al.*, 2016; HOSTINS *et al.*, 2017).

No caso dos camarões peneídeos, como exemplo o *Litopenaeus vannamei*, a colonização inicial de microbiota no trato digestivo ocorre durante a fase naupliana no estágio 5. Nesta fase se desenvolve o ânus, a primeira abertura para o contato com o ambiente. Logo em seguida, ocorre o desenvolvimento da boca, assumindo a continuidade ao processo de colonização pela rota oral (SIMÕES *et al.*, 2002). Diante deste fato, assim como os peixes e a maioria dos animais aquáticos, a microbiota de camarões peneídeos pode ser determinada e influenciada pelo contato com o ambiente (WU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; CARDONA *et al.*, 2016).

Além dos fatores ambientais, vários outros fatores podem afetar a comunidade bacteriana em camarões peneídeos. A comunidade bacteriana intestinal apresenta uma capacidade de dinamismo altamente presente durante as fases de crescimento de camarões peneídeos, principalmente para o *Litopenaeus vannamei* e para o *Penaeus penicillatus*, nos quais o próprio ambiente intestinal exerce uma função de seleção de mudança na microbiota intestinal (HUANG *et al.*, 2014; WANG, C. *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2016). Diferentes composições de dietas também podem afetar a comunidade microbiana intestinal. Como exemplo, a maior utilização de lipídios em rações, podem ser um meio de entrega de componentes nutricionais essenciais para o desenvolvimento do organismo, nesse caso os lipídios representam a principal fonte de energia para estruturação celular (TZUC *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014).

A administração de algumas bactérias com potencial singular modula a microbiota intestinal de camarões com o objetivo de aumentar a resistência a doenças, promovendo um maior crescimento e saúde em camarões de maior importância econômica nos respectivos

ambientes de cultivo e naturais (GÓMEZ *et al.*, 2008; LUIS-VILLASENOR *et al.*, 2013; NAVINCHANDRAN *et al.*, 2014; HOSTINS *et al.*, 2017). O histórico genético do hospedeiro influencia a comunidade bacteriana intestinal conforme a espécie do hospedeiro, como já foi relatada para peixes (LI *et al.*, 2012; SULLAM *et al.*, 2012) e camarões, mais precisamente a espécie *Macrobrachium nipponense* (TZENG *et al.*, 2015) apresentando uma relação espécie-específica. Como também, patógenos oportunistas podem competir por nutrientes e locais de adesão, alterando a microbiota e tornando camarões peneídeos susceptíveis a invasão destes patógenos (STECHEER; HARDT, 2011; RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016).

Muitas bactérias intestinais possuem a capacidade de produção de enzimas digestivas e a presença destes micróbios com as suas respectivas enzimas exógenas estimulam a produção de enzimas endógenas no trato digestivo em crustáceos (ZHOU *et al.*, 2009; LUIS-VILLASENOR *et al.*, 2013). Neste ambiente digestivo, fatores como a composição alimentar podem afetar a atividade enzimática. Camarões da família Penaeidae são onívoros, sendo que algumas espécies possuem tendências mais carnívoras ou herbívoras, levando a uma grande capacidade de produção enzimática em várias fontes de energia na dieta destes animais (CUZON *et al.*, 2004; TZUC *et al.*, 2014).

A produção de enzimas extracelulares como as proteases e as lipases são associadas a nutrição do hospedeiro (GÓMEZ; BALCÁZAR, 2008; LEYVA-MADRIGAL *et al.*, 2011). No entanto, a atuação destas enzimas também de maneira singular são consideradas fatores de virulência por alguns autores, uma vez que as cepas patogênicas possuem alta atividade proteolítica, lipolítica e hemolítica (QUESADA-HERRERA *et al.*, 2004). Junto com as lipases, as amilases são consideradas como uma das principais enzimas que degradam carboidrato e gordura (MOHAPATRA *et al.*, 2013). As celulasas apresentam uma função biológica muito importante na digestão alimentar. Estas enzimas podem ajudar a retratar a mudança do hábito alimentar durante os estágios de desenvolvimento de camarões (TZENG, T. *et al.*, 2015).

Além da produção de enzimas, a presença das próprias bactérias podem conferir características específicas dentro do ambiente intestinal de camarões marinhos. Os vibrios são bactérias Gram-negativas ligeiramente curvadas (rod-shaped) que estão presentes em ambientes marinhos e estuarinos, onde animais associados a este ambiente também apresentam estas bactérias (BØGWALD; DALMO, 2014). No caso dos camarões, este microrganismo pode causar grandes problemas de doenças (MOSS *et al.*, 2012; BØGWALD; DALMO, 2014). Como também, algumas espécies deste gênero podem apresentar potencialidade para probióticos (SCHULZE *et al.*, 2006; BALCÁZAR *et al.*, 2007). Bactérias pertencentes ao grupo das ácido lácticas e ao gênero *Bacillus* são bastante utilizadas como potenciais

probióticos ao setor da aquicultura (GATESOUBE, 1999; FAR *et al.*, 2009; KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; SHA *et al.*, 2016; HOSTINS *et al.*, 2017). Os bacilos possuem a capacidade de formar esporos termo estáveis que fornecem proteção contra vários fatores ambientais, como também, a produção de compostos de grande importância como antibióticos, enzimas, aminoácidos e vitaminas (LUIS-VILLASENOR *et al.*, 2013; SOROKULOVA, 2013). As bactérias ácido lácticas possuem como principal característica a baixa ou nenhuma virulência, produção de substâncias que inibem o crescimento de patógenos oportunistas, tais como bacteriocinas, ácido acético e ácido láctico (MAEDA *et al.*, 2013; SHA *et al.*, 2016).

No geral, estes microrganismos produzem substâncias antimicrobianas, competem por locais de adesão na parede intestinal com agentes patogênicos, estimulam uma maior produção de enzimas digestivas e o sistema imune, proporcionando ao camarão um maior crescimento e taxa de sobrevivência (FAR *et al.*, 2009; KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; SHA *et al.*, 2016; HOSTINS *et al.*, 2017).

As bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) possuem um papel biológico funcional de grande importância na regulação da taxa de carbono e nitrogênio no ambiente. As BHC apresentam uma capacidade de produzir proteína de carbono orgânico e nitrogênio inorgânico, reduzindo a nitrato. Portanto, estas bactérias são as principais escolhidas no controle de amônia em ambientes de cultivo (AVNIMELECH, 1999, 2003).

Dentre os demais microrganismos encontrados no intestino, os fungos são capazes de habitar diversos ambientes, inclusive o ambiente marinho. Os fungos são heterotróficos e quimio-organotróficos, possuindo exigências nutricionais simples (MADINGAN *et al.*, 2010). Estes organismos captam seus nutrientes através da produção de enzimas extracelulares de células vivas que invadem, levando este processo a um quadro de infecção (BUGNI; IRELAND, 2004; MADINGAN *et al.*, 2010). Muitas espécies de fungos são consideradas parasitas em organismos aquáticos, principalmente em camarões cultivados (OVERSTREET, 1973). Pesquisas anteriores relatam a presença de fungos no ambiente de cultivo e na natureza, associado a grandes mortalidades nas fases de estágios larvais de camarões, como também em sua fase adulta atingindo partes de corpo, como as brânquias (OVERSTREET, 1973; RAMAIAH, 2006; GATESOUBE, 2007; ROBERTA *et al.*, 2011; DEWANGAN *et al.*, 2015).

A presença de fungos no intestino foram relatadas em muitas espécies de peixes (GATESOUBE, 2007), como também em muitos crustáceos, no caranguejo *Uca pugilator* (HARRIS, 1993), em camarões *Nihonotrypaea harmandi* (camarão fantasma) na porção inicial do intestino (KIMURA *et al.*, 2002) e em camarões peneídeos, como o *Litopenaeus vannamei* (OCHOA *et al.*, 2015). Apesar do relato limitado de fungos patogênicos em organismos

marinhos (RAMAIAH, 2006), a presença destes microrganismos na aquicultura é preocupante, pois são considerados patógenos oportunistas e geralmente afetam animais menos resistentes em sistemas de cultivo (OCHOA *et al.*, 2015).

## **2.9 Sistemas de cultivo abordados neste estudo e adotados na carcinicultura**

### **2.9.1 Sistema de cultivo autotrófico**

Este tipo de cultivo apresenta biomassa de algas, matéria orgânica suspensa e plânctons que estão em constante circulação, criando um meio adequado para a proliferação de bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter* spp.), desencadeando todo o processo de remoção de nitrogênio altamente tóxico, o nitrito ( $\text{NO}^{-2}$ ), para formas menos tóxicas, mas ainda consideradas preocupantes quando acumuladas em sistemas fechados, o nitrato ( $\text{NO}^{-3}$ ). Além de proporcionar o crescimento de bactérias heterotróficas, pelo incremento da relação carbono e nitrogênio (THURSTON *et al.*, 1978; MARTIN *et al.*, 2000). Todo este processo também pode ser encontrado no ambiente de cultivo em água verde, no qual pode ser alcançado através da fertilização da água apenas dos resíduos acumulados (ração e fezes), agindo como fertilizantes naturais. Neste tipo de ambiente, as fontes de alimentos naturais disponíveis foram desenvolvidas naturalmente na água do cultivo ou obtidas através de trocas de água (FAÇANHA *et al.*, 2016).

Sob parâmetros de cultivo adequados, baixas densidades e constantes trocas de água para a retirada de excesso de ração e biomassa algal, este sistema fornece uma qualidade de água apropriada para o organismo aquático cultivado (GROSS *et al.*, 2003). Como também, em taxas controladas de C:N, este sistema pode fornecer uma fonte nutricional ao pescado advindo do crescimento bacteriano no ambiente de cultivo, alimentando peixes, camarões e mariscos em uma abordagem no setor mais difundido e natural da aquicultura (MARTIN *et al.*, 2000).

### **2.9.2 Sistema de cultivo Mixotrófico**

Diante da necessidade de reduzir os efluentes oriundos da carcinicultura no ambiente natural, o cultivo de camarões em sistema de bioflocos ou, do inglês, *Biofloc Technology* (BFT), mostra-se como uma alternativa de cultivo diante da possibilidade de utilização de menores volumes de água durante o cultivo, aumentando a biosegurança dos cultivos (AZIM; LITTLE, 2008). Esta tecnologia tem sido empregada no setor da carcinicultura em diversas partes do mundo, principalmente para o *Litopenaeus vannamei*.

O sistema mixotrófico BFT é caracterizado por flocos microbianos heterogêneos

constituído de diatomáceas, macroalgas, alimentos, resíduos fecais, exoesqueletos, bactérias e entre outros microrganismos invertebrados (JATOBÁ *et al.*, 2014). Este floco microbiano é um sistema formado por fitoplânctons, bactérias heterotróficas e quimiotróficas, sendo formado na coluna d'água mediante a adição de fontes de carboidrato. Junto ao equilíbrio das taxas de C:N, as bactérias heterotróficas se desenvolvem incorporando amônia e os seus compostos nitrogenados orgânicos, trazendo benefícios de qualidade da água ao ambiente de cultivo (AVNIMELECH, 1999). Além de servir como uma fonte de alimentação, pois são passíveis de serem consumidos por camarões (SCHNEIDER *et al.*, 2004; AZIM; LITTLE, 2008; KHATOON *et al.*, 2016).

Sabendo-se que os camarões podem ingerir bactérias presentes nos flocos, a comunidade bacteriana aquática pode exercer uma forte influência sobre a comunidade bacteriana do trato digestivo de animais aquáticos cultivados, podendo alterar as propriedades relacionadas à nutrição, imunidade e resistência a doenças (GATESOUBE, 1999; ZHANG *et al.*, 2014). Estudos recentes com a manipulação da microbiota de camarões mostram resultados de diminuição de fatores de virulência em cultivos de camarões perante a inclusão de determinadas bactérias em ambientes de bioflocos (ZHAO *et al.*, 2012; HOSTINS *et al.*, 2017).

No entanto, existem algumas limitações na caracterização da comunidade bacteriana do biofloco tanto para a qualidade da água quanto para a saúde do camarão, tornando esta dificuldade um dos principais objetivos de pesquisas para se desenvolver métodos que estabeleçam a diversidade e a estabilidade das comunidades microbianas (CARDONA *et al.*, 2016).

### **3. Principais doenças virais em camarões marinhos no nordeste do Brasil**

As enfermidades infecciosas são de grande importância para a carcinicultura, pois podem provocar grandes mortalidades e podem ser de origem viral, bacteriana, fúngica e parasitária (LIGHTNER; REDMAN, 1998; LIGHTNER, 2011).

Os patógenos virais são considerados um dos principais fatores de risco na aquicultura e são responsáveis por grandes perdas na produção de camarões (LIGHTNER, 2005). Aplicações de estratégias tradicionais, como administração de antibióticos e vacinas não são efetivas para controlar a disseminação do vírus, pois o organismo não possui um sistema imune adaptativo (XU *et al.*, 2014). A ocorrência de enfermidades virais também já foi relatada em crustáceos silvestres (LO *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 2012; MACÍAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

Devido a sua importância econômica para a carcinicultura, sete das nove doenças

dos crustáceos listadas pela Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (Office International de Epizooties) são doenças de vírus do camarão (LIGHTNER, 2011). Entre os principais vírus de notificação obrigatória pela OIE (2015), o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e o vírus da síndrome mancha branca (WSSV) destacam-se por trazer grandes perdas nos cultivos da região Nordeste (LIGHTNER, 2003; NEGREIROS; SANTOS, 2015).

Camarões afetados pelo IMNV apresentam opacidade muscular em torno do segundo e terceiro segmento seguindo até a região do telson, com necrose muscular coagulante associada a sinais grosseiros de clareamento muscular e regiões avermelhadas em alguns camarões individuais (NUNES *et al.*, 2004; LIGHTNER, 2011; THITAMADEE *et al.*, 2016). A doença foi primeiramente relatada em cultivo de *Litopenaeus vannamei* no nordeste do Brasil, no estado do Piauí em 2002, sendo observados relatos ao longo da costa no estado do Ceará e nos demais estados, associando os surtos às condições ambientais que possam oferecer fatores estressantes (extremos de salinidade e temperatura com uma dieta de baixa qualidade) (LIGHTNER, 2011). A disseminação deste vírus na região foi responsável por grandes perdas econômicas dentro do período de 2004 a 2006, chegando a valores de 440 milhões de dólares com o surto de 2005 (ROCHA, 2007; ANDRADE; 2007).

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) é responsável por manifestar a doença com a sintomatologia de letargia com redução de consumo alimentar, possui uma cutícula solta com alguns pontos brancos (0,5 – 2,0 mm) evidentes na superfície interior da carapaça, caracterizando a denominação da doença. A mancha branca indica depósitos anormais de sais de cálcio na cutícula de camarões infectados pelo vírus (FLEGEL, 2006; LIGHTNER, 2011). Esse sinal clínico pode ser confundido com outras manifestações as quais não são associadas a doença, como a alcalinidade elevada e a síndrome bacteriana da mancha branca, que produz sinais similares na cutícula (FLEGEL, 2006).

Alguns casos a coloração avermelhada podem ser visíveis devido à expansão cuticular dos cromatóforos. Camarões que apresentam estes sinais podem exibir elevadas mortalidades, alcançando até 100% da população dentro de um período de 3 a 10 dias desde o início da manifestação dos sintomas (LIGHTNER, 2011). No Brasil, o vírus foi encontrado inicialmente no estado de Santa Catarina em 2004, levando a uma grande perda de produção no período de apenas 2 anos (NUNES; FEIJÓ, 2016). No final do ano de 2016, a doença se manifestou em grandes fazendas de cultivo em Aracati, estado do Ceará, afetando a produção de todos os polos produtores de camarão do estado, com exceção as regiões mais interioranas (NUNES; FEIJÓ, 2016).

Camarões possuem uma capacidade de eliminar bactérias através de ações

fagocitárias na hemolinfa. Um dos indícios que direciona se o vírus é a causa primária ou secundária é a perda desta capacidade fagocitária quando estes animais estão infectados por vírus. Camarões infectados com apenas o vírus WSSV podem ter sido a causa primária de susceptibilidade bacteriana (SELVIN; LIPTON, 2003) observada através da queda do número de hemócitos circulantes em animais infectados por WSSV (PHUOC *et al.*, 2009). Associações de mortalidades causadas pela mancha branca tem revelado um crescimento excessivo de vibrios patogênicos durante o cultivo (NUNES; FEIJÓ, 2016).

Algumas cepas bacterianas podem exercer um efeito antiviral em camarões marinhos. Este papel biológico tem sido atribuído a bactérias com capacidades probióticas. A produção de bacteriocinas que podem inibir a ação de bactérias e vírus, participando ativamente contra infecções, enquanto outras inibem a invasão de microrganismos estranhos por meio da parede de mucosa intestinal, aumentando a produção de moléculas imunes inatas ou modulando a resposta inflamatória ou imune (LAKSHMI *et al.*, 2013). Os quatro principais fatores são desencadeados diante a uma resposta antiviral: produção de citocinas, apoptose, fagocitose e profenoloxidase, sendo que se destacam a fagocitose e apoptose no papel de resposta imune antiviral no *Marsupenaeus japonicus* (WANG; ZHANG, 2008).

## REFERÊNCIAS

- ABCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Um novo despertar da carcinicultura brasileira, mantendo os compromissos com a sustentabilidade ambiental, contribuição social e qualidade sensorial do camarão cultivado**. Natal: ABCC, p. 104, 2016.
- ANDRADE, T. New hybrid assay can detect IMNV in resource-poor settings, global aquacult. **Advocate**, p. 68–69, 2007.
- AVNIMELECH, Y. Carbon / nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227–235, 1999. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00085-X
- AVNIMELECH, Y. Control of microbial activity in aquaculture systems: active suspension ponds. **World Aquaculture Society**, v. 34, n. 4, p. 19–21, 2003.
- AZIM, M. E.; LITTLE, D. C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 283, p. 29–35, 2008. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.036
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I. DE; RUIZ-ZARZUELA, I.; et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3–4, p. 173–186, 2006. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009
- BALCÁZAR, L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, D. P. 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**, v. 96, n. 2007, p. 147–150, 2007. doi: 10.1016/j.jip.2007.04.008
- BAUER, E.; WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A. Influence of the Gastrointestinal Microbiota on Development of the Immune System in Young Animals Further Reading. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 35–51, 2006.
- BENZIE, J. A H. Population genetic structure in penaeid prawns. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 1, p. 95–119, 2000. doi: 10.1046/j.1365-2109.2000.00412.x
- BØGWALD, JARL; DALMO, R. A. Gastrointestinal pathogenesis proofs Gastrointestinal Pathogenesis in Aquatic. *In: \_\_\_\_\_*. **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**. Wiley-Blackwell Publishing, 2015, p. 53–74.
- BRASIL. **Plataforma tecnológico do camarão marinho cultivado: segmento de mercado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aquicultura. - Brasília: MAPA/SARCC/DAP, CNPq, ABCC. p.276, 2001.
- BRANCO, J.O.; VERANI, J.R. Aspectos bioecológicos do camarão-rosa *Penaeus brasiliensis* Latreille (Natantia, Penaeidae) da lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 2, p.345–351, 1998.
- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143–163, 2004. doi:

10.1039/b301926h

CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; et al. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, p. 1–9, 2016. BMC Microbiology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>>. Acesso em 09 nov 2017.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, n. 1–4, p. 513–551, 2004. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.12.022

COSTA, S. W.; ZAMPARETTI, A. S.; ANDREATTA, E. R. Presença do vírus da síndrome da mancha branca em crustáceos decápodes silvestres em lagoas costeiras no Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 209–216, 2012.

DA COSTA, R. C. DA; BOCHINI, G. L.; SIMÕES, M.; et al. Distribution pattern of the pink shrimps *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) and *F. paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) on the southeastern Brazilian coast. **Nauplius**, v. 24, p. e2016024, 2016. doi: 10.1590/2358-2936e2016024

DALL, W., HILL, B.J., ROTH LISBERG, P.C., STAPLES, D.J. Biology of the Penaeidae. In: \_\_\_\_\_. **Advances in Marine Biology**. London, UK: Academic Press, 1990, v. 27, p. 21-29.

DEWANGAN, N. K.; GOPALAKRISHNAN, A.; KANNAN, D.; SHETTU, N.; SINGH, R. R. Black gill disease of pacific white leg shrimp. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 10, p. 761–765, 2015. doi: 10.12980/jclm.3.2015j5-70

DIAS-NETO, J. **Proposta de plano nacional de gestão para o uso sustentável de camarões marinhos no Brasil**. Brasília: MMA/IBAMA, 2011.

DILLON, R. J.; DILON, V. M. The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions THE GUT BACTERIA OF INSECTS: Nonpathogenic Interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 71–92, 2004. doi: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123416

D'INCAO, F. 1999. Subordem Dendrobranchiata (camarões marinhos). In: \_\_\_\_\_. BUCKUP, L. & BOND-BUCKUP, G. eds. **Os camarões do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Editora da Universidade, p.271-299.

D'INCAO, F.; VALENTINI, H.; RODRIGUES, L. F. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil. **Atlântica**, v. 40, n. 2, p. 103–116, 2002.

FAÇANHA, F. N.; OLIVEIRA-NETO, A. R.; FIGUEIREDO-SILVA, C.; NUNES, A. J. P. Effect of shrimp stocking density and graded levels of dietary methionine over the growth performance of *Litopenaeus vannamei* reared in a green-water system. **Aquaculture**, v. 463, p. 16–21, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.024>>. Acesso em: 22 nov 2017.

FAR, H. Z.; ROOS, C.; SAAD, B.; et al. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 14, p. 3369–3376, 2009. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/61100>>.

Acesso em 15 nov 2017.

FLEGEL, T. W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, v. 258, p. 1–33, 2006. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.05.013

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p. 180, 2006.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p. 230, 2012.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Roma: FAO, p. 227, 2018.

FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT [online] FAO. **Cultured Aquatic Species Information Programme**. Escrito por Briggs, M. Rome. Atualizado em 7 de April de 2006. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/en)>. Acesso em: 04 out. 2017.

FRAUNE, S.; BOSCH, T. C. G. Why bacteria matter in animal development and evolution. **Bioessays**, v. 32, p. 571–580, 2010. doi: 10.1002/bies.200900192

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147–165, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)>. Acesso em 17 nov 2017.

GATESOUBE, F. J. Live yeast in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effect on fish health and development. **Aquaculture**, v. 267, n. July, p. 20–30, 2007. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.005. Acesso em: 08 out 2017.

GESTEIRA, T. C. V.; PAIVA, M. P. Impactos ambientais dos cultivos de camarões marinhos no Nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 36, p. 23–28, 2003.

GIATSI, C.; SIPKEMA, D.; SMIDT, H.; *et al.* The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. **Nature Publishing Group**, v. 5, p. 18206, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep18206>>. Acesso em: 09 out 2017.

GILLET, R. Global study of shrimp fisheries, **FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER**, v. 475, p. 331, 2008. Disponível em: <<http://www.gbv.de/dms/sub-hamburg/588858374.pdf>>. Acesso em: 06 outubro 2017.

GÓMEZ, G. D.; BALCÁZAR, J. L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 145–154, 2008. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x

GROSS, A.; NEMIROVSKY, A.; ZILBERG, D.; *et al.* Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v. 223, p. 51–62, 2003. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00067-X

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. A new species of *Penaeus* (*Crustacea: Penaeidae*) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Marine Biology**, v. 137, p. 435–446, 2000. doi: 10.1007/s002270000365.

HARRIS, J. M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. **Microbial Ecology**, v. 25, n. 3, p. 195–231, 1993. doi: 10.1007/BF00171889

HOSTINS, B.; LARA, G.; DECAMP, O.; CESAR, D. E.; WASIELESKY, W. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036>>. Acesso em: 09 nov 2017.

HOLTHUIS, L.B. 1980 FAO Species Catalogue. Vol. 1. **Shrimps and prawns of the world**. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish. Synop. v. 125, n. 1, p. 271, Rome: FAO.

HUANG, Z.; LI, X.; WANG, L.; SHAO, Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. n-a, p. 1-10, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/are.12628>>. Acesso em: 13 nov 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Pecuária Municipal 2016. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas>> Acesso em: 28 jan 2019.

JATOBÁ, A.; SILVA, B. C. DA; SILVA, J. S. DA; et al. Protein levels for *Litopenaeus vannamei* in semi-intensive and biofloc systems. **Aquaculture**, v. 432, p. 365–371, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.005>>. Acesso em: 22 nov 2017.

KAR, N.; GHOSH, K. Enzyme Producing Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 115–120, 2008.

KAU, A. L.; AHERN, P. P.; GRIFFIN, N. W.; GOODMAN, A. L.; JEFFREY, I. Human nutrition, the gut microbiome, and immune system: envisioning the future. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 327–336, 2012. doi: 10.1038/nature10213.Human

KHATOON, H.; BANERJEE, S.; TAN, G.; et al. Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 304–309, 2016. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.04.006

KIMURA, H.; HARADA, K.; HARA, K.; TAMAKI, A. Enzymatic approach to fungal association with arthropod guts: A case study for the crustacean host, *Nihonotrypaea harmandi*, and its foregut fungus, *Enteromyces callianassae*. **Marine Ecology**, v. 23, n. 2, p. 157–183, 2002. doi: 10.1046/j.1439-0485.2002.02778.x

KING, G. M.; JUDD, C.; KUSKE, C. R.; SMITH, C. Analysis of Stomach and Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051475

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 170–177, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.008>>. Acesso em 15 nov 2017.

LAKSHMI, B.; VISWANATH, B.; GOPAL, D. V. R. S. Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. **Journal of Pathogens**, v. 2013, p. 1–13, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/424123%0AReview>>. Acesso em: 13 dez 2017.

LATREILLE, P. A. **Histoire naturelle, generate et particuliere, des crustaces et des insectes**. Volume 3. Paris: F. Dufart, 1802-1803.

LEYVA-MADRIGAL, K. Y.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; FIERRO-CORONADO, J. A.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 322–323, p. 16–22, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.033>>. Acesso em: 15 out 2017.

LI, X.; YU, Y.; FENG, W.; YAN, Q.; GONG, Y. Host Species as a Strong Determinant of the Intestinal Microbiota of Fish Larvae. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 29–37, 2012. doi: 10.1007/s12275-012-1340-1

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, n. 1–4, p. 201–220, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)>. Acesso em: 15 out 2017.

LIGHTNER, D.V. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. *In*: SAKAI, Y., MCVEY, J.P., JANG, D., MCVEY, E., CAESAR, M. Editores. 2003. **Proceedings of the Thirty-second US Japan Symposium on Aquaculture. US–Japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR)**. US Department of Commerce, N.O.A.A., Silver Spring, MD, USA, p. 6–24.

LIGHTNER, V. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through Use of SPF Stock and Routine Surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 229–248, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00328.x>>. Acessado em: 15 jan 2018.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>>. Acesso em: 13 dez 2017.

LO, C.; HO, C.; CHENL, C. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 215–225, 1996. doi: 10.3354/dao027215

LOPES, L. D. DE A.; JUNIOR, W. W.; BALLESTER, E. C.; PEIXOTO, S. R. M. Análise comparativa da criação dos camarões-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis* criados em gaiolas em ambiente estuarino. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1540–1546, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500036>>. Acesso em 16

jan 2018.

LUIS-VILLASENOR, I. E.; CASTELLANOS-CERVANTES, T.; GOMEZ-GIL, B.; *et al.* Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: Modulation of the bacterial community. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 257–265, 2013. DOI: 10.1007/s11274-012-1177-0

MACÍAS-RODRÍGUEZ, N. A.; MAÑÓN-RÍOS, N.; ROMERO-ROMERO, J. L.; *et al.* Prevalence of viral pathogens WSSV and IHHNV in wild organisms at the Pacific Coast of Mexico. **Journal of invertebrate pathology**, v. 116, p. 8–12, 2014. doi: 10.1016/j.jip.2013.11.002

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAEDA, M.; SHIBATA, A.; BISWAS, G.; KORENAGA, H. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) Intestine and Assessment of Immunomodulatory Role of a Selected Strain as Probiotic. **Marine Biotechnology**, v. 16, p. 181–192, 2013. doi: 10.1007/s10126-013-9532-1

MARTIN, J. M.; RAKOCY, J. E.; COLE, W. M. Greenwater Tank Culture of Tilapia. **Aquaponics Journal**, v. 4, p. 8–11, 2000.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; KUMAR, V.; DEBOECK, G.; MOHANTA, K. N. Aquaculture and stress management : a review of probiotic intervention. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 405–430, 2013. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x

MOSS, S. M.; MOSS, D. R.; ARCE, S. M.; LIGHTNER, D. V.; LOTZ, J. M. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>>. Acesso em: 15 nov 2017.

MUHAMMAD, F.; ZHANG, Z.; SHAO, M.; *et al.* Ontogenesis of digestive system in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea : Decapoda). **Italian Journal of Zoology**, v. 79, n. 1, p. 77–85, 2012. doi: 10.1080/11250003.2011.590534.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1553–1573, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x

NAVINCHANDRAN, M.; IYAPPARAJ, P.; MOOVENDHAN, S.; RAMASUBBURAYAN, R.; PRAKASH, S.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 38 - 45, 2014. doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.004

NEGREIROS, L. M. S. DE; SANTOS, D. B. Doenças microbianas na carcinicultura brasileira: uma revisão. **Revista Cultural e Científica do UNIFACEX**, v. 13, n. 1, p. 107–124, 2015.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura Ameaçada.

**Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37–57, 2004.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, n. 2, p. 30 - 36, 2016.

OCHOA, J. L.; OCHOA-ALVAREZ, N.; GUZMÁN-MURILLO, M. A.; HERNANDEZ, S.; ASCENCIO, F. Isolation and risk assessment of *Geotrichum* spp. in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) from culture ponds. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 4, p. 755–765, 2015. doi: 10.3856/vol43-issue4-fulltext-14

OVERSTREET, R. M. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. **Aquaculture**, v. 2, n. 2, p. 105–140, 1973.

PÉREZ-FARFANTE, I. Illustrated key to Penaeoid shrimps of commerce in the Americas. **NOAA Tech. Rep. NMFS**, v. 64, p.1-32, 1988.

PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 175, p.1-233, 1997.

PÉREZ-CASTAÑEDA, R.; DEFEO, O. Growth and mortality of transient shrimp populations (*Farfantepenaeus* spp.) in a coastal lagoon of Mexico: role of the environment and density-dependence. **ICES Journal of Marine Science**, v. 62, n. 1, p. 14–24, 2005. doi: 10.1016/j.icesjms.2004.10.005

PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C.; et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, n. 1–2, p. 61–68, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.004>>. Acesso em: 13 dez 2017.

QUESADA-HERRERA, A., POZO, M., ROSA-PLACENCIA, J., 2004. Selección de probióticos bacterianos para su uso en el cultivo de camarón. **III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Comunicación Técnica CIVA 2004**, pp. 97–100. Disponível em: <<http://www.civa2004.org>>. Acesso em: 15 nov 2017.

RAMAIAH, N. A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 35, n. 4, p. 380–387, 2006.

ROBERTA, L.; SOUZA, O. C. DE; JOSÉ, M.; MASSA, D. M. Culturable fungal diversity of shrimp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 49–56, 2011.

ROCHA, I. P. Panorama da Carcinicultura brasileira em 2007: Desempenho, Desafios e Oportunidades. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 104, 2007.

ROSENBERRY, R. 2009. **About shrimp farming**. Disponível em: <<http://www.shrimpnews.com/About.html>>. Acesso em: 06 out 2017.

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; KAROONUTHAISIRI, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during

*Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 12–19, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.004>>. Acesso em: 13 dez 2017.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Ed. Roca. 1996. 1028p.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E. H.; VERRETH, J. A. J. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. **Aquacultural Engineering**, v. 32, p. 379–401, 2004. doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.09.001

SCHULZE, A. D.; ALABI, A. O.; TATTERSALL-SHELDRAKE, A. R.; MILLER, K. M. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. **Aquaculture**, v. 256, p. 50–73, 2006. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.008

SELVIN, J.; LIPTON, A. P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 57, p. 147–150, 2003. doi: 10.3354/dao057147

SHA, Y.; WANG, L.; LIU, M.; *et al.* Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 452, p. 28–36, 2016. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.10.014

SIMÕES, N.; JONES, D.; SOTO-RODRÍGUEZ, S.; ROQUE, A.; GÓMEZ-GIL, B. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. In: \_\_\_\_\_. CRUZ SUÁREZ, L.E., RICQUE MARIE, D., TAPIA SALAZAR, M., GAXIOLA CORTÉS, M.G. Y SIMOES, N. Editores. 2002. Avances en nutrición acuícola VI. **Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola**. 3 al 6 de Septiembre de 2002. Cancún Q. Roo, México. ISBN: 970-694090-1. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México. p.243-276.

SOROKULOVA, I. Probiotics & Health Modern Status and Perspectives of Bacillus Bacteria as Probiotics. **Journal Prob Health**, v. 1, n. 4, p. 1000e106, 2013. doi: 10.4172/2329-8901.1000e106

SULLAM, K. E.; ESSINGER, S. D.; LOZUPONE, C. A.; O'CONNOR, M. P.; ROSEN, G. L.; KNIGHT, R.; KILHAM, S.S.; RUSSELL, J.A. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. **Molecular ecology**, v. 21, n. 13, p.3363-78, 2012. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x.

SUSSEL, F. R.; VIEGAS, E. M. M.; PARISI, G. Acquacoltura in Brasile. **Revista II Pesce**. n.2, p.49-55, 2010.

STECHEER, B.; HARDT, W. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 82–91, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.003>>. Acesso em: 08 out 2017.

THITAMADEE, S.; PRACHUMWAT, A.; SRISALA, J.; *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, v. 452, p. 69–87, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>>. Acesso em: 13 dez 2017.

THURSTON, R. V.; RUSSO, R. C.; SMITH, C. E. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Cutthroat Trout Fry. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 107, n. 2, p. 361–368, 1978.

TZENG, T. DER; PAO, Y. Y.; CHEN, P. C.; *et al.* Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0132860

TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; ROJAS HERRERA, R.; GAXIOLA CORTÉS, G.; ORTIZ, M. L. A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, p. 280, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4062704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 08 out 2017.

WANG, C.; LIN, G.; YAN, T.; *et al.* The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. **Fisheries Science**, v. 80, n. 5, p. 1001–1007, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12562-014-0765-3>>. Acesso em: 09 out 2017.

WANG, W.; ZHANG, X. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 5, p. 522–527, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.016>>. Acesso em: 30 dez 2017.

WU, S.; WANG, G.; ANGERT, E. R.; *et al.* Composition, Diversity and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e30440, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0030440

XU, D.; LIU, W.; ALVAREZ, A.; HUANG, T. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 47, n. 2, p. 287–297, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.08.004>>. Acesso em: 28 nov 2017.

ZENKER JUNIOR, H. H.; AGNES, J. L. **Distribuição do camarão-rosa *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis* ao longo da costa sudeste e sul do Brasil**. Brasília: Sudepe, 1977. p. 1-106. (Doc. Téc., n. 21).

ZHANG, M.; SUN, Y.; CHEN, K.; *et al.* Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. **Aquaculture**, v. 434, p. 449–455, 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.008

ZHENG, Y.; YU, M.; LIU, Y. *et al.* Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. **Aquaculture**, v. 451, p. 163–169, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>>. Acesso em: 09 out 2017.

ZHAO, P.; HUANG, J.; WANG, X.; SONG, X.; YANG, C. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 354–355, p. 97–106, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.034>>. Acesso em: 15 dec 2017.

ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3–4, p. 349–353, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.046>>. Acesso em: 14 out 2017.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil da microbiota intestinal cultivável de camarões marinhos submetidos a diferentes ambientes e associá-la a carga viral encontrada.

##### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as comunidades microbianas residentes e transitórias do intestino e da água do ambiente de camarões *Litopennaeus vannamei* e do *Farfantepenaeus brasiliensis* em seus respectivos ambientes onde foram coletados.
- Verificar se há diferença entre as contagens de grupos funcionais e de gêneros específicos bacterianos em análises realizadas individualmente ou em agrupamentos (*pools*) de intestinos de camarões *Litopennaeus vannamei* no ambiente de água verde e no *Farfantepenaeus brasiliensis* no ambiente estuarino.
- Verificar se há diferença entre a microbiota cultivável residente e transitória em camarões *L. vannamei* oriundos do sistema de bioflocos (BFT) e água clara.
- Averiguar qual a condição viral dos camarões em ambientes de cultivo em água verde, BFT, água clara e em ambientes estuarinos.
- Testar se a presença do vírus IMNV e WSSV impacta nas contagens microbianas intestinais de camarões *L. vannamei* e no *Farfantepenaeus brasiliensis*.
- Identificar as cepas bacterianas isoladas através da região gênica do 16S RNAr.

## RESULTADOS

### **CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA CULTIVÁVEL DO INTESTINO DO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) MEDIANTE A DOENÇAS VIRAIS EM SISTEMAS DE CULTIVO DE ÁGUA VERDE**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* ampliou-se significativamente no últimos dez anos tornando-o a espécie de crustáceo de maior relevância na aquicultura (FAO, 2018). Em condições de cultivo, os animais são submetidos a diversos fatores de estresse como elevadas densidades, deterioração das condições ambientais e exposição a patógenos bacterianos e virais (BALCÁZAR *et al.* 2006; HUANG *et al.* 2014). Há muito tempo se costuma associar a manifestação de doenças em camarões cultivados a esses microrganismos (LIGHTNER; REDMAN 1998). Estudos mostram que o quadro de doenças em camarões pode ser associado à composição microbiana do ambiente (HOSTINS *et al.* 2017), e do próprio trato intestinal do animal, como foi relatado para o camarão *Penaeus monodon* (RUNGRASSAMEE *et al.* 2013), *Penaeus penicillatus* (WANG *et al.* 2014 a) e para o *Litopennaeus vannamei* (S *et al.* 2014; ADEL *et al.* 2016; RUNGRASSAMEE *et al.* 2016; ZHENG *et al.* 2016).

O desenvolvimento da microbiota no trato intestinal é um processo gradual. Em animais aquáticos ela é determinada pelo contato com o ambiente circundante sendo influenciada pela ingestão alimentar, secreção hormonal, absorção de nutrientes e presença de proteínas e enzimas digestivas. Variações na microbiota dos animais ao longo do desenvolvimento estão relacionadas com dieta, idade, localização geográfica, exposição a químicos e condições ambientais. Em camarões *Litopenaeus vannamei*, a colonização do trato gastrointestinal pela microbiota acontece durante os últimos estágios de náuplios (SIMÕES *et al.* 2002; TZUC *et al.* 2014).

A microbiota intestinal pode prevenir a colonização de patógenos na mucosa, melhorar a digestão alimentar e na obtenção de nutrientes, produzir compostos antimicrobianos, mantendo estabilidade e a saúde do hospedeiro (STECHEER; HARDT, 2011). O entendimento sobre o desenvolvimento, composição e influência desses microrganismos simbióticos no trato intestinal de organismos aquáticos representa um desafio para a melhoria da atividade aquícola.

Pesquisas anteriores relatam a importância da caracterização da microbiota intestinal em organismos cultivados para o melhoramento do manejo no cultivo, detecção de patógenos

potenciais e a utilização de probióticos para o cultivo de camarões dulcícolas e marinhos (TZUC *et al.* 2014; WANG *et al.* 2014 b; TZENG *et al.* 2015). Além disso, as alterações nas comunidades bacterianas intestinais estão associadas à severidade de doenças do camarão e os táxons indicadores podem ser usados para avaliar o estado de saúde do camarão (XIONG *et al.*, 2015, 2017).

Normalmente, os fatores determinantes na composição da microbiota, geram um importante papel para o desempenho e a resistência imunológica de camarões. Diante dessas afirmações, as quais podem ajudar no melhor desempenho de produção de camarão, este estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota intestinal cultivável de camarões *Litopenaeus vannamei* em sistema de cultivo em água verde infectados naturalmente com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e testar seu impacto na microbiota comparando animais livres e infectados pelo vírus.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### ❖ *Características ambientais e amostragem*

#### 2.1 Sistema de cultivo autotrófico - água verde (SAV)

O cultivo em água verde aconteceu no estado do Ceará (nordeste do Brasil). Novecentos (900) camarões *Litopenaeus vannamei* (SPR - *Specific Pathogen Resistant* ao IMNV), adquiridos de uma fazenda comercial de pós-larvas (Rio Grande do Norte, Brasil) foram usados no experimento. Os 900 animais com peso médio inicial de três gramas ( $\pm 0,5g$ ) foram confinados em um sistema ao ar livre (*outdoor*) em caixas d'água circulares de polietileno de 3 m<sup>3</sup> no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (Centro de Estudos em Aquicultura Costeira – CEAC / Instituto de Ciências Marinhas Tropicais – LABOMAR / UFC) até atingirem o peso médio final de sete gramas ( $\pm 0,5g$ ), totalizando três (3) meses de cultivo.

A água do cultivo foi primeiramente filtrada e o ambiente em água verde foi alcançado sem a necessidade de fertilização da água. As condições de crescimento da biomassa algal e microrganismos heterotróficos foram fornecidos pelos resíduos de ração e fezes que agiram como fertilizantes naturais e atividade fotossintética. Proporcionando assim, uma fonte de alimentação natural no próprio ambiente de cultivo.

As condições do cultivo estavam sob temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , uma aeração contínua próxima ao nível de saturação de oxigênio dissolvido se mantiveram estáveis em uma

densidade de estocagem 34 indivíduos m<sup>3</sup>; pH 8,3 ± 0,2; salinidade 30,6 ± 2 g L<sup>-1</sup>; administração de ração comercial padrão (35% de proteína bruta, mínimo de 75 g/Kg de extrato etéreo, máximo de 50 g/Kg de fibra bruta, máximo de 130 g/Kg de matéria mineral, máximo 30 g/Kg de cálcio, mínimo de 14 g/Kg - 15g/Kg de fósforo) três vezes ao dia com ajustes nos tratos administrados de acordo com a média de ganho de peso semanal e taxa de renovação de água diária de 50% do volume total.

Os procedimentos de retirada da porção média intestinal e contagem dos microrganismos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (UFC).

## **2.2 Amostragem**

Os camarões desse estudo foram cultivados durante o período chuvoso. Devido a exposição do local onde os animais foram mantidos, as fortes chuvas diminuíram a qualidade da água de cultivo. Houve uma crescente mortalidade de animais, apresentando características sintomáticas a doença da Mionecrose Infecciosa, atribuída ao agente viral IMNV. Diante dessa problemática, ao final do período de cultivo, todos os animais que sobreviveram a essa intempérie foram coletados para a realização desse estudo. Além disso, ao contrário do que foi observado durante a grande mortalidade, esses animais sobreviventes não apresentaram sintomatologia característica a doença da Mionecrose Infecciosa. Diante disso, no diagnóstico para detecção viral realizado, haviam camarões livres do vírus do IMNV.

Por isso, para o SAV foram analisados 58 animais em duas etapas. A primeira etapa, 45 camarões foram distribuídos em três grupos de 15 indivíduos cada, com amostras compostas pelo conjunto de intestinos de cada grupo. A segunda etapa, os 13 animais restantes foram separados e a microbiota intestinal analisada individualmente para verificar.

Os demais procedimentos e materiais se encontram detalhadamente descritos na seção de MATERIAL E MÉTODOS GERAL (Página 96).

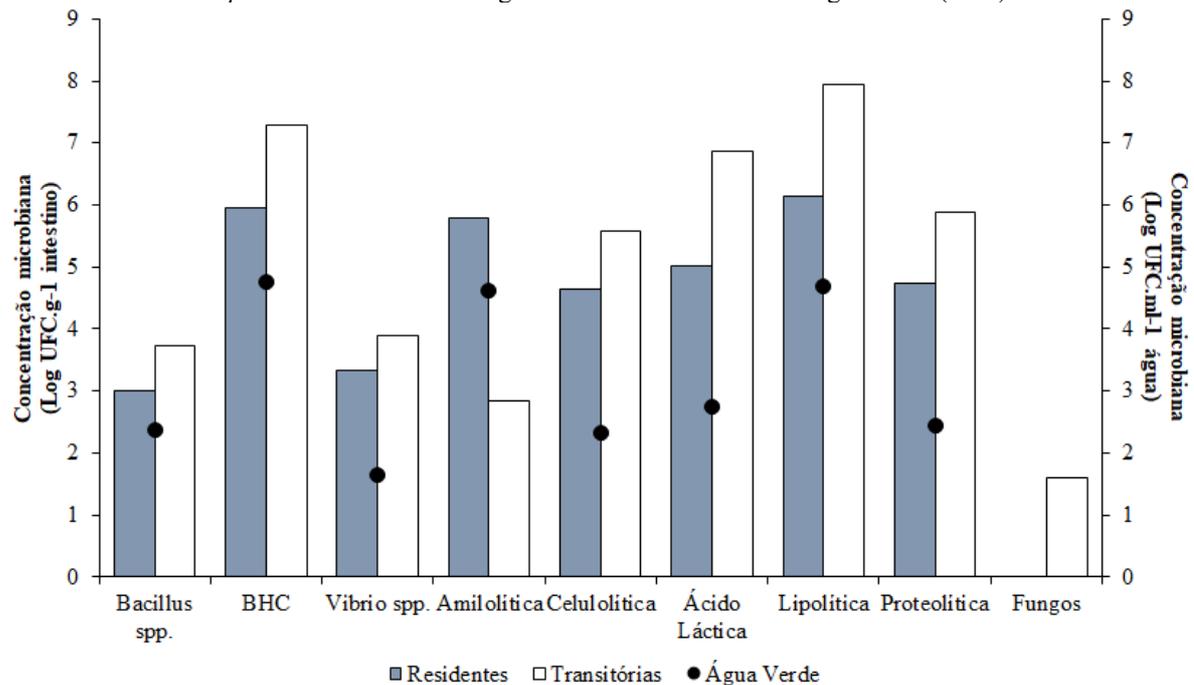
## **3. RESULTADOS**

Comparativamente, o total das contagens dos grupos bacterianos cultiváveis analisadas foram maiores na microbiota transitória que dos microrganismos residentes do intestino nos camarões cultivados no SAV, indicando o maior destaque para as bactérias transitórias, ácido lácticas, lipolíticas e bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC). Salvo como única exceção, o grupo funcional das bactérias amilolíticas apresentando um maior número de bactérias

produtoras de amilases constituintes da comunidade bacteriana residente (Gráfico 1). Os fungos foram encontrados apenas no crescimento da comunidade microbiana transitória (Gráfico 1).

As contagens microbianas para a água de cultivo, com exceção para as amilolíticas, foram inferiores ao trato e ao conteúdo intestinal (Gráfico 1).

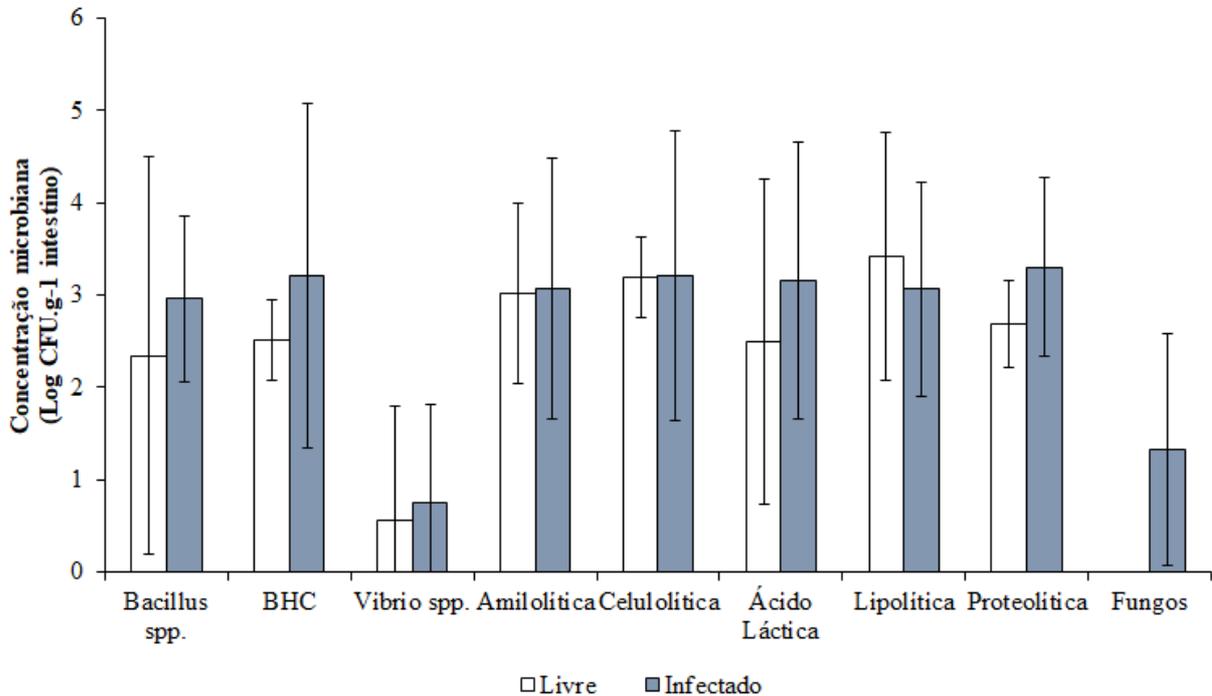
**Gráfico 1** – Total de unidades formadoras de colônia (UFC) (N total = 45 camarões) de amostras intestinais do *Litopenaeus vannamei* e na água de cultivo em sistema de água verde (SAV).



Fonte: Dados da pesquisa

Os camarões selecionados para o diagnóstico viral (N = 13) apresentaram cinco espécimes positivas para o IMNV, com uma variação de  $6,76 \times 10^2$  a  $1,14 \times 10^5$  cópias de IMNV. $\mu\text{g}^{-1}$  de RNA. Nenhuma amostra positiva ao WSSV foi detectada para os camarões investigados. Não foi encontrada uma relação significativa ( $P > 0,05$ ) entre as contagens microbianas dos grupos funcionais analisados e as duas classes analisadas, a livre e a infectada pelo IMNV (Gráfico 2). O crescimento de fungos foi exibido apenas em camarões infectados pelo vírus (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - Crescimento microbiano residente em intestinos individuais do *Litopenaeus vannamei* livres e infectados pelo IMNV. N = 13 camarões; cada barra = Log<sub>10</sub> da média UFC.g<sup>-1</sup> intestino, barra de erro= média ± desvio padrão; P < 0,05; ANOVA – um fator.



Fonte: Dados da pesquisa

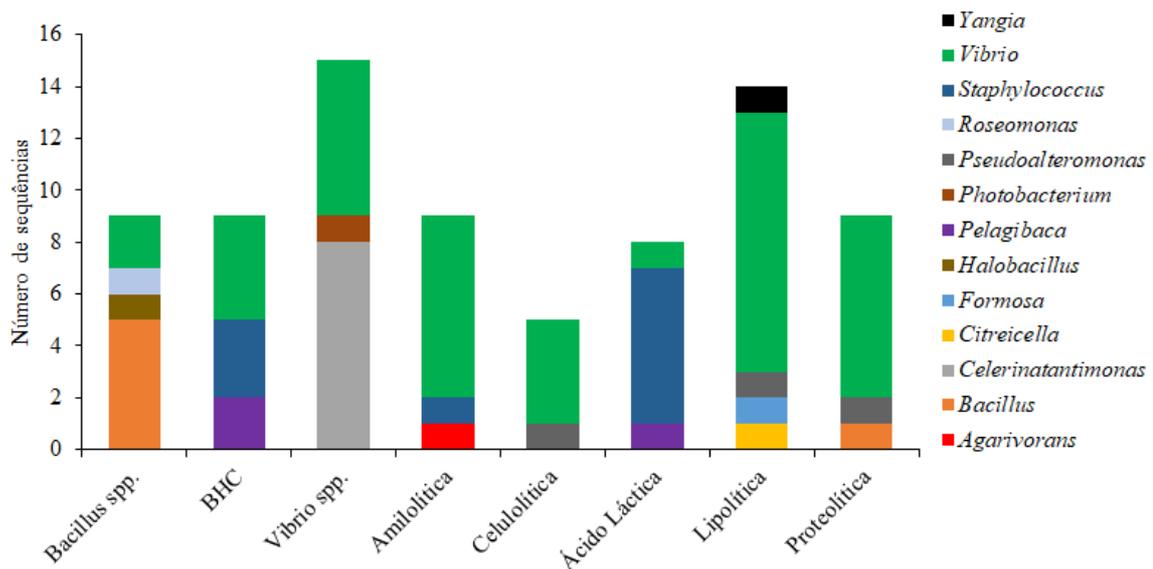
As sequências nucleotídicas produzidas (81 sequências) foram submetidas ao banco de dados do Genbank sob o número de acesso MG722642-MG722675. O resultado geral da homologia das sequências pode ser detalhadamente analisado no anexo 2. A maioria das cepas isoladas e identificadas pertenciam a classificação de Gram negativas, com exceção das bactérias ácido lácticas e *Bacillus* spp (Anexo 2).

A presença do gênero *Vibrio* foi identificado em todos os grupos bacterianos estudados, apresentando superioridade dentre os gêneros nos grupos funcionais de bactérias amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas (Gráfico 3). Entre as sequências analisadas do grupo *Vibrio* spp. foram identificadas treze sequências únicas (Anexo 2). Dentre essas sequências, cinco são consideradas patogênicas ao camarão *Litopenaeus vannamei* sendo as espécies *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. rumoiensis* e *V. harveyi*, as quais foram identificadas em 83,33% em camarões infectados pelo IMNV.

A característica de cepas candidatas para probióticos para aquicultura foram apresentadas em cinco espécies de *Bacillus* identificadas nesse estudo, sendo essas: *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. aquimaris* (Anexo 2) distribuídas, em um resultado semelhante ao grupo *Vibrio* spp., em 83,33% dos camarões infectados pelo vírus.

Outros gêneros com frequência de bactérias isoladas foram *Staphylococcus*, *Pseudoalteromonas* e *Pelagibaca* apresentando diferentes perfis de produção de enzimas (Gráfico 3).

**Gráfico 3** - Distribuição dos isolados bacterianos de acordo com os grupos de interesse (*Bacillus* spp., BHC e *Vibrio* spp.) e atividade enzimática. A identificação das sequências foi através do RDP (Ribossomal Database Project) e Seqmact (Similaridade e S\_ab score próximos a 1).



Fonte: Dados da pesquisa

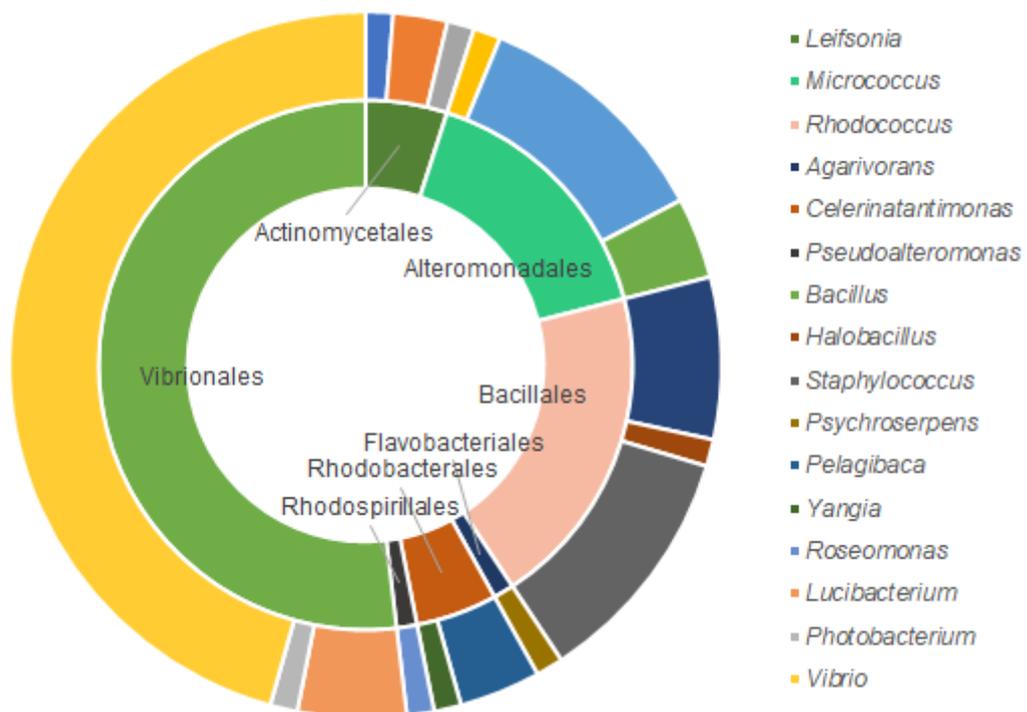
A abundância desses gêneros também pode ser observada no Gráfico 4, juntamente a árvore Neighbor-Joining com as espécies de maior similaridade (Anexo 1). Duas principais ordens se destacam: Vibrionales e Bacillales (Gráfico 4). O gênero *Vibrio* foi dominante para a ordem Vibrionales, enquanto os gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus* foram predominantes na ordem Bacillales (Gráfico 4).

As cepas do gênero *Vibrio* apresentaram similaridade com as espécies *Vibrio corallilyticus*, *V. proteolyticus*, *V. azureus*, *V. mytili*, *V. natriegens*, *V. nigripulchritudo*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio probioticus*, *Vibrio rumoiensis*, *V. variabilis*, *V. vulnificus*, *V. hispanicus*, *V. harveyi*, *Vibrio* sp. Entre os isolados do gênero *Staphylococcus*, as espécies identificadas foram, *Staphylococcus cohnii*, *S. warneri* e *S. hominis*. Entre os *Bacillus*, as espécies *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Anexo 1).

Elevados valores de *bootstrap* (> 60) foram apresentados para *Photobacterium*

*damselae* com isolados de *Vibrio* (98), *Pseudoalteromonas lipolytica* para isolados de atividade celulolítica, lipolítica e proteolítica (100), *Agarivorans albus* com isolados de atividade amilolítica (99), *Roseomonas gilardii*, *B. subtilis*, *Halobacillus trueperi* (100), *H. aquaemaris* (85) para isolados de *Bacillus* e para atividade proteolítica. *Yangia pacifica* para cepas lipolíticas (100), *Pelagibaca bermudensis* para isolados de BHC e ácido lácticas (99), e a espécie *Formosa* sp. para atividade lipolítica (100) (Anexo 1).

**Gráfico 4** – Identificação de sequências a nível de gênero, de acordo com as classificações da base de dados do BLAST e RDP. O círculo interno representa as ordens identificadas e o círculo externo os respectivos gêneros.



Fonte: Dados da pesquisa

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados dessa pesquisa mostram que no sistema de cultivo em água verde há uma maior densidade microbiana no conteúdo intestinal do que o residente. Apesar da não associação significativa entre as contagens microbianas e as classes livres e infectados pelo vírus IMNV, uma maior quantidade microbiana foi encontrada para animais infectados. Especificamente, os fungos foram encontrados apenas na classe transitória e infectados pelo vírus IMNV.

Estudos anteriores relataram uma forte interação entre a microbiota do intestino e o ambiente onde são mantidos os organismos aquáticos. A água do cultivo possui um fluxo constante através do trato intestinal e afeta a dinâmica dos microrganismos permanentes no intestino, assim como a produção de enzimas digestivas (GATESOUBE 1999; JOHNSON *et al.* 2008; TZUC *et al.* 2014; CARDONA *et al.* 2016). Estes relatos validam o que foi encontrado nesse estudo, ao constatar uma maior contagem absoluta de colônias bacterianas transitórias agregadas ao conteúdo intestinal em relação as bactérias residentes.

Comparando com a quantificação da microbiana da água de origem desses animais, se verificou uma menor diversidade bacteriana em relação à porção média intestinal do trato digestivo estudado. Essa evidência contrariou ao que foi mostrado em pesquisas anteriores, as quais relatam que a água do cultivo apresenta uma maior diversidade que o intestino dos camarões (TZUC *et al.*, 2014; CARDONA *et al.*, 2016). Esse caso pode estar atrelado as condições *outdoor* do cultivo, pois o fundo do tanque de polietileno, a diária taxa de renovação de água, juntamente as intempéries climáticas sofridas durante o cultivo, não proporcionaram um intenso desenvolvimento de matéria orgânica dissolvida na água. Condicionando então, a um baixo crescimento microbiano no ambiente de cultivo.

As elevadas contagens microbianas para o conteúdo transitório intestinal indicam que há uma maior atividade de degradação alimentar antes de alcançar a mucosa intestinal. As maiores contagens para as lipases reforçam seu papel fundamental de ajudar na nutrição do hospedeiro através da produção de suas enzimas extracelulares (BALCÁZAR *et al.*, 2006; TZUC *et al.* 2014). Com isso, mostra que no intestino desses animais, no ambiente de água verde, existe uma maior biodisponibilidade de assimilação de compostos lipídicos. Por outro lado, a presença elevada dessas mesmas exoenzimas pode estar relacionada à capacidade dessas bactérias produtoras de lipases a desencadear doenças nos animais hospedeiros (LEYVA-MADRIGAL *et al.*, 2011; OCHOA *et al.*, 2015).

O maior crescimento de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) no ambiente está

fortemente relacionada com a presença de fontes de carbono e nitrogênio. Em alguns casos, o aumento desses valores foi correlacionado com a introdução de poluentes orgânicos em corpos hídricos (SOUSA *et al.*, 2006).

Para o comportamento atípico do grupo amilolítico, a maior atividade amilolítica evidenciada na comunidade residente pode estar associada aos fatores ligados ao estresse animal. A seleção específica de um carboidrato é muito importante para o crescimento do *L. vannamei*, pois uma fonte extra desse componente pode ser usada para compensar as perdas energéticas causadas pelo estresse (LI *et al.*, 2017).

Existe a hipótese de que camarões doentes perdem o equilíbrio entre bactérias benéficas e patogênicas (LI *et al.*, 2018). Além disso, recentemente, foi provado que a infecção por um patógeno viral, mais especificamente o WSSV, causa impacto na composição da microbiota intestinal e em suas respectivas funções metabólicas (WANG *et al.*, 2018). Estas duas afirmações se mostraram constantes neste estudo, pois a superioridade de contagens bacterianas para alguns grupos bacterianos em camarões infectados por IMNV levou a evidência de fungos, a superioridade de vibrios patogênicos, como também para os *Bacillus* e ácido láctica, as quais são consideradas candidatas permanentes como agentes probióticos na aquicultura (BALCÁZAR *et al.*, 2006; RINGØ *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014b).

A ausência de sintomas característicos da doença da Mionecrose Infecciosa em camarões infectados neste estudo está diretamente ligada ao nível de carga viral encontrada, já que trabalhos como o de Silva *et al.*, 2015 mostrou que camarões infectados alcançaram 23,95 a  $8,39 \times 10^6$  cópias de IMNV.  $\mu\text{g}^{-1}$  de RNA e estes animais não apresentaram sinais clínicos da doença. Enquanto os resultados da carga viral obtidos nesta pesquisa foram abaixo do que foi encontrado por Silva *et al.*, 2015. Situação essa que pode explicar a não diferenciação na biota intestinal dos camarões livres e infectados pelo vírus, pois os animais podem ser positivos e não terem desenvolvido a infecção.

O destaque da ordem Vibrionales e Bacillales e a maior frequência dos respectivos gêneros *Vibrio* e *Bacillus* exibem um resultado esperado, pois esta implicação é validada por outros estudos os quais exibem a mesma abundância de gêneros de *Vibrios* em camarões *L. vannamei* (RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016) e predominância de espécies de *Bacillus* em camarões *Penaeus penicillatus* (HUANG *et al.*, 2014).

A identificação de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* foi exibida na maioria dos grupos funcionais cultiváveis, mostrando sua capacidade multienzimática. Essa característica evidencia que esse gênero produz uma grande variedade de substâncias extracelulares associada ao potencial de virulência de bactérias patogênicas (OLIVER *et al.*, 1986).

Algumas espécies bacterianas identificadas nesse sistema de cultivo em água verde são consideradas de elevada importância devido a sua capacidade de causar doenças aos organismos aquáticos. Espécies como *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* são destaques como patógenos na carcinicultura (LIGHTNER; REDMAN, 1998; KUMARAN; CITARASU, 2016). Associações de *Photobacterium damsela*, patógeno oportunista (WANG; CHEN, 2006), nas proximidades de viveiros foi relatada em cultivos de *Penaeus penicillatus* (WANG *et al.* 2014 a). Além disso, *V. coralliilyticus* e *V. rumoiensis* foram relatados na mesma região em que essa pesquisa foi desenvolvida em viveiros de fazendas de cultivo no estado do Ceará (VIEIRA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2016).

Características benéficas para o cultivo de camarões são relatados para as espécies *V. natriegens* e *V. mytili*, ambos identificados nesse estudo, pois essas bactérias mostram associação a estágios larvais saudáveis e à capacidade de superar bactérias patogênicas na utilização de carbono em sistema de bioflocos (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2015). Como também, a identificação de *Vibrio proteolyticus*, o qual no trabalho relatado por De Schrijver e Ollevier (2000) esta espécie foi capaz de estimular a degradação de proteínas no intestino do linguado, apresentando um potencial probiótico, e presente na água e no sedimento em cultivos de *Litopenaeus vannamei*. A presença do *V. azureus* neste trabalho foi registrada por Zheng *et al.* (2016) como não patogênica para a mesma espécie de camarão.

A presença de fungos no conteúdo intestinal dos animais, mesmo diante da ausência desses microorganismos na água do ambiente, pode indicar que existe uma outra fonte. Nesse caso, a ração administrada aos animais. Registros de fungos patogênicos em organismos marinhos ainda são limitados (RAMAIAH, 2006). A presença desses microorganismos nos cultivos aquícolas é preocupante, pois são considerados patógenos oportunistas e geralmente afetam os animais mais debilitados (OCHOA *et al.*, 2015).

## 5. CONCLUSÃO

A microbiota cultivável de camarões *L. vannamei* cultivados no sistema de água verde possuem uma ampla atividade enzimática realizada por bactérias pertencentes em sua grande maioria pelo gênero *Vibrio*. Os camarões neste ambiente indicam uma certa vulnerabilidade diante de animais infectados pelo IMNV, a maior predominância de bactérias responsáveis pela manifestação de vibrioses e, também, a presença de fungos no conteúdo intestinal do animal.

Nosso estudo sugere que, apesar da influência não viral no crescimento bacteriano, a atividade enzimática descrita no intestino de camarão pode servir como base para melhorar os requerimentos nutricionais necessários para o cultivo de *L. vannamei* em água verde.

## REFERÊNCIAS

- ADEL, M.; EL-SAYED; A.-F. M. ; YEGANEH, S. ; DADAR, M.; GIRI, S. S. Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis subsp. lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, p. 150-156, 2016. doi: 10.1007/s12602-016-9235-9
- ALBORES, F. V. ; CORNEJO, M. A. P. ; PORCHAS, M. M. ; CANCHOLA, E. V. ; GALVÁN, T. G.; CÓRDOVA, L. R. M. Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. **Helgoland Marine Research**, v. 71, p. 1-10, 2017. doi: 10.1186/s10152-017-0485-z
- BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiol**, v. 114, p. 173–186, 2006. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009
- CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; LORGEUX, B.; PIQUEMAL, D.; PIERRAT, F.; NOGUIER, F.; SAULNIER, D. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 1–9, 2016. doi: 10.1186/s12866-016-0770-z
- DE SCHRIJVER, R.; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*, *Aquaculture*, v. 186, p. 107–116, 2000. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00372-5.
- DONOVAN, T.; VAN NETTEN, P. Culture media for the isolations and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 77–91, 1995. doi: 10.1016/0168-1605(95)00015-C
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Roma: FAO, p. 227, 2018.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147–165, 1999.
- HOSTINS, B.; LARA, G.; DECAMP, O.; CESAR, D. E.; WASIELESKY, W. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**, v. 480, p. 58-64, 2017. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.036
- HUANG, Z.; LI, X.; WANG, L.; SHAO, Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 1737-1746, 2014. doi: 10.1111/are.12628
- JOHNSON, C. N. J.; BARNES, S.; OGLE, J.; GRIMES, D. J. Microbial Community Analysis of Water, Foregut, and Hindgut during Growth of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Closed-System Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, p. 251–258, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00155.x>> Acesso em: 19 out. 2017.

KING, G. M.; JUDD, C.; KUSKE, C. R.; SMITH, C. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. **PLoS ONE**, v. 7, e51475, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051475

KUMARAN, T.; CITARASU, T. Isolation and characterization of vibrio species from shrimp and artemia culture and evaluation of the potential virulence factor. **Intellectual Property Rights: Open Access**, v. 4, p. 1–5, 2016. doi: 10.4172/2375-4516.1000153

LEYVA-MADRIGAL, K. Y.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; FIERRO-CORONADO, J. A.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 322–323, p. 16–22, 2011. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.09.033

LI, E.; WANG, X.; CHEN, K.; XU, C.; QIN, J. G.; CHEN, L. Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity, **Reviews in Aquaculture**, v. 9, p. 57–75, 2017. doi: 10.1111/raq.12104.

LI, E., XU, C., WANG, X., WANG, S., ZHAO, Q., ZHANG, M., QIN, J. G. AND CHEN, L. Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 26, p. 381–399, 2018. doi: 10.1080/23308249.2018.1440530.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201–220, 1998. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00187-2

LUIS-VILLASEÑOR, I. E.; VOLTOLINA, D.; AUDELO-NARANJO, J. M.; PACHECO-MARGES, M. R.; HERRERA-ESPERICUETA, V. E.; ROMERO-BELTRÁN, E. Effects of biofloc promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive culture. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, p. 332–337, 2015. doi: 10.4081/ijas.2015.3726

OCHOA, J. L.; OCHOA-ALVAREZ, N.; GUZMÁN-MURILLO, M. A.; HERNANDEZ, S.; ASCENCIO, F. Isolation and risk assessment of *Geotrichum* spp . in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) from culture ponds. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, p. 755–765, 2015. doi: 10.3856/vol43-issue4-fulltext-14

OLIVER, J. D.; WEAR, J. E.; THOMAS, M. B.; WARNER, M.; LINDER, K. Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 5, p. 99–111, 1986.

RAMAIAH, N. A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 35, n. 4, p. 380–387, 2006.

RINGØ, E. Å, L. L.; KRISTIENSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R. E.; MAYHEW, T. M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 451–467, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02339.x>>. Acessado em: 20 out 2017.

ROCHA, R. DOS SANTOS.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Multidrug-resistant *Vibrio*

associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 105, p. 337–340, 2016. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.001

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; KAROONUTHAISIRI, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, 12–19, 2016. doi: 10.1016/j.jip.2015.11.004

SILVA, S. M. B. C. DA *et al.* Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture International**, v. 23, p. 563–576, 2014. doi: 10.1007/s10499-014-9836-9

SIMOES, N.; JONES, D.; SOTO-RODRÍGUEZ, S.; ROQUE, A.; GÓMEZ-GIL, B. (2002) Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. *In: Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Cruz-Suarez, L., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M., Simoes, N. (Ed.), Cancún, Mexico, p. 243–276.

SOUSA, O. V; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; GOMES, N. C. M. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.07.006

STECHER, B.; HARDT, WOLF-DIETRICH. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 82–91, 2011. doi: 10.1016/j.mib.2010.10.003

TZENG, T., PAO, Y., CHEN, P. AND WENG, F. C. Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*), **PloS ONE**, v. 10, e0132860, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0132860

TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; ROJAS HERRERA, R.; GAXIOLA CORTÉS, G.; ORTIZ, M. L. A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, 2014. doi: 10.1186/2193-1801-3-280

VIEIRA, R. H. S. DOS FERNANDES; ROCHA, R. DOS SANTOS ; CARVALHO, E. M. R.; SOUZA, O. V.; GESTEIRA, T. C. V. *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**, v. 47, p. 454–460, 2010.

WANG, F.; CHEN, J. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress, **Aquaculture**, v. 258, p. 34–41, 2006. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.043.

WANG, C.; LIN, G.; YAN, T.; ZHENG, Z.; CHEN, B.; SUN, F. The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. **Fisheries Science**, v. 80, p. 1001–1007, 2014 a. doi: 10.1007/s12562-014-0765-3

WANG, P. H.; HUANG, T.; ZHANG, X.; HE, J. G. Antiviral defense in shrimp: From innate

immunity to viral infection. **Antiviral Research**, v. 108, p. 129–141, 2014 b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.013>>. Acessado em: 22 out. 2017.

WANG, J.; HUANG, Y.; XU, K.; ZHANG, X.; SUN, H.; FAN, L.; YAN, M. White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, 2018. doi: 10.1016/j.fsi.2018.09.076.

XIONG, J.; WANG, K.; WU, J.; QIUQIAN, L.; YANG, K.; QIAN, Y.; ZHANG, D. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, p. 6911-9, 2015 doi: 10.1007/s00253-015-6632-z.

XIONG, J.; ZHU, J.; DAI, W.; DONG, C.; QIU, Q. Integrating gut microbiota immaturity and disease discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. **Environmental Microbiology**, v. 19, p. 1490-1501, 2017. doi: 10.1111/1462-2920.13701.

ZHANG, M.; SUN, Y.; CHEN, K.; YU, N.; ZHOU, Z.; CHEN, L.; DU, Z.; LI, E. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. **Aquaculture**, v. 434, p. 449–455, 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.008

ZHENG, Y.; YU, M.; LIU, Y.; SU, Y.; XU, T.; YU, M.; ZHANG, X. H. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. **Aquaculture**, v. 451, p. 163–169, 2016. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.09.020

## **CAPÍTULO 2: PERFIL MICROBIANO DA ÁGUA E DO INTESTINO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* INFECTADO POR WSSV CULTIVADO EM SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO**

### **1. INTRODUÇÃO**

A grande produção de *Litopenaeus vannamei* tem atraído os produtores para sistemas de cultivo cada vez mais eficientes. No sistema de cultivo com a tecnologia de Bioflocos (BFT) ou cultivos em meio mixotrófico tem sido bastante atrativo para a aquicultura devido as trocas mínimas ou nenhuma de água em condições de elevadas densidades (SCHRYVER *et al.*, 2008). Esse sistema exibe uma complexa interação entre matéria orgânica e microrganismos, como as bactérias heterotróficas (CRAB *et al.*, 2007). A atuação desses microrganismos na ação de ciclagem de nutrientes pode também proporcionar a manutenção da qualidade da água do cultivo, além da formação do floco ser passível de consumo pelo camarão, servindo como uma fonte de suplementação nutricional (AVNIMELECH, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 2004; EMERENCIANO *et al.*, 2013; KHATOON *et al.*, 2016).

O sistema de cultivo em água clara, no qual exige uma filtragem externa para a manutenção da qualidade da água, pode ser utilizado para a obtenção de uma grande densidade animal (MARTINS *et al.*, 2010; RAY; LOTZ, 2017). Apesar de todos os benefícios proporcionados pelo sistema BFT, uma pesquisa comparando os sistemas BFT e água clara relata sobre o melhor desenvolvimento pós-larval de camarão em sistema de água clara (ESPARZA-LEAL *et al.*, 2015).

Sabendo que os camarões podem ingerir bactérias presentes no ambiente de cultivo, a comunidade microbiana aquática pode exercer uma forte influência sobre a comunidade microbiana do trato digestivo de animais aquáticos cultivados, podendo alterar as propriedades relacionadas a nutrição, imunidade e resistência a doenças (GATESOUBE, 1999; ZHANG *et al.*, 2014).

Diante disso, estudos mostram que se faz necessário descrever a microbiota intestinal para o estabelecimento de métodos que proporcionem comunidades microbianas mais diversas e estáveis para um melhor desempenho durante o cultivo de camarões (EMERENCIANO *et al.*, 2013; LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2015; CARDONA *et al.*, 2016). Este estudo teve como objetivo quantificar e comparar a microbiota intestinal residente e transitória do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistema BFT e água clara e identificar as cepas bacterianas do camarão de acordo com os gêneros de bacterianos

específicos e os grupos enzimáticos funcionais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **❖ *Características ambientais e amostragem***

#### **2.1. Sistema de cultivo em Bioflocos (BFT)**

Os camarões oriundos de uma empresa produtora de pós-larva de camarão AQUATEC foram cultivados na Estação Marinha de Aquicultura do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os animais foram mantidos em condições de cultivo sob a temperatura de  $24,6 \pm 0,69^{\circ}\text{C}$ , oxigênio dissolvido:  $5,44 \pm 0,34$  mg/L, pH: 7,63, NO<sub>2</sub> (nitrito):  $0,5 \pm 0,33$  mg/L, NO<sub>3</sub> (nitrato):  $29,9 \pm 14,22$  mg/L, PO<sub>4</sub> (fosfato):  $6,85 \pm 2,05$  mg/L, salinidade:  $32,5 \pm 1,41$ , alcalinidade:  $108,4 \pm 28,5$  mg/L em uma densidade de estocagem de 600 camarões / m<sup>2</sup> com oferta de ração comercial padrão (35 – 38% de proteína bruta) até o alcance de uma média de peso de  $13,72 \pm 1,49$  g antes da análise.

#### **2.2. Sistema de cultivo em Água clara (AC)**

Os indivíduos vieram da mesma localidade institucional e uma parte desses camarões foram retirados do próprio sistema de Bioflocos (BFT) e foram realocados para um ambiente de cultivo em água clara durante um período de duas semanas antes da coleta. Os parâmetros físico-químicos foram padrões para um sistema de cultivo nestas condições de cultivo. Os animais apresentaram uma média de peso de  $14,84 \pm 0,44$  g em uma densidade de estocagem de 100 camarões / m<sup>2</sup> até o momento antes da análise.

#### **2.3. Amostragem**

A análise da microbiota foi realizada em 45 animais para cada ambiente, sendo que esta quantidade foi distribuída em 3 *pools* de 15 camarões para cada ambiente analisado.

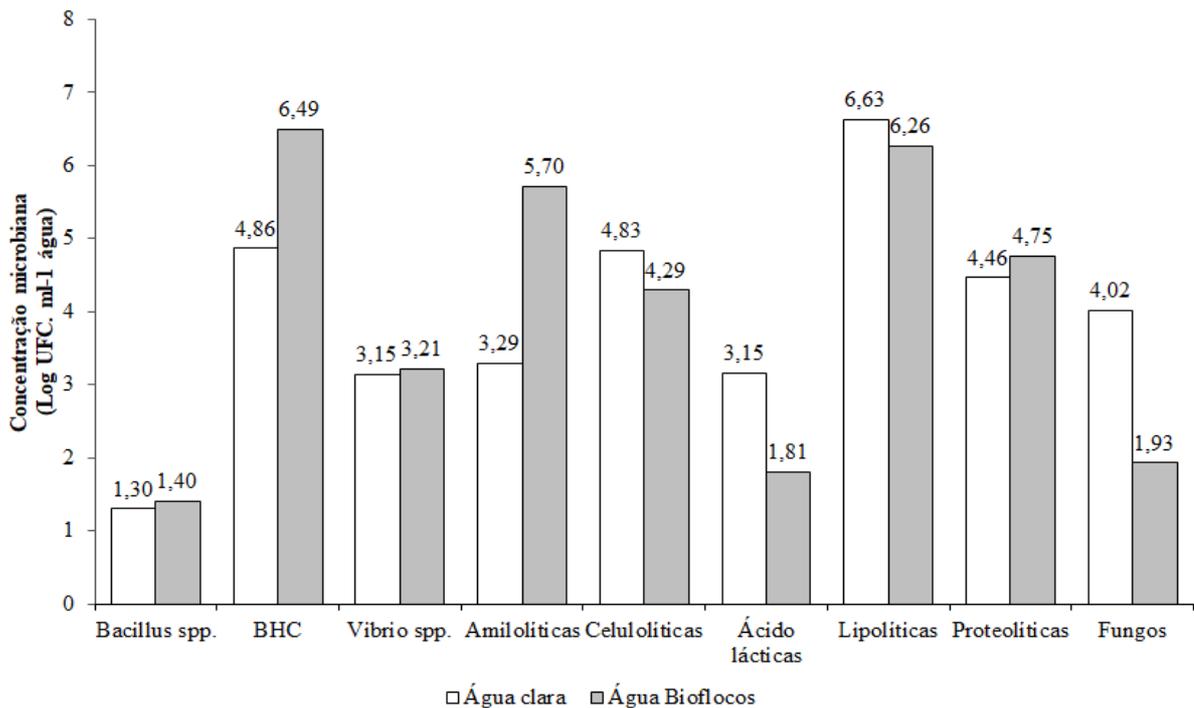
Para o diagnóstico viral, foram coletados 15 camarões aleatoriamente de cada ambiente estudado. O processo de identificação bacteriana foi realizado apenas para o ambiente de água clara.

Os demais procedimentos e materiais se encontram detalhadamente descritos na seção de MATERIAL E MÉTODOS GERAL (Página 96).

### 3. RESULTADOS

A água de cultivo do sistema de Bioflocos (BFT) e água clara (AC) apresentaram uma média geral de contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) de  $6,09 \times 10^5$  e  $4,98 \times 10^5$  UFC/mL de água, respectivamente. O crescimento bacteriano logaritimizado foi superior no ambiente BFT pelos grupos BHC ( $3,08 \times 10^6$  UFC/mL) e amilolíticas ( $5,05 \times 10^5$  UFC/mL) (Figura 1). Para o ambiente de água clara, o grupo das lipolíticas ( $4,03 \times 10^6$  UFC/mL), celulolíticas ( $6,7 \times 10^4$  UFC/mL), fungos ( $1,05 \times 10^4$  UFC/mL) e ácido lácticas ( $1,42 \times 10^3$  UFC/mL) mostraram superioridade em relação ao sistema AC (Gráfico 1). Os demais grupos microbianos apresentaram contagens de colônias aproximadas entre os ambientes estudados (Gráfico 1).

**Gráfico 1** – Total de unidades formadoras de colônias (UFC) da água de cultivo em sistema de água clara (AC) e no sistema de Bioflocos (BFT). Acima da barra: valores logaritimizados de contagens de colônias.

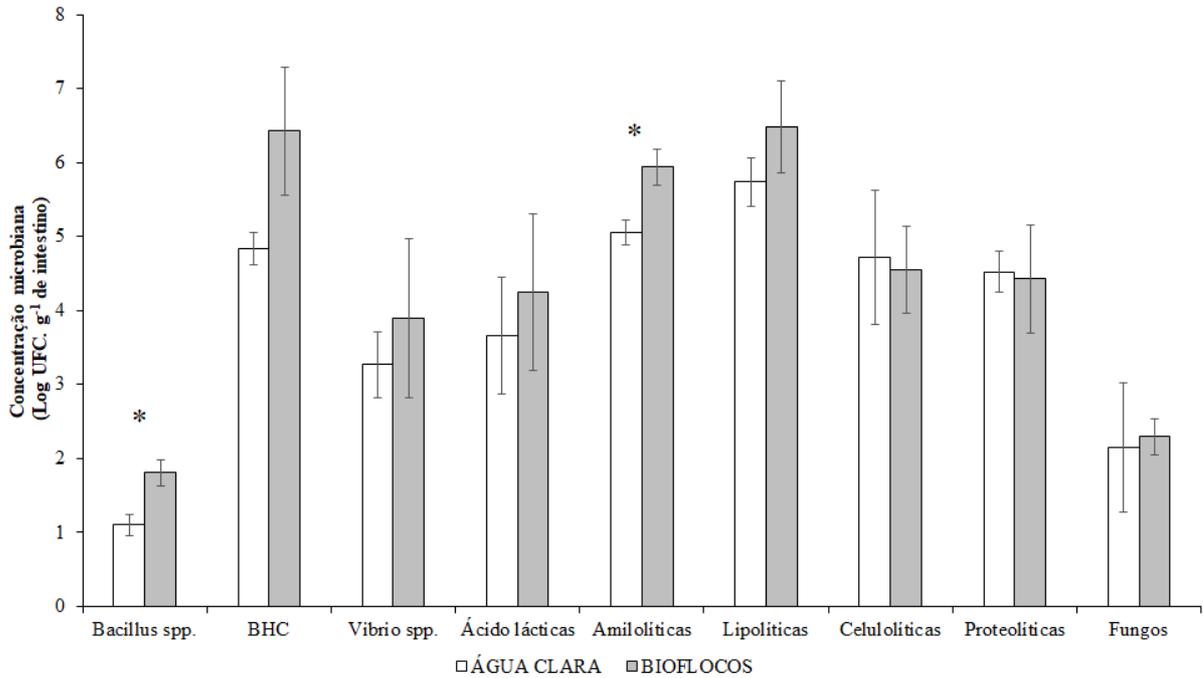


Fonte: Dados da pesquisa

A microbiota residente do sistema BFT exibiu uma concentração microbiana média de  $2,56 \times 10^6$  UFC/g de intestino, sendo esta superior ao  $1,39 \times 10^5$  UFC/g de intestino encontrada no cultivo em água clara (Gráfico 2). Apesar do maior crescimento microbiano estar sendo apontado pelo sistema BFT para a maioria dos grupos cultiváveis analisados, apenas o crescimento para o gênero *Bacillus* spp. e para a seleção de bactérias produtoras de amilase apresentaram uma diferença significativa em suas contagens bacterianas ( $p < 0,05$ ) em relação

aos dois ambientes estudados (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - Crescimento microbiano médio da microbiota residente em sistema de água clara (AC) e no sistema de Bioflocos (BFT). N = 3 *pools* de 15 camarões. Cada barra = Log<sub>10</sub> da média UFC.g<sup>-1</sup> de intestino e barra de erro= desvio médio padrão.

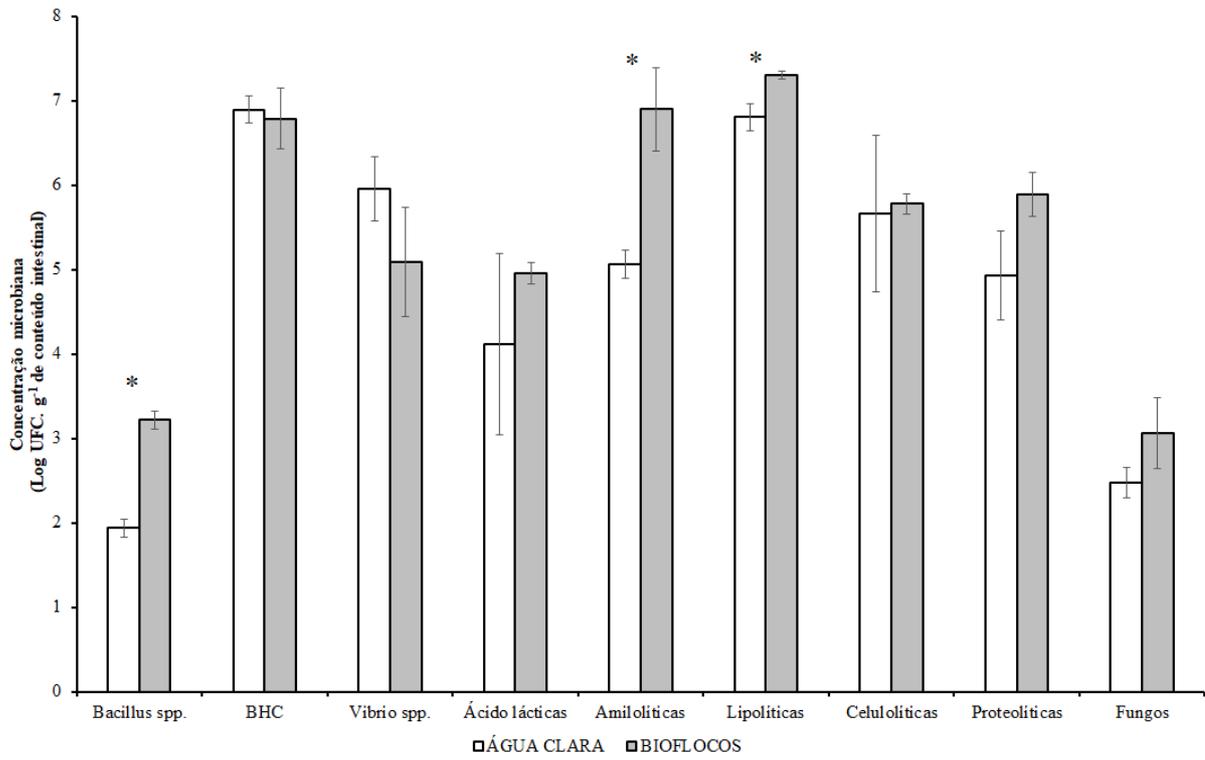


\* p < 0,05

Fonte: Dados da pesquisa

Em relação à microbiota transitória, o sistema BFT manteve os valores superiores de crescimento em  $5,01 \times 10^6$  UFC/mL de conteúdo intestinal em relação ao sistema de água clara com  $2,04 \times 10^6$  UFC/mL, sendo estes maiores que o que foi encontrado para a comunidade microbiana residente. Diferenças significativas foram encontradas para o gênero *Bacillus* spp., para amilolíticas e as lipolíticas (Gráfico 3).

**Gráfico 3** - Crescimento microbiano médio da microbiota transitória em sistema de água clara (AC) e no sistema de Bioflocos (BFT). N = 3 *pools* de 15 camarões. Cada barra = Log<sub>10</sub> da média UFC.g<sup>-1</sup> de intestino e barra de erro= desvio médio padrão.



\* p < 0,05

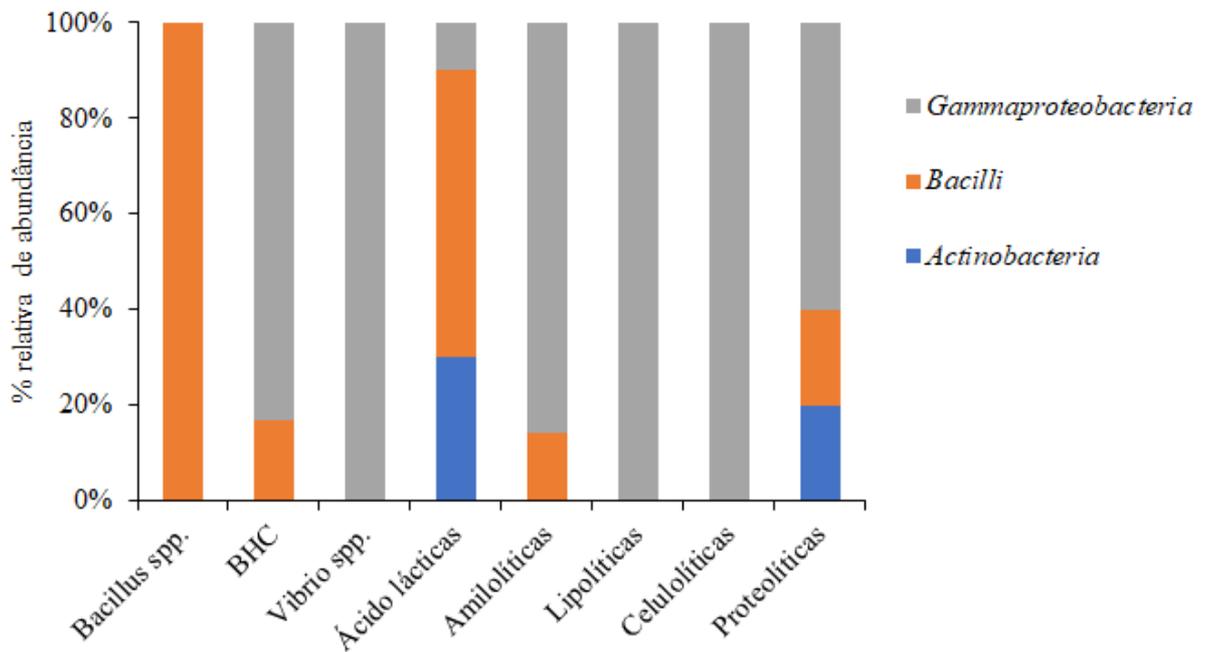
Fonte: Dados da pesquisa

A análise viral mostrou que todos os camarões foram negativos para o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) no sistema BFT. Dentre os quinze camarões analisados do sistema AC, cinco deles foram positivos, observando uma prevalência de 33,33% do vírus. Como a microbiota destes animais foram realizadas em *pool* de intestinos, foi considerado que o cultivo em sistema AC estava infectado com o patógeno WSSV.

Os fungos foram identificados tanto para a água, para a comunidade residente e a transitória em quantidades aproximadas (Gráficos 1, 2 e 3).

Considerando os resultados obtidos de identificação molecular de cepas bacterianas para o sistema AC, foram isoladas e identificadas 67 cepas bacterianas. A análise taxonômica mostrou que as cepas identificadas pertenciam a três filos, sendo estes *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Dentre estes filos, *Proteobacteria* apresentou uma maior predominância (> 70% do total de sequências). Como também, a maior presença da classe *Gammaproteobacteria* (70,14%) seguido pelas classes *Bacilli* (23,88%) e *Actinobacteria* (5,97%) (Gráfico 4).

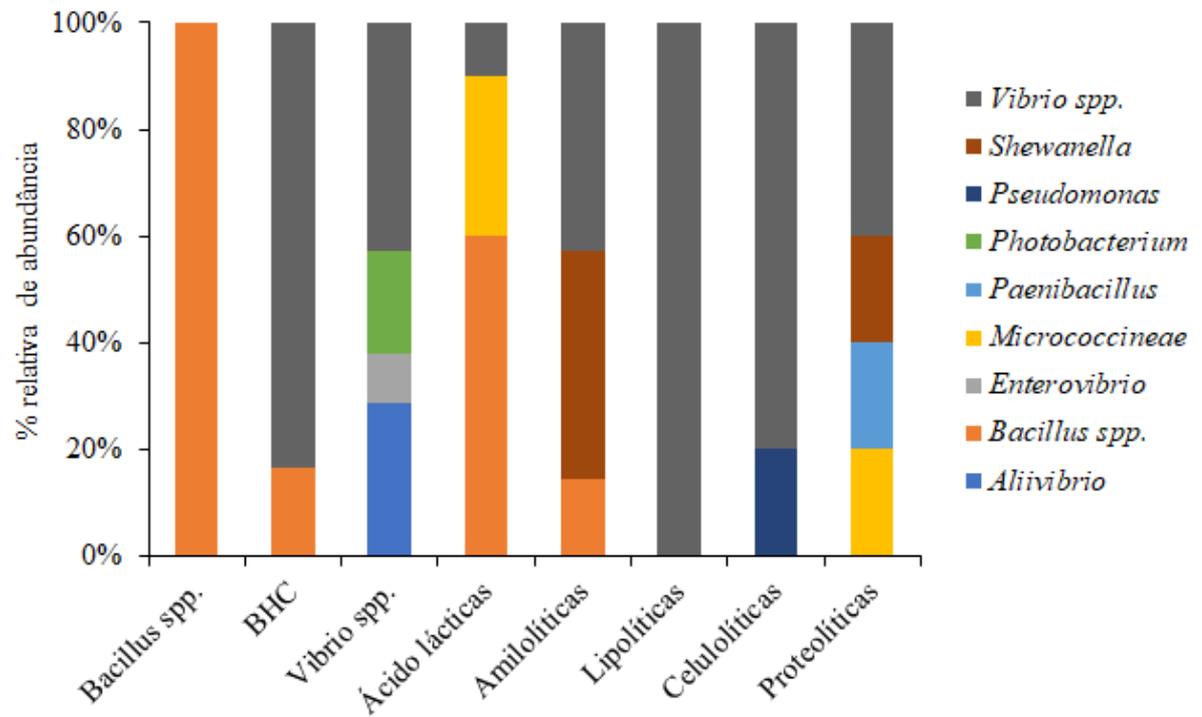
**Gráfico 4** – Porcentagem relativa de abundância bacteriana intestinal a nível de classe em sistema de cultivo água clara.



Fonte: Dados da pesquisa.

Com exceção do grupo *Bacillus* spp., o gênero *Vibrio* spp. esteve presente em todos os grupos bacterianos analisados, principalmente em maior abundância para o grupo das lipolíticas (Gráfico 5). Os isolados para a seleção de *Vibrios* spp. foram identificados outros gêneros como *Photobacterium*, *Enterovibrio* e *Aliivibrio* (Gráfico 5). Logo em seguida, destacam-se em maior número o gênero *Bacillus* no grupo das amilolíticas, *Bacillus* spp., BHC e ácido lácticas. O gênero *Shewanella* para o grupo das amilolítica e proteolíticas. Como também, a subordem *Micrococccineae* para a seleção de bactérias ácido lácticas e proteolíticas (Gráfico 5). As homologias encontradas na identificação das sequências exibiram uma variedade de espécies (Anexo 3), sendo a maioria encontrada correspondente aos gêneros específicos de interesse de maior representatividade já relatados acima, *Vibrio* spp. e *Bacillus* spp. (Anexo 3).

**Gráfico 5** – Classificação de gêneros bacterianos de acordo com a seleção de gêneros (*Bacillus* spp., BHC e *Vibrio* spp.) e grupos enzimáticos funcionais para o ambiente de água clara.



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4. DISCUSSÃO

A mudança de habitat durante um curto período de tempo revelou que alguns grupos microbianos sofreram alterações. Em termos de crescimento microbiano geral o sistema de cultivo em Bioflocos (BFT) ultrapassa o sistema de Água Clara (AC). O perfil microbiano analisado mostra que os ambientes analisados se diferenciam estatisticamente nos grupos bacterianos amilolíticos, lipolíticos e para o gênero *Bacillus*.

O maior crescimento microbiano na água de cultivo em BFT pode ser atribuída a principal característica desse sistema: a intensa comunidade microbiana contida em partículas orgânicas presentes na coluna d'água, proporcionada pela elevada relação carbono / nitrogênio (C:N) (RAY *et al.*, 2010; CARDONA *et al.*, 2016). Por outro lado, a quantidade e a qualidade, desses nutrientes disponíveis no ambiente de cultivo pode sofrer mudanças e conseqüentemente afetar o desenvolvimento de microrganismos (CARDONA *et al.*, 2016). Fato esse observado para as bactérias ácido-lácticas e produtoras de celulase e lipase, as quais foram menos abundantes no sistema BFT em comparação com o sistema de água clara.

Em camarões é comum encontrar um elevado conteúdo proteico, seguido dos componentes de amilolíticos e lipídicos (CHUMPOL *et al.*, 2016). Diante da análise realizada, os resultados evidenciaram que a diferença significativa encontrada fornece indicativos de que o ambiente influenciou na contagem de *Bacillus* spp., como também no maior crescimento dos grupos produtores de amilases e lipases no sistema BFT. Essa diferença significativa mostra que camarões cultivados nesses ambientes podem apresentar diferentes taxas de absorção nutricional. Isso se deve perante a uma das funções de grande importância do sistema BFT, o de oferecer auxílio na atividade enzimática digestiva dos camarões cultivados nesse ambiente (MOSS *et al.*, 2001).

Colônias bacterianas isoladas para o gênero *Bacillus* spp., em maiores quantidades para o sistema BFT, não apresentam uma fixação permanente no tecido intestinal do camarão (HOSTINS *et al.*, 2017). Mesmo em condições de retenção passageira, estes microrganismos no sistema digestivo destes animais mostram uma capacidade de produzir vários compostos que podem trazer benefícios a saúde do hospedeiro (MOHAPATRA *et al.*, 2013; SOROKULOVA, 2013).

Os filos identificados para o ambiente de água clara (*Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*) foram consistentes com os achados prévios para *Litopenaeus vannamei* (RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016). A nível de classe, a maior prevalência de *Gammaproteobacteria* neste trabalho foi constatado ao que foi relatado por Rungrassamee *et*

*al.* (2016) para as espécies *Litopenaeus vannamei* e *Penaeus monodon*. As bactérias pertencentes a essa classe apresentam uma grande adaptabilidade a ambiente oligotróficos, como o sistema de água clara utilizado neste estudo (BOWMAN; MCCUAIG, 2003).

Cepas bacterianas isoladas em TCBS (Tiosulfato Citrato Bile Sacarose) foram identificadas para a maioria dos grupos funcionais cultiváveis. Esses microrganismos são comumente encontrados em animais e habitats marinhos e estuarinos (THOMPSON *et al.*, 2004) e a grande variedade de produção de enzimas extracelulares que participam dos mecanismos de patogenicidade tem sido associada ao potencial de virulência de bactérias patogênicas (PEIXOTO *et al.*, 2012).

A capacidade multienzimática dos vibrios relatada por Tzuc *et al.* (2014), se mostrou nesta pesquisa como agente produtor de proteases, amilases, lipases e quitinases em camarões *Litopenaeus vannamei*. Dentre os vibrios identificados neste estudo, muitas espécies foram relatadas como um potencial patógeno na mesma e em outras espécies de camarões. A *Photobacterium damsela* é considerada um potencial patógeno em juvenis e adultos de *Litopenaeus vannamei* (VANDENBERGHE *et al.*, 1999), este patógeno foi identificado em um sistema de água clara semelhante a este estudo no cultivo *Litopenaeus stylirostris* (CARDONA *et al.*, 2016). A presença de *Vibrio harveyi* se vincula como um dos patógenos mais preocupantes durante os estágios de desenvolvimento do *Litopenaeus vannamei* (VANDENBERGHE *et al.*, 1999) e está associada a grandes perdas durante o cultivo (CHAIYAPECHARA *et al.*, 2012; KUMARAN; CITARASU, 2016). As cepas identificadas como *Vibrio vulnificus* são consideradas patogênicas aos humanos, neste estudo a mesma apresentou atividade proteolítica indicando sua capacidade virulenta, esta característica está associada a elevadas mortalidades em viveiros de camarões (TENG *et al.*, 2017).

Espécies de vibrios foram também identificados como bactérias que oferecem benefícios em algumas espécies de interesse ao cultivo. A espécie *Vibrio proteolyticus* apresenta-se como candidata a um potencial agente probiótico, com capacidade de estimular a degradação de proteínas no intestino do linguado (*Scophthalmus maximus*) (SCHRIJVER, DE; OLLEVIER, 2000). Além disso, essa mesma espécie foi identificada na água e no sedimento de fazendas de cultivo do *Litopenaeus vannamei*, sendo portanto, potencialmente ingerida por estes animais (ZHENG *et al.*, 2016).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. foram identificadas dentro do grupo BHC, ácido lácticas e com atividade amilolítica. A presença dessa bactéria em intestino de camarões é constante e apresentam a capacidade de competir com bactérias patogênicas (VINOJ *et al.*, 2014). A espécie identificada neste estudo como *Bacillus subtilis*,

relatos anteriores afirmam que esta mesma espécie no ambiente de água clara exibiu uma atividade inibitória a muitos patógenos, aumento da média de peso, ajuda na atividade digestiva, resposta do sistema imune e sobrevivência para o *Litopenaeus vannamei* (FAR *et al.*, 2009; ZOKAEIFAR *et al.*, 2014).

Nesta pesquisa, bactérias produtoras de amilases apresentaram espécies de maior abundância, uma delas identificamos *Shewanella haliotis*. Esta bactéria foi analisada como candidata a probiótico e mostrou um melhor desempenho no crescimento, imunidade e resistência a doenças no cultivo *Litopenaeus vannamei* (HAO *et al.*, 2014). No entanto, algumas espécies identificadas não foram encontradas em estudos correlacionados ao ambiente de cultivo. Como ocorreu para a espécie *Shewanella marisflavi*, a mesma foi relatada no intestino do pepino-do-mar (*Apostichopus japonicus*) e foi considerada patogênica ao organismo (LI *et al.*, 2010).

O crescimento de fungos foi apresentado tanto para a água, como também no tecido e conteúdo intestinal para ambos os sistemas de cultivo, o que torna um caso problemático de enfermidade devido a muitos destes organismos serem considerados patógenos oportunistas (OCHOA *et al.*, 2015). A maioria do crescimento fúngico está atribuída ao floco no sistema BFT, servindo como substrato para outros organismos. Além disso, a idade do floco exerce uma grande influência, pois quanto mais velho o floco maior a chance do desenvolvimento de fungos no sistema BFT (SCHRYVER *et al.*, 2008; EMERENCIANO *et al.*, 2013).

Apesar do cultivo em água clara não oferecer condições para o crescimento de fungos, a presença de fungos na água pode estar atribuída na ração a qual foi administrada aos animais, pois a contaminação inicial e a riqueza de nutrientes, podem proporcionar condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos, principalmente em ambientes de elevadas umidades (MURATORI *et al.*, 2013; CALVET *et al.*, 2015).

A presença do vírus WSS juntamente a estada de bactérias com elevada disseminação virulenta, principalmente pertencente aos vibrios, evidencia a característica oportunista apresentada por essas bactérias. Além disso, alguns estudos mostram a presença de vibrios patogênicos em camarões infectados por vírus (SELVIN; LIPTON, 2003; PHUOC *et al.*, 2009; NUNES; FEIJÓ, 2016).

A mudança do sistema BFT para AC foi acompanhada pelo aumento da carga viral do WSSV e pela diminuição das contagens de bactérias pertencentes ao grupo dos *Bacillus*. Considerando que os animais eram os mesmos no sistema BFT e águas claras, possivelmente os camarões já estavam infectados pelo WSSV e foram transferidos de um sistema para outro. Porém as condições do sistema BFT, já citado anteriormente, mantêm o animal com seu sistema

imune ativo, o que explica a ausência de positivos. Ao passar para o sistema de águas claras, a infecção aumentou tornando possível a sua detecção. A presença de patologias virais está intimamente ligada a ambientes menos biosseguros, nos quais proporcionam uma introdução e propagação de agentes patogênicos virais (MOSS *et al.*, 2012).

Outro detalhe a ser considerado é que se fosse utilizado o PCR em tempo real para diagnósticos dos vírus de ambos os sistemas, BFT e águas claras, possivelmente seria possível identificar carga viral em ambos, já que o PCR convencional, mesmo *nested*, é eficiente, mas não tem a mesma sensibilidade que o primeiro citado.

## 5. CONCLUSÃO

O cultivo BFT apresenta um maior crescimento microbiano devido ao desenvolvimento de bactérias e outros microrganismos agregados, influenciando na microbiota residente e transitória, assim como foi mostrado para o sistema AC. A mudança de ambiente pode proporcionar uma queda no sistema imunológico do animal, pois além das mudanças ambientais, provoca uma diminuição de microrganismos responsáveis pela manutenção da saúde do animal, como também aumenta a susceptibilidade a infecção viral.

A identificação de microrganismos intestinais é uma ferramenta útil para o estudo de bactérias candidatas a probióticos atuantes na otimização nutricional, como também na defesa contra os principais patógenos do camarão cultivado em um ambiente específico.

## REFERÊNCIAS

- AVNIMELECH, Y. Carbon / nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227–235, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)> . Acesso em: 7 out. 2017.
- BOWMAN, J. P.; MCCUAIG, R. D. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2463–2483, 2003. doi: 10.1128/AEM.69.5.2463-2483.2003
- CALVET, R. M.; PEREIRA, MA. G.; COSTA, A. P. R.; TORRES, A. M.; MURATORI, M. C. S. Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1021–1026, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782015000601021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000601021&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 15 nov 2017.
- CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0770-z>>. Acesso em: 22 dez 2017.
- CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**, v. 270, p. 1–14, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>> Acessado em: 17 nov 2017.
- CHAIYAPECHARA, S.; RUNGRASSAMEE, W.; SURIYACHAY, I.; *et al.* Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 4, p. 938–953, 2012. doi: 10.1007/s00248-011-9936-2
- CHUMPOL, S.; KANTACHOTE, D.; RATTANACHUAY, P.; *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**, v. 48, n. 6, p. 1–16, 2016. doi: 10.1111/are.13149
- EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **Intech**. p.301–328, 2013. doi: 10.5772/53902
- ESPARZA-LEAL, H. M.; CARDOZO, A. P.; WASIELESKY JR, W. Performance of *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in indoor nursery tanks at high stocking density in clear-water versus biofloc system. **Aquacultural Engineering**, v. 68, p. 28–34, 2015 doi: 10.1016/j.aquaeng.2015.07.004.
- FAR, H. Z.; ROOS, C.; DAUD, H. M.; HARMIN, S. A.; SHAKIBAZADEH, S. Effect of *Bacillus Subtilis* on the Growth and Survival Rate of Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 3369–76, 2009. doi:10.5897/AJB09.239.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147–165, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00187-8)>. Acesso em 17 nov

2017.

HAO, K.; LIU, J.; LING, F.; *et al.* Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 428–429, p. 141–149, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.016>>. Acesso em: 22 dez 2017.

HOSTINS, B.; LARA, G.; DECAMP, O.; CESAR, D. E.; WASIELESKY, W. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.036>>. Acesso em: 09 nov 2017.

KHATOON, H.; BANERJEE, S.; TAN, G.; *et al.* Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 304–309, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.006>>. Acesso em: 20 dec 2017.

KUMARAN, T.; CITARASU, T. Isolation and Characterization of *Vibrio* Species from Shrimp and Artemia Culture and Evaluation of the Potential Virulence Factor. **Intellectual Property Rights: Open Access**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2016. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/isolation-and-characterization-of-vibrio-species-from-shrimp-and-artemiaculture-and-evaluation-of-the-potential-virulence-factor-2375-4516-1000153.php?aid=76216>>. Acesso em: 22 dez 2017.

LI, H.; QIAO, G.; LI, Q.; *et al.* Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infecting sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, p. 865–877, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2761.2010.01189.x

LUIS-VILLASEÑOR, I. E.; VOLTOLINA, D.; AUDELO-NARANJO, J. M.; *et al.* Effects of biofloc promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive culture. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 3, p. 332–337, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3726>>. Acesso em: 27 abr 2017.

MARTINS, M.; EDING, H.; VERDEGEM, J.; *et al.* New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. **Aquacultural Engineering**, v. 43, n. 3, p. 83–93, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>>. Acesso em: 25 dec 2017.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; KUMAR, V.; DEBOECK, G.; MOHANTA, K. N. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 405–430, 2013. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x.

MOSS, S. M.; DIVAKARAN, S.; KIM, B. G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 125–131, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00540.x>>. Acesso em: 26 dec 2017.

MOSS, S. M.; MOSS, D. R.; ARCE, S. M.; LIGHTNER, D. V.; LOTZ, J. M. The role of

selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>>. Acesso em: 04 jan 2018.

MURATORI, M. C. S.; MARLÚCIA, M.; PEREIRA, G.; *et al.* Contaminação fúngica em rações para camarões cultivados. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 85–90, 2013.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, n. 2, p. 30 - 36, 2016.

OCHOA, J. L.; OCHOA-ALVAREZ, N.; GUZMÁN-MURILLO, M. A.; HERNANDEZ, S.; ASCENCIO, F. Isolation and risk assessment of *Geotrichum* spp. in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) from culture ponds. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 4, p. 755–765, 2015. doi: 10.3856/vol43-issue4-fulltext-14

PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C.; *et al.* Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, n. 1–2, p. 61–68, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.004>>. Acesso em: 22 dez 2017.

PEIXOTO, L. J. S.; SÁ, M. C. M.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 3, p. 453–461, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S180816572012000300020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180816572012000300020&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 03 dez 2018.

RAY, A. J.; LEWIS, B. L.; BROWDY, C. L.; LEF, J. W. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, v. 299, p. 89–98, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>>. Acessado em: 18 nov 2017.

RAY, A. J.; LOTZ, J. M. Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and stable isotope dynamics in clear-water recirculating aquaculture systems versus biofloc systems. **Aquaculture Research**, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/are.13262>> . Acesso em: 05 jan 2018.

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; KAROONUTHAISIRI, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 12–19, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.004>>. Acesso em: 22 dez 2017.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E. H.; VERRETH, J. A. J. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. **Aquacultural Engineering**, v. 32, p. 379–401, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.001>>. Acesso em: 16 out 2018.

SCHRIJVER, R. DE; OLLEVIER, F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. **Aquaculture**, v. 186, n. 1–2, p. 107–116, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00372-5)>.

Acesso em: 25 de nov 2017.

SCHRYVER, P. DE; CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, v. 277, p. 125–137, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>>. Acesso em: 14 de nov 2017.

SELVIN, J.; LIPTON, A. P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 57, p. 147–150, 2003. DOI: 10.3354/dao057147

SOARES, Juarez Braga; CASIMIRO, Renato; ALBUQUERQUE, Laurênia Maria Braga de. **Microbiologia básica**. 2. ed. rev. e ampl. Fortaleza: Edições UFC, 1991. 180 p.

SOROKULOVA, I. Probiotics & Health Modern Status and Perspectives of Bacillus Bacteria as Probiotics. **Journal Prob Health**, v. 1, n. 4, p. 1000e106, 2013. DOI: 10.4172/2329-8901.1000e106

TENG, T.; LIANG, L.; CHEN, K.; XI, B.; XIE, J.; XU, P. Isolation, identification and phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from *Litopenaeus vannamei*. **PLoS ONE** v. 12, p. e0186135, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186135>>. Acesso em: 5 dez 2018.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 68, n. 3, p. 403–31, table of contents, 2004. American Society for Microbiology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353563>>. Acesso em: 8 out 2017.

TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; ROJAS HERRERA, R.; GAXIOLA CORTÉS, G.; ORTIZ, M. L. A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, p. 280, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4062704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 dez 2017.

VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-ARZARENA, R.; *et al.* Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2592–2597, 1999.

VINOJ, G.; VASEEHARAN, B.; THOMAS, S.; SPIERS, A. J.; SHANTHI, S. Quorum-Quenching Activity of the AHL-Lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 Inhibits *Vibrio* Biofilm Formation In Vitro and Reduces Shrimp Intestinal Colonisation and Mortality. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 707–715, 2014. doi: 10.1007/s10126-014-9585-9

ZHANG, M.; SUN, Y.; CHEN, K.; *et al.* Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. **Aquaculture**, v. 434, p. 449–455, 2014. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.008

ZHENG, Y.; YU, M.; LIU, Y.; *et al.* Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. **Aquaculture**, v. 451, p. 163–169, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.020>>. Acesso em: 5 dez 2017.

ZOKAEIFAR, H.; BABAEI, N.; SAAD, C. R.; *et al.* Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 1, p. 68–74, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.007>>. Acesso em: 22 dez 2017.

### **CAPÍTULO 3: COMUNIDADE MICROBIANA CULTIVÁVEL INTESTINAL DO CAMARÃO NATIVO *Farfantepenaeus brasiliensis* (LATREILLE, 1817) NO ESTUÁRIO DO RIO PACOTI, CEARÁ.**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Considerando que os manguezais são uma das maiores áreas no Brasil, estes ecossistemas são típicos de regiões tropicais onde ocorrem a transição entre o ambiente marinho e terrestre, apresentando uma biota e processos biológicos particulares, cuja composição é influenciada principalmente por fatores abióticos, como temperatura, salinidade, precipitações e amplitude de marés (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000; GILMAN *et al.*, 2008).

Dentre os camarões nativos neste ambiente estuarino brasileiro, o gênero *Farfantepenaeus* apresenta uma importância pesqueira em todos os estados costeiros, do Amapá ao Rio Grande do Sul (DIAS-NETO, 2011). Como exemplo, a espécie *Farfantepenaeus paulensis*, a qual apresenta um grande potencial para ser cultivada. A robustez e a resistência dos reprodutores capturados dessa espécie tem incentivado a pesquisas na área de produção da espécies em estudo: o *Farfantepenaeus brasiliensis* (LOPES *et al.*, 2009; BRAGA *et al.*, 2011; HOSTINS *et al.*, 2015).

A comunidade microbiana em ambientes aquáticos naturais possuem funções importantes nos processos biológicos, como produtores e consumidores de oxigênio dissolvido, reciclagem de nutrientes e fonte de alimento para outros organismos (EMERENCIANO *et al.*, 2015). As condições disponíveis dentro do ambiente natural podem levar ao desenvolvimento de microrganismos estáveis na microbiota intestinal, representando a microbiota natural e as pressões seletivas específicas dentro do intestino do hospedeiro (VAN DER WAIJ, 1992; BEVINS; SALZMAN, 2011; WONG; RAWLS, 2012).

As condições qualitativas e quantitativas da comunidade microbiana do ambiente podem ser exibidas pela microbiota intestinal dos animais aquáticos (RUNGRASSAME *et al.*, 2014). Essa situação se mostra bastante interessante para as áreas de manguezais, principalmente no nordeste do Brasil, pois esses ambientes são passíveis de impactos na comunidade microbiana devido à intensa descarga de efluentes oriundos de fazendas de cultivo de camarão marinho, assim como uma via de disseminação de patógenos virais para o ambiente (PAES-OSUNA, 2005; SOUSA *et al.*, 2006; MACÍAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014).

Estudos mostram que a espécie *Farfantepenaeus brasiliensis* busca nas condições ideais de cultivo e na manipulação da microbiota intestinal através da suplementação nutricional

fornecida em sistemas de cultivo que promovem o crescimento de microrganismos, como por exemplo o biofilme e BFT (EMERENCIANO *et al.*, 2012, 2015; SOUZA *et al.*, 2012; VIAU *et al.*, 2012). No entanto, sabendo da importância da manipulação da microbiota intestinal de camarões para fins de cultivo, não há registros de pesquisas para a espécie estudada em ambiente natural.

Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar quantitativamente e qualitativamente a microbiota intestinal do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* no estuário do rio Pacoti, no estado do Ceará e conferir a carga viral dos principais patógenos de maior impacto na região, o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e da síndrome da mancha branca (WSSV).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### ❖ *Características ambientais e amostragem*

#### 2.1. Obtenção dos animais

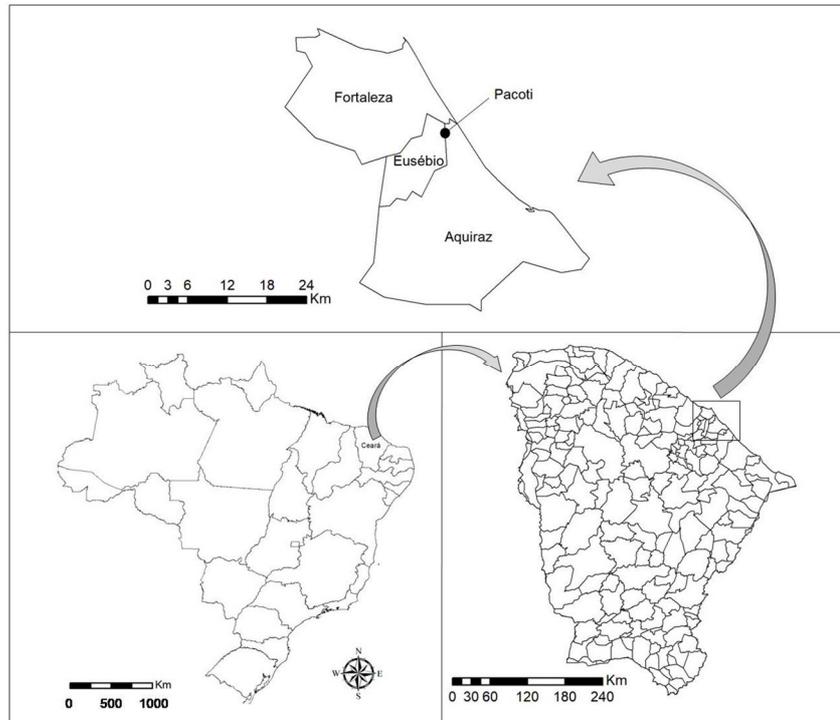
Os camarões foram capturados em coleta única em setembro de 2017 na região estuarina do rio Pacoti, nas imediações do município de Eusébio no estado do Ceará (Figura 1). Foram coletados um total de 45 camarões por meio de captura artesanal em arrastos sucessivos. Junto a captura dos animais, o volume de 1 L de água do ambiente estuarino foi coletado em recipiente âmbar esterilizado.

Logo após a captura, os animais foram mantidos vivos em recipientes de 50 litros sob aeração contínua e transportados para o laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP / UFC). Os animais foram então pesados, com uma média de peso de  $1,24 \pm 0,35$  g, e identificados de acordo com chave de identificação proposta por Pérez-Farfante (1997). Os parâmetros ambientais registrados no ambiente foram de pH: 6,68, salinidade: 40 ppm e temperatura:  $26 \pm 0,5$  °C.

#### 2.2. Amostragem

A análise da microbiota foi realizada em 3 pools (cada pool: 15 camarões). Para a verificação da sanidade dos animais coletados, os camarões foram analisados para a detecção dos vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Os demais procedimentos e materiais se encontram detalhadamente descritos na secção de

## MATERIAL E MÉTODOS GERAL (Página 96).

**Figura 1.** Mapa de localização da área de coleta amostral do município do Eusébio, Ceará, Brasil.

Fonte: Mapas desenvolvidos pelo software ArcGIS 10.6

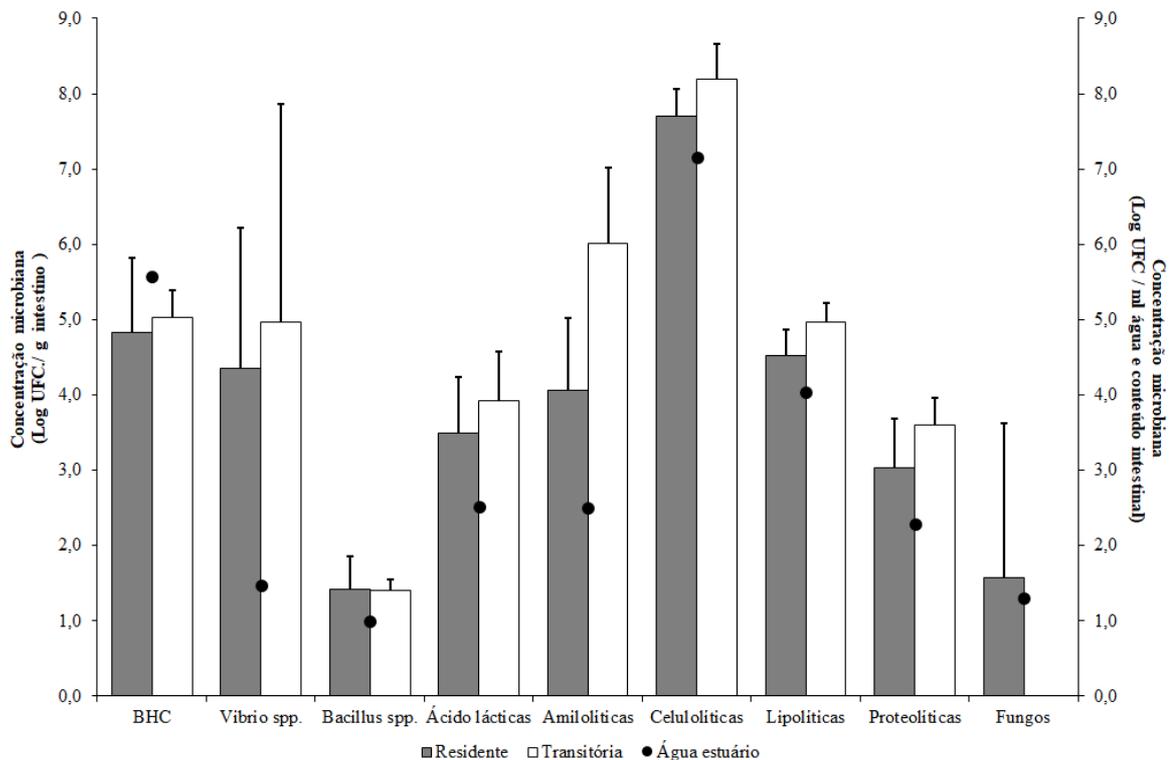
### 3. RESULTADOS

As contagens microbianas entre as classes residentes e transitórias não apresentaram variações significativas diante do teste do ANOVA – uma via (Gráfico 1). Mesmo assim, a microbiota bacteriana transitória exibiu contagens de colônias superiores às residentes. No entanto, a categoria dos *Bacillus* spp. mostrou pouca variação entre as duas classes estudadas (Gráfico 1).

Com relação às categorias de atividades enzimáticas analisadas, estas apresentaram as maiores contagens para o grupo das celulolíticas com uma média de  $8,57 \times 10^7$  UFC / g para a comunidade microbiana residente e  $2,87 \times 10^8$  UFC / mL para a comunidade microbiana transitória (Gráfico 1). Entre os gêneros de interesse, o grupo das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) exibiu um maior crescimento com uma média entre residentes e transitórias com  $3,61 \times 10^5$  UFC / g e  $2,87 \times 10^5$  UFC / mL, respectivamente (Gráfico 1). Sendo este o único grupo em que a contagem para a água do ambiente foi superior a contagem intestinal com  $3,70 \times 10^5$  UFC / mL (Gráfico 1).

Os fungos apresentaram um baixo crescimento na água do estuário com uma estimativa de 20 UFC / mL, ao contrário da maior contagem apresentada para as residentes com  $10^5$  UFC / g de intestino estimada e a ausência destes microrganismos para as transitórias (Gráfico 1).

**Gráfico 1** – Crescimento microbiano médio da microbiota residente e transitória no estuário do rio Pacoti (CE). N = 3 *pools* de 15 camarões. Cada barra = Log<sub>10</sub> da média UFC / g de intestino e Log<sub>10</sub> da média UFC / mL de conteúdo intestinal e água do ambiente, barra de erro= desvio médio padrão.



Fonte: Dados da pesquisa.

Dentre os 45 camarões amostrados, a análise de sanidade revelou que 21 indivíduos positivos para o vírus IMN com uma média de carga viral  $7,65 \times 10^3$  cópias de IMNV /  $\mu\text{g}$  RNA RT-qPCR e prevalência de 46,66%. Todas as amostras estavam livres do vírus WSS.

O processo de seleção e isolamento de colônias bacterianas para o sequenciamento foram executados com êxito. No entanto, o grupo das celulolíticas não apresentou crescimento ao serem transferidas para o meio de cultura de crescimento bacteriano geral. Não sendo possível assim, a identificação molecular das colônias individualizadas para esse grupo bacteriano específico.

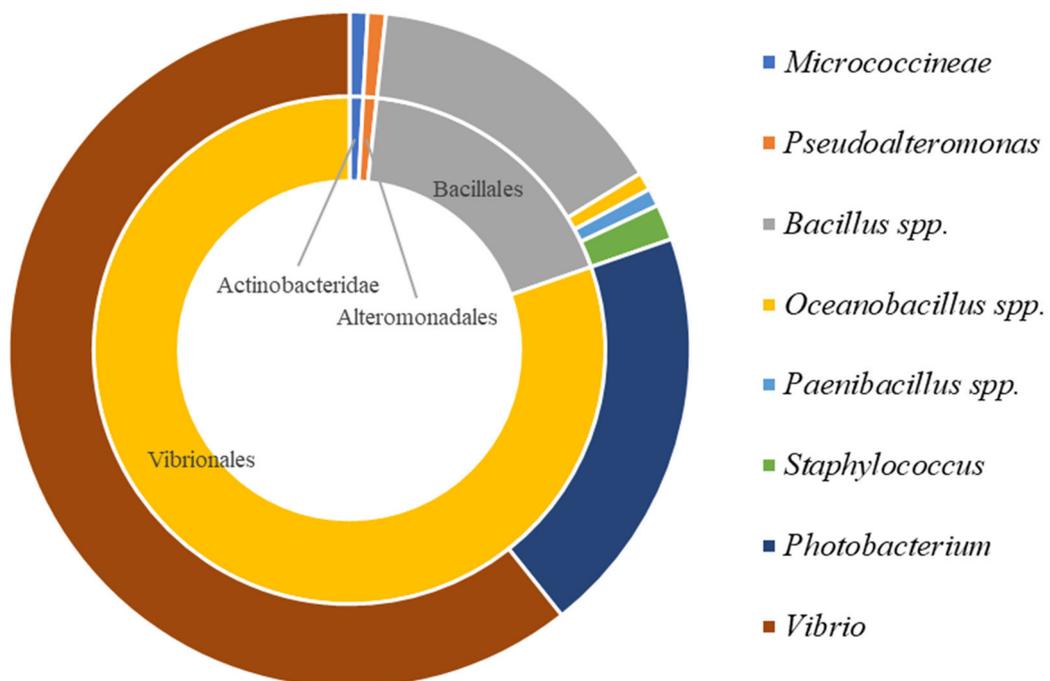
Para os demais grupos bacterianos foram obtidos no total de 130 sequências as quais foram editadas e submetidas ao banco de dados para identificação. As ordens dominantes encontradas foram as Vibrionales e Bacillales, junto a pequena proporção de Actinobacteridae e Alteromonadales (Gráfico 2). A classe Gammaproteobacteria foi dominante na maioria dos grupos estudados, com exceção para *Bacillus* spp., no qual foi representado através da classe Bacilli e uma pequena amostra pertenceu a classe da Actinobacteria (Gráfico 3).

Os gêneros bacterianos mais abundantes encontrados no intestino de camarões nativos em ambiente estuarino foram, em ordem decrescente: *Vibrio*, *Bacillus* e *Photobacterium*

(Gráfico 2 e 3). O gênero *Vibrio* foi identificado em todos os grupos bacterianos e o mais abundante entre as espécies bacterianas identificadas, exceto os *Bacillus* spp. (Gráfico 2, 4 e Anexo 4). Observou-se a grande predominância desse gênero para as lipolíticas. Em relação ao gênero *Bacillus* este apresentou em maior abundância para os grupos *Bacillus* spp., amilolítica, proteolítica, ácido láctica, lipolítica e BHC (Gráfico 4). O gênero *Photobacterium* se destacou quantitativamente nas ácido-lácticas, BHC e *Vibrio* (Gráfico 4).

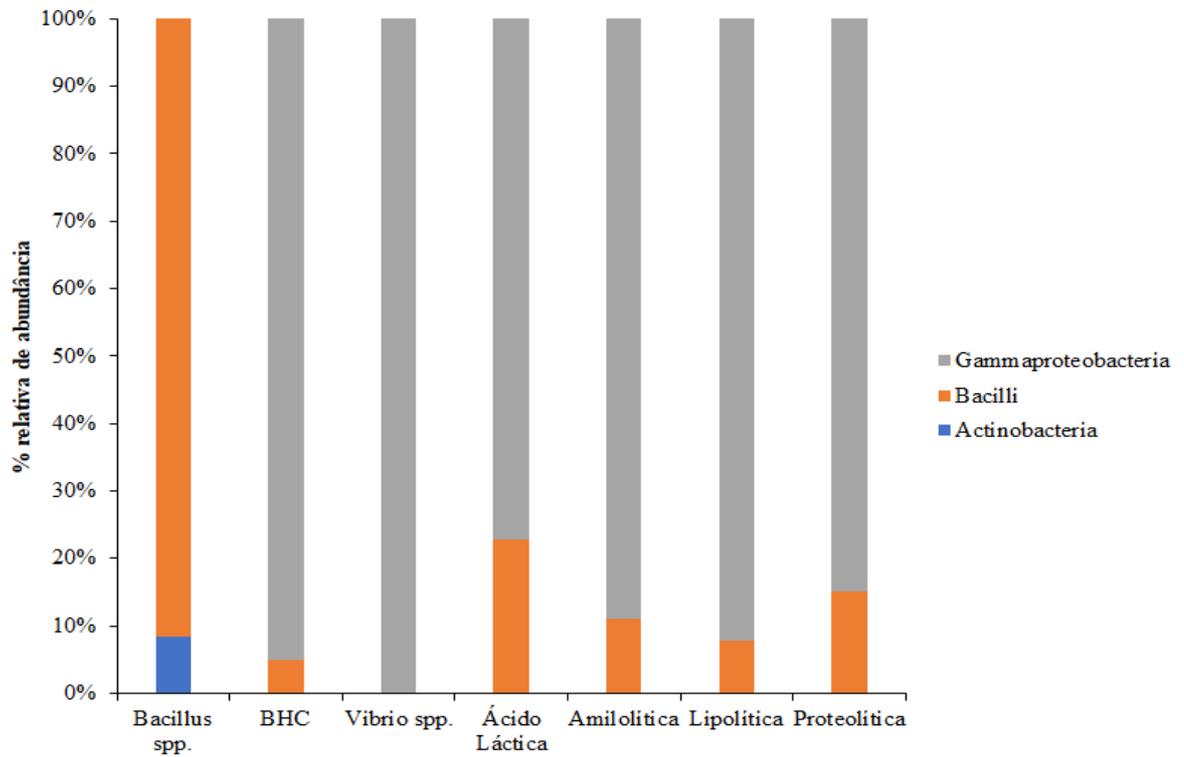
As homologias encontradas nas sequências identificadas mostram a diversidade das espécies no anexo 4. Além disso, essa variedade exibiu algumas espécies presentes na maioria dos grupos bacterianos estudados, como o *Vibrio natriegens*, *V. hepatarius*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyii* (Anexo 4). Como também, a identificação de espécies em menor proporção e identificadas em um só grupo, como por exemplo: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus sciuri* e *Micrococcus luteus* (Anexo 4).

**Gráfico 2** - Identificação de sequências a nível de gênero, de acordo com as classificações da base de dados do BLAST e RDP. O círculo interno representa as ordens identificadas e o círculo externo representa os gêneros.



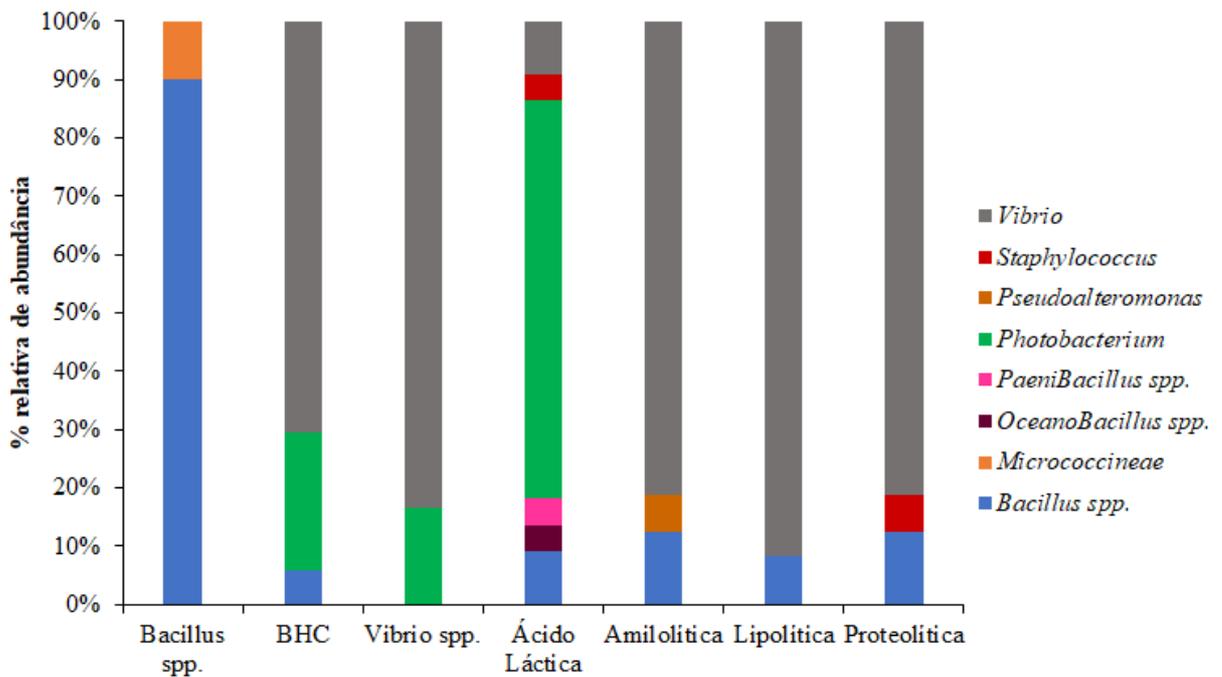
Fonte: Dados da pesquisa.

**Gráfico 3** – Porcentagem relativa de abundância bacteriana intestinal a nível de classe no ambiente estuarino.



Fonte: Dados da pesquisa.

**Gráfico 4** - Porcentagem relativa de abundância bacteriana intestinal a nível de gênero no ambiente estuarino.



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4. DISCUSSÃO

Em relação aos gêneros e aos grupos enzimáticos estudados, as bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) são os principais microrganismos em destaque no ambiente estuarino. O intestino do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* apresenta um perfil característico desse ambiente através do grande crescimento de bactérias degradadoras de celulose. Estes animais convivem com a presença de microorganismos oportunistas, como vibrios e fungos tanto na água quanto no intestino, além da presença do vírus IMN, sendo este o primeiro registro desse patógeno para o *F. brasiliensis* em ambiente estuarino no nordeste do Brasil.

As elevadas contagens de colônias bacterianas transitórias encontradas neste estudo são constatadas pelo fato da área de estudo ser delimitada por áreas estuarinas. Estes ambientes são caracterizados por serem ricos em biomassa, apresentam elevada produtividade primária e uma maior quantidade de substratos disponíveis no ambiente (KENNISH, 2002). Por causa dessas propriedades, há uma maior atividade de degradação microbiana nesses ambientes em relação aos demais ambientes marinhos (PUNITHA *et al.*, 2012). Além das flutuações de salinidade, temperatura, turbidez e os fatores biogeoquímicos e tróficos afetam as respostas microbianas no ambiente estuarino (TAM, 1998; PAERL *et al.*, 2006).

Valores aproximados entre as classes residentes e transitórias do grupo de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) reflete o papel biológico destes microrganismos no ambiente estuarino, pois essas bactérias realizam a ciclagem de nutrientes e carbono através da produção de biomassa bacteriana e da remineralização do carbono orgânico e nutrientes (GIORGIO; COLE, 1998). Por isso, o número elevado desta população pode ser utilizado como diagnóstico da poluição orgânica ambiental procedente do excesso de matéria orgânica. No entanto, não há um intenso fluxo de efluentes derivados de cultivos de camarões nas limitações onde foram realizadas as amostragens. Existem relatos de outros estudos os quais mostram que não foi observado essa tendência ao analisar o crescimento de bactérias heterotróficas em ambientes os quais recebiam efluentes de cultivo de camarão (SOUSA *et al.*, 2006).

A atividade celulolítica no ambiente aquático pode ser facilmente quantificada através da quebra da celulose por bactérias selecionadas em placas de crescimento seletivo (WOHL *et al.*, 2004). As elevadas contagens para o grupo das celulolíticas encontradas neste estudo podem estar relacionadas tanto para o ambiente, pois em áreas de influência de mangue são comuns a intensidade de microrganismos com essa capacidade decompositora, (BEHERA *et al.*, 2014), quanto para a influência do hábito alimentar (TZENG *et al.*, 2015). Os espécimes

estudados se encontravam ainda em fase de desenvolvimento, pois apresentaram tamanho e peso que os classificam como juvenis. Camarões juvenis apresentam característica alimentar de serem onívoros, consumindo uma grande quantidade de algas e fitoplâncton (FOCKEN *et al.*, 1998). A característica comum de hábito alimentar onívoro de camarões peneídeos (DALL *et al.*, 1990), assim como do *Farfantepenaeus brasiliensis* no seu ambiente natural, pode estar passível ao consumo de filamentos de algas, detritos orgânicos e entre outros componentes ricos em celulose (SOARES *et al.*, 2005). Contribuindo assim, para uma quantidade elevada de crescimento de bactérias que degradam celulose.

O não crescimento das cepas isoladas do grupo celulolítico pode ser atribuído a condições de estresse, muitas espécies de bactérias entram em modo de inanição do metabolismo ou um estado fisiologicamente viável, mas não cultivável (VNC) (RAMAMURTHY *et al.*, 2014). Como também, estudos anteriores afirmam que bactérias produtoras de celulases isoladas do ambiente estuarino indicam uma dependência complexa de vários fatores como pH, temperatura, alguns aditivos, indutores e entre outros (IMMANUEL *et al.*, 2006). Pode se afirmar que essas bactérias em questão, fora do ambiente natural, exigem uma condição de cultivo mais elaborado, uma fonte de celulose em todas as etapas de manipulação.

Uma das principais vias de disseminação de patógenos virais para o ambiente natural seria as trocas de água realizada por fazendas de cultivo de camarão, quando não há um devido tratamento da água (MACÍAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). A região do rio onde foi realizado a coleta de amostra não possui fazendas de cultivo de camarão. Mesmo assim, grande parte dos espécimes amostrados foram positivos ao IMNV o que reforça a presença do vírus no ambiente e sua característica endêmica no Nordeste (NUNES *et al.*, 2004).

Camarões infectados por patógenos virais podem proporcionar uma maior contaminação por bactérias patogênicas (SELVIN; LIPTON, 2003; PHUOC *et al.*, 2009). Um estudo recente relatou que a invasão do vírus WSSV no camarão *Litopenaeus vannamei* causa alteração na composição da microbiota intestinal (WANG, 2018). No entanto, o método de amostragem empregado não permitiu observar uma associação entre a carga viral e a microbiota intestinal neste estudo.

As comunidades bacterianas associadas na porção média do intestino do camarão nativo estavam de acordo com os resultados prévios relatados na literatura. A predominância das ordens Vibrionales e Bacillales; e da classe Gammaproteobacteria encontradas neste estudo foram consistentes com Rungrassamee *et al.*, 2014, 2016; Wang *et al.*, 2014 e Mongkol *et al.*, 2018.

A maior densidade de gêneros de pertencente aos *Vibrios* e *Photobacterium* tem sido comumente observado em muitas espécies de camarões marinhos em vários ambientes. A maior incidência de vibrios no intestino dos camarões do que na água, pode ser um indicio de maior suscetibilidade do animal aos patógenos oportunistas, (SUNG *et al.*, 2001; SHAKIBAZADEH *et al.*, 2009). Outros trabalhos evidenciam a dominância do gênero *Vibrio* spp. em camarões selvagens oriundos de ambientes estuarinos (OXLEY *et al.*, 2002; TZENG *et al.*, 2015).

A presença do gênero *Vibrio* na maioria dos grupos bacterianos estudados comprova sua ação multienzimática, como foi também relatado por TZUC *et al.*, 2014. Entre os gêneros identificados no grupo dos isolados em TCBS, a elevada incidência do gênero *Photobacterium* encontrada neste estudo apresenta uma relação bem próxima ao gênero *Vibrio* em termos de atividade virulenta aos organismos aquáticos marinhos (OXLEY *et al.*, 2002; BALCÁZAR *et al.*, 2006; IEHATA *et al.*, 2017; LABELLA *et al.*, 2017).

Algumas espécies de *Vibrio* identificadas na maioria dos grupos funcionais aqui estudados foram notificadas em pesquisas anteriores como patogênicas e não patogênicas ao camarão, como também a outros animais. O *Vibrio natriegens* é considerado patogênico para caranguejos cultivados na China (BI *et al.*, 2016). Além disso, existem relatos de vantagens destas bactérias por serem capazes de superar bactérias patogênicas na utilização de carbono em cultivo intensivo de camarões (LUIS-VILLASEÑOR *et al.*, 2015). O *Vibrio hepatarius* tem sido relatado como uma cepa candidata a probiótico em cultivos de camarões (BALCÁZAR *et al.*, 2009). As espécies identificadas neste estudo, como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyii* são consideradas patogênicas para a atividade aquícola (TZUC *et al.*, 2014; VINOJ *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017). Espécies relatadas como patogênicas para camarões (LIU *et al.*, 2016) também foram encontradas neste estudo para *Photobacterium leiognathi* e *Photobacterium damsela*.

A elevada presença de *Bacillus* neste experimento pode servir como uma importante aplicação de testes para probióticos, já que este gênero bacteriano é conhecido por aumentar a produção e a taxa de sobrevivência em cultivo de camarões (BALCÁZAR *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2009). Neste experimento, as espécies identificadas como *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. indicus*, *B. aquimaris* e *B. licheniformis* foram relatadas em estudos anteriores como espécies bacterianas comuns utilizadas em mix ou como cepas isoladas de probióticos em várias espécies de camarões marinhos, proporcionando o crescimento e estimulação do sistema imune (NIMRAT *et al.*, 2012; NAVINCHANDRAN *et al.*, 2014; NGO *et al.*, 2016, ABDOLLAHI-ARPAHAHI *et al.*, 2018).

Espécies como *Staphylococcus cohnii* e *S. sciuri* encontradas neste trabalho foram relatadas em alguns organismos marinhos, como peixes, pescada (*Macrodon ancylodon*) (CRISTINA *et al.*, 2017), em crustáceos como o *Penaeus notialis* (DABADÉ *et al.*, 2016). Uma função lítica para *Vibrio harveyi* foi exibida para a cepa aqui identificada como *Micrococcus luteus*, sendo esta bactéria isolada no sistema de cultivo do tipo bioflocos (BARCENAL; TRAI FALGAR; JR, 2015).

A presença de fungos apenas no intestino do camarão pode estar associada a competição com bactérias. Esses microorganismos frequentemente compartilham um substrato comum, e sua proximidade espacial em muitos ambientes leva a interações sinérgicas ou antagônicas. Nesse estudo, pode-se apontar uma relação antagônica diante da elevada contagem de fungos em comparação ao crescimento de vibrios na classe da microbiota residente. Estudos afirmam que esse caso pode ser atribuído à competição por substrato, como também pela oportunidade dos fungos de se estabelecerem antes da inoculação de bactérias (MILLE - LINDBLOM *et al.*, 2006).

Apesar de poucos relatos recentes sobre o papel ecológico dos fungos no meio marinho, estes organismos apresentam atributos biológicos e bioquímicos nos quais permitem utilizar vários substratos (BUGNI; IRELAND, 2004). Muitos são responsáveis pela reciclagem de nutrientes em habitats de manguezais, como também suportam elevadas salinidades e pouca quantidade de água (NAKAGIRI, 2002). Alguns estudos evidenciam a presença de fungos no estuário e intestino de camarões selvagens, como também foi encontrado nesta pesquisa (KIMURA *et al.*, 2002; FERNAND *et al.*, 2017).

## 5. CONCLUSÃO

A comunidade microbiana da água do estuário do rio Pacoti está sob uma forte carga de matéria orgânica, sendo este indicado pelo elevado crescimento de bactérias heterotróficas na água em comparação com o intestino do camarão nativo *Farfantepenaeus brasiliensis*. Este animal ainda em fase juvenil apresenta um perfil microbiano intestinal sob forte influência do ambiente estuarino com uma elevada concentração de bactérias celulolíticas e BHC. Além disso, vibrios identificados como oportunistas e patogênicos ao camarão foram onipresentes em todo o estudo, em contraste com a presença de fungos fixados no tecido intestinal do animal que estava sob infecção viral pelo IMN, patógeno este primeiramente relatado em ambiente estuarino no estado do Ceará.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-ARPAHAHI, D.; SOLTANI, E.; JAFARYAN, H.; SOLTANI, M. *et al.* Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immuno-physiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, 2018. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.06.082
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I. DE; RUIZ-ZARZUELA, I.; *et al.* The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3–4, p. 173–186, 2006. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009
- BALCÁZAR, L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, D. P. 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**, v. 96, n. 2007, p. 147–150, 2007. doi: 10.1016/j.jip.2007.04.008
- BALCÁZAR, J. L.; DECAMP, O.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 18, p. 65-70, 2006. doi: 10.1080/08910600600799497
- BARCENAL, A. R. B.; TRAI FALGAR, R. F. M.; JR, V. L. C. Anti- *Vibrio harveyi* Property of *Micrococcus luteus* Isolated from Rearing Water under Biofloc Technology Culture System. **Current Research in Bacteriology**. v. 8, p. 26–33, 2015. doi: 10.3923/crb.2015.26.33.
- BEHERA, B.C.; PARIDA, S.; DUTTA, S. K.; THATOI, H.N. Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability. **American Journal of Microbiological Research**, v. 2, p. 41-46, 2014. doi: 10.12691/ajmr-2-1-6.
- BRAGA, A. L.; LOPES, D. L. A.; KRUMMENAUER, D.; POERSCH, L. H.; JR, W. A. Comparison of the Reproductive Performance of the Wild Pink Shrimp Species *Farfantepenaeus paulensis* and *Farfantepenaeus brasiliensis* in Captivity. **Journal of Shellfish Research**, v. 30, n. 3, p. 963–967, 2011. DOI: 10.2983/035.030.0339
- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143–163, 2004. DOI: 10.1039/b301926h
- CRISTINA, R.; ALVES, B.; FIGUEREDO, H. M.; SANTOS, R.; FÁTIMA, L. DE; LOURENÇO, H. Identification of intestinal microbiota and microbiological quality of the king weakfish (*Macrodon ancylodon*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, p. 1184–1190, 2017. DOI: 10.5897/AJMR2016.8086.
- DABADÉ, D. S.; WOLKERS-ROOIJACKERS, J. C. M.; AZOKPOTA, P.; HOUNHOUGAN, D. J.; ZWIETERING, M. H.; NOUT, M. J. R.; DEN BESTEN, H. M. W. Bacterial concentration and diversity in fresh tropical shrimps (*Penaeus notialis*) and the surrounding brackish waters and sediment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 218, p. 96–104, 2016. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.013.
- DALL, W., HILL, B.J., ROTH LISBERG, P.C., STAPLES, D.J. Biology of the Penaeidae. *In*: \_\_\_\_\_. **Advances in Marine Biology**. London, UK: Academic Press, 1990, v. 27, p. 21-29.

DIAS-NETO, J. **Proposta de plano nacional de gestão para o uso sustentável de camarões marinhos no Brasil**. Brasília: MMA/IBAMA, 2011.

EMERENCIANO, M.; BALLESTER, E. L. C.; CAVALLI, R. O.; WASIELESKY, W. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* ( Latreille , 1817 ). **Aquaculture Research**, v. 43, p. 447–457, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x

EMERENCIANO, M.; MIRANDA-BAEZA, A.; MART, L. R.; MART, M. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. **Reviews in Aquaculture**, v. 7, p. 131–148, 2015. DOI: 10.1111/raq.12058

FERNAND, M. G.; ROULLIER, C.; GUITTON, Y. *et al.* Fungi isolated from Madagascar shrimps - investigation of the *Aspergillus niger* metabolism by combined LC-MS and NMR metabolomics studies. **Aquaculture**, v. 479, p. 750-758, 2017. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.015

FOCKEN, U., GROTH, A., COLOSO, R.M., BECKER, K. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon Fabricius* in a semi-intensive pond system in the Philippines. **Aquaculture**, v. 164, p. 105–116, 1998.

GIORGIO, PAUL A. DEL; COLE, JONATHAN J. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 29, p. 503–41, 1998.

GILMAN, E. L.; ELLISON, J.; DUKE, N. C.; FIELD, C. Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. **Aquatic Botany**, v. 89, p. 237–250, 2008. DOI: 10.1016/j.aquabot.2007.12.009

HOSTINS, B.; DIOGO, B. A.; LOPES, L. A.; WASIELESKY, W.; POERSCH, H. Effect of temperature on nursery and compensatory growth of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* reared in a super-intensive biofloc system. **Aquacultural Engineering**, 2015. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.07.036

IEHATA, S., MAT DERIS, Z., IKHWANUDDIN, M., WONG, L.L. Characterization of gutbacterial diversity of wildbroodstock of *Penaeus monodon* and *Fenneropenaeus merguensis* using PCR-DGGE. **AAFL Bioflux**, v. 10, p. 465–474, 2017.

IMMANUEL, G.; DHANUSHA, R.; PREMA, P.; PALAVESAM, A. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, v. 3, p. 25-36, 2006. doi: 10.1007/BF03325904

KENNISH, M. J. Environmental threats and environmental future of estuaries. **Environmental Conservation**, v. 29, p. 78-107, 2002. doi: 10.1017/S0376892902000061

KIMURA, H.; HARADA, K.; HARA, K.; TAMAKI, A. Enzymatic approach to fungal association with arthropod guts: A case study for the crustacean host, *Nihonotrypaea harmandi*, and its foregut fungus, *Enteromyces callianassae*. **Marine Ecology**, v. 23, n. 2, p. 157–183, 2002. DOI: 10.1046/j.1439-0485.2002.02778.x

LABELLA, A. M.; DAVID, R. A.; DOLORES, C.; MANUEL, L. L.; JUAN, J. B. Revisiting the genus *Photobacterium*: taxonomy, ecology and pathogenesis. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 20, p. 1 - 10, 2017. doi: 10.2436/20.1501.01.280.

LI, K.; LIU, L.; CLAUSEN, J. H.; LU, M.; DALSGAARD, A. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis* spp.) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. **Aquaculture**, v. 457, p. 91–99, 2016. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.008

LOPES, L. D. DE A.; JUNIOR, W. W.; BALLESTER, E. C.; PEIXOTO, S. R. M. Análise comparativa da criação dos camarões-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis* criados em gaiolas em ambiente estuarino. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1540–1546, 2009.

LUIS-VILLASEÑOR, I. E.; VOLTOLINA, D.; AUDELO-NARANJO, J. M.; et al. Effects of biofloc promotion on water quality, growth, biomass yield and heterotrophic community in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) experimental intensive culture. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 3, p. 332–337, 2015. DOI: 10.4081/ijas.2015.3726

MACÍAS-RODRÍGUEZ, N. A.; MAÑÓN-RÍOS, N.; ROMERO-ROMERO, J. L.; et al. Prevalence of viral pathogens WSSV and IHNV in wild organisms at the Pacific Coast of Mexico. **Journal of INVERTEBRATE PATHOLOGY**, v. 116, p. 8–12, 2014. DOI: 10.1016/j.jip.2013.11.002

MILLE - LINDBLOM, C.; FISCHER, H; TRANVIK, L. J. Antagonism between bacteria and fungi: substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. **OIKOS**, v. 113, p. 233-242, 2006. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14337.x

MONGKOL P., BUNPHIMPAPHA P., RUNGRASSAMEE W., et al. Bacterial community composition and distribution in different segments of the gastrointestinal tract of wild - caught adult *Penaeus monodon*. **Aquaculture Research**, v. 48, p. 378 - 392, 2018. doi: 10.1111/are.13468

NAKAGIRI, A. *Halophytophthora* species from tropical and subtropical mangroves: A review of their characteristics. In: \_\_\_\_\_. **Fungi in Marine Environments**, ed. K. D. Hyde, Fungal Diversity Press, Hong Kong, 2002.

NAVINCHANDRAN, M.; IYAPPARAJ, P.; MOOVENDHAN, S.; et al. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**, 2014. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.10.004.

NGO, H. T.; NGUYEN, T. T. N.; NGUYEN, Q. M.; TRAN, A. V.; DO, H. T. V.; NGUYEN, A. H., PHAN, T. N. AND NGUYEN, A. T. V. Screening of pigmented *Bacillus aquimaris* SH6 from the intestinal tracts of shrimp to develop a novel feed supplement for shrimp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 1357–1372, 2016. DOI: 10.1111/jam.13274.

NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T. AND VUTHIPHANDCHAI, V. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Veterinary Microbiology**, v. 159, p.

443–450, 2012. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.04.029.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37–57, 2004.

OXLEY, A. P., W. SHIPTON, L. OWENS, AND D. MCKAY. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 214-223, 2002. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01673.x

PAES-OSUNA, F. The Environmental Impact of Shrimp Aquaculture : Causes, Effects, and Mitigating Alternatives. **Environmental Management**, v. 28, n. 1, p. 131–140, 2005. DOI: 10.1007/s002670010212

PAERL, H. W.; VALDES, L. M.; PEIERLS, B. L. Anthropogenic and climatic influences on the eutrophication of large estuarine ecosystems. **Limnology and Oceanography**, v. 51, 448-462, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1\\_part\\_2.0448](https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0448)>. Acesso em 15 out 2018.

PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C.; et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, n. 1–2, p. 61–68, 2009. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.004

PUNITHA, A.; BASIL-ROSE, M. R.; WINS, J. ALBINO; SHOBA, S. P.; S. BAI, M. M. Studies on amylase activity of an amylolytic bacterium isolated from estuarine soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 10015-10020, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.064>>. Acesso em 15 out 2018.

RAMAMURTHY, T.; GHOSH, A.; PAZHANI, G. P.; SHINODA, S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 103, 2014. doi: 10.3389/fpubh.2014.00103

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; CHAIYAPECHARA, S. Characterization of Intestinal Bacteria in Wild and Domesticated Adult Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91853, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091853

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; KAROONUTHAISIRI, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 12–19, 2016. doi: 10.1016/j.jip.2015.11.004

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRON-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 561–570, 2000. doi: 10.1016/j.aquaeng.2004.09.001

SELVIN, J.; LIPTON, A. P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 57, p. 147–150, 2003. doi: 10.3354/dao057147

SHAKIBAZADEH, S.; SAAD, CHE ROOS; CHRISTIANUS, A. et al. Bacteria flora associated with different body parts of hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*, tanks water and sediment. **Annals of Microbiology**, v. 59, p. 425-430, 2009. doi: 10.1007/BF03175126

SOARES, R.; PEIXOTO, T. S.; WASIELESKY, W.; D'INCAO, F. Feeding rhythms and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 322, p. 167–176, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.02.019>>. Acesso em 17 out 2018.

SOUSA, O. V.; MACRAE, A.; MENEZES, F. G. R.; GOMES, N. C. M. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006. doi: 10.1016/j.marpolbul.2006.07.006

SOUZA, D. M. DE; SUITA, S. M.; PEREIRA, F.; *et al.* The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 1828–1837, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02992.x

SUNG, HUNG-HUNG; HSU, SHI-FANG; CHEN, CHIH-KUN; TING, YUN-YUAN; CHAO, WEI-LIANG. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, v. 192, p. 101–110, 2001. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00458-0

TAM, N.F.Y. Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. **Environmental Pollution**, v. 102, p. 233±242, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00084-0)>. Acesso em 25 out 2018.

TZENG, T.; PAO, Y.; CHEN, P.; WENG, F. C. Effects of Host Phylogeny and Habitats on Gut Microbiomes of Oriental River Prawn (*Macrobrachium nipponense*). **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132860, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0132860

TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; ROJAS HERRERA, R.; GAXIOLA CORTÉS, G.; ORTIZ, M. L. A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, p. 280, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4062704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 dez 2017.

VAN DER WAIJ, D. Selective Gastrointestinal Decontamination History of recognition and measurement of colonization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastrointestinal decontamination. **Epidemiology and Infection**, v. 109, p.315-26, 1992. doi: 10.1017/S0950268800050317

VIAU, E.; SOUZA, D. M. DE; RODR, E. M.; *et al.* Biofilm feeding by postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda, Penaeidae). **Aquaculture Research**, v. 44, p. 783–794, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03087.x

VINOJ, G.; VASEEHARAN, B.; THOMAS, S.; SPIERS, A. J.; SHANTHI, S. Quorum-Quenching Activity of the AHL-Lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 Inhibits *Vibrio* Biofilm Formation In Vitro and Reduces Shrimp Intestinal Colonisation and Mortality. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 707–715, 2014. doi: 10.1007/s10126-014-9585-9

WANG, P. H.; HUANG, T.; ZHANG, X.; HE, J. G. Antiviral defense in shrimp: From innate immunity to viral infection. **Antiviral Research**, v. 108, n. 1, p. 129–141, 2014. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.05.013

WANG, W.; ZHANG, X. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 5, p. 522–527, 2008. doi: 10.1016/j.fsi.2008.07.016

WOHL, DEBRA L.; ARORA, S.; GLADSTONE, J. R. Functional redundancy supports biodiversity an ecosystem function in a closed and constant environment. **Ecology**, v. 85, p. 1534–1540, 2004. doi: 10.1890/03-3050

WONG. SANDI; RAWLS, J. F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 3100–3102, 2012. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05646.x

ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality , survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, n. 3–4, p. 349–353, 2009. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.046

## MATERIAIS E MÉTODOS GERAL

Essa seção descreve os procedimentos microbiológicos e moleculares adotados para os respectivos três capítulos apresentados nesse estudo.

- **Insensibilização dos animais, separação da microbiota transitória e residente, coleta de água e amostragem para detecção viral**

Os camarões foram insensibilizados por choque térmico em banho de gelo e a porção média do intestino foi removido assepticamente. Para análises diferenciais da microbiota transitória e residente, o conteúdo intestinal foi retirado delicadamente com o auxílio de espátulas e o tecido foi então lavado sequencialmente em água destilada e álcool 70% para a retirada de resíduos e restos do conteúdo. As amostras biológicas foram homogeneizadas e diluídas em água do mar com salinidade ajustada para 10 g.L<sup>-1</sup>. Foram feitas diluições seriadas até 10<sup>-5</sup>.

Amostras de água dos cultivos também foram coletadas em garrafas esterilizadas de vidro âmbar de 1 L, diluídas e submetidas à análise microbiológica.

Amostras de hemolinfa (aprox. 150 µL) foram coletadas em solução anti-coagulante SIC-EDTA (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7,2) para o diagnóstico do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e o pleópodo direito do quinto segmento abdominal para o diagnóstico do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

- **Cultivo dos microrganismos**

Alíquotas de amostras diluídas foram inoculadas em meios de cultura específicos para crescimento dos microrganismos alvo descritos abaixo (Tabela 1). Todas as análises foram feitas em duplicata e os meios preparados usando água do mar (10 ‰) como diluente com exceção do meio Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bile Sacarose), o qual foi diluído em água destilada. As alíquotas das amostras foram inoculadas nos meios de cultivo através das técnicas de semeadura em profundidade (*Pour-Plate* – 1 mL) e espalhamento (*Spread-Plate* – 200 µL). Após incubação em condições (tempo e temperatura) adequadas para cada grupo microbiano foram feitas contagens pelo método de Contagem Padrão em Placas (MATURIN; PEELER, 2001). Os resultados das contagens foram expressos UFC.g<sup>-1</sup> de intestino e UFC.ml<sup>-1</sup> de água.

As bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), gêneros bacterianos de interesse *Vibrio* e *Bacillus* e grupos enzimáticos funcionais (ácido-lácticas, proteolíticas, lipolíticas, amilolíticas e celulolíticas) foram quantificados.

**Tabela 1.** Condições de cultivo e técnicas utilizadas para o crescimento bacteriano de gêneros específicos e atividade enzimática no intestino do *Litopenaeus vannamei*.

Organismo alvo	Meio de cultura	Técnica de inoculação e alíquota	Condições de cultivo	Referência
<i>Bacillus</i> spp.	Agar Contagem de Placas (PCA)	200 µL, <i>Spread-Plate</i>	72 h-30°C	Defoirdt <i>et al.</i> (2011)
Bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC)	Agar Contagem de Placas (PCA)	1mL, <i>Pour-Plate</i>	24 a 48 h-30°C	APHA (2000)
<i>Vibrio</i> spp.	TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose)	200 µL, <i>Spread-Plate</i>	48 h-30°C	Noguerola; Blanch (2008)
Amilolíticas	Agar + Amido	1mL, <i>Pour-Plate</i>	2 a 5 dias-30°C	West; Colwell (1984)
Ácido lácticas	Agar MRS (Agar Man, Rogosae Sharpe)	1mL, <i>Pour-Plate</i>	48h-35°C	Ramírez <i>et al.</i> (2013)
Proteolíticas	Agar-leite	200 µL, <i>Spread-Plate</i>	72 h-30°C	Sizemore e Stevenson (1970)
Lipolíticas	Bactopeptona, CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O, agar, Tween 80	200 µL, <i>Spread-Plate</i>	72 h-30°C	Sierra (1957)
Celulolíticas	Agar, meio mineral, carboximetilcelulose	200 µL, <i>Spread-Plate</i>	72 h-30°C	Luczkovich e Stellwag (1993)
Fungos	Agar Batata Dextrose, (PDA), Ácido tartárico, Ampicillina	200 µL, <i>Spread-Plate</i>	5 dias / 28°C	Soares <i>et al.</i> (1991)

- **Extração de DNA/RNA total e síntese de fita simples de cDNA**

- ❖ **Capítulo 1 e 3**

O DNA total foi extraído de amostras do pleópodos de acordo com o protocolo padrão de digestão de Proteinase K seguido por extração fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (SAMBROOK *et al.* 1989). Os hemócitos de cada camarão foram isolados do plasma por centrifugação 1.200 g por 10 min a 4°C e o RNA total extraído com o reagente Trizol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com DNase I por incubação a 37°C por 15 min, seguido por sua inativação a 65°C por 10 min e sua concentração foi determinada por quantificação fluorimétrica usando o kit Qubit™ Quantification Assay (Invitrogen®). O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 20 µl de reação final contendo 2 µl de RT Buffer (10×), 0,8 µl de dNTPs mix (25×), 2 µl de RT random primers (10×), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µg de RNA total. As amostras foram incubadas em termociclador a 25°C/10min, seguidos de 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. O cDNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização para as análises de quantificação viral por PCR em Tempo Real.

- **qPCR**

- ❖ **Capítulo 1 e 3**

O método TaqMan foi utilizado de acordo com a metodologia aplicada por Feijó *et al.* (2013) para a quantificação do número de cópias para dois vírus: da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), sendo utilizado primers e sondas descritos por Andrade *et al.* (2007); Poulos e Lightner (2006), respectivamente. Todas as reações de qPCR para detecção de IMNV e WSSV foram realizadas em um volume final de 10 µL contendo 5 µL de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen®), 0,3 µl (10 µM) de cada primer (Tabela 2), 0,15 µl (10µM) da sonda de hidrólise Taqman (Tabela 1), 0,2 µl (50×) ROX, 1 µl (100 ng) de cDNA, para detecção de IMNV, 1 µl (100 ng) de DNA para detecção de WSSV e 3,05 µl de água ultrapura (Invitrogen®). Uma série de diluições dos controles positivos clonais para ambos os vírus (pTOPO-IMNV e pTOPO-WSSV), correspondendo a 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, foram incluídas em cada termociclagem para construção de uma curva padrão de quantificação.

**Tabela 2.** Sequências de primers e sondas Taqman para PCR em tempo Real (RT-PCR) usados para a detecção do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e da síndrome da mancha branca (WSSV) nos ambientes de cultivo SAV.

Oligo ID	Sequência 5' - 3'	Amplicon
IMNV412F (RT-PCR)	GGACCTATCATACATAGCGTTTGCA	134 pb
IMNV545R (RT-PCR)	AACCCATATCTATTGTC GCTGGAT	
TaqManprobe (IMNV)	6FAM-CCACCTTTACTTT CAATACTACATCATCCCCGG-TAMRA	
WSSV (qPCR) Forward	GCCCTCTCGCCTTTGATTTC	61 pb
WSSV (qPCR) Reverse	TCGGCGTTCTTTTCTTCGA	
TaqManprobe (WSSV)	FAM-TTCTGTCAAAGGGAGATAC-TAMRA	

Fonte: Andrade *et al.* (2007), Poulos e Lightner (2006).

A plataforma 7500 Real-Time PCR system (AppliedBiosystems®) foi utilizada para a determinação do número de cópias virais, obedecendo os seguintes parâmetros de amplificação: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polymerase a 95°C por 2 min, 40 ciclos de 15s a 95°C e 30s a 60°C e uma extensão final de 60°C. O número de cópias virais de cada amostra foi determinado de acordo com o *software SDS* 1.3.1 (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

- **Extração de DNA e PCR convencional (*Nested-PCR*)**

- ❖ **Capítulo 2**

Os processos para extração de DNA e a detecção do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) foram realizados em uma amostra de 15 animais para cada ambiente no Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura / UFSC através do método de PCR convencional em duas etapas (*Nested-PCR*) de acordo com as normas indicadas pela OIE (2009). A primeira etapa de reação de PCR foi realizada em um volume final de 100 µL, contendo: tampão 1X (10 mM Tris / HCl, pH 8.8), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,1 uM de cada primer (Tabela 2) e 2 unidades Taq DNA polimerase e 1 µl (0,1 - 0,3 µg) de DNA. A segunda etapa foi realizada em um mesmo volume final, contendo a mesma composição de PCR e os respectivos primers para esta segunda etapa (Tabela 3). As duas etapas foram submetidas a condições de amplificação de desnaturação de 94°C por 4 minutos, 55°C por 1

minuto, 72°C por 2 minutos, seguidos por 39 ciclos de desnaturação de 94°C por 1 minuto, anelamento de 55°C por 1 minuto e extensão 72°C, finalizando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR (10 µL) obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para serem visualizados.

**Tabela 3.** Sequências de primers de PCR convencional (*nested*) usados para a detecção do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) nos ambientes de cultivo em Bioflocos (BFT) e água Clara (AC).

Oligo ID	Sequência 5'-3'	Amplicon
146F1 (PCR-WSSV)	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1447 pb
146R1 (PCR-WSSV)	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA	
146F2 ( <i>Nested PCR</i> -WSSV)	GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA	941 pb
146R2 ( <i>Nested PCR</i> -WSSV)	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	

Fonte: OIE (2009)

- **Extração do DNA genômico bacteriano**

O DNA genômico foi extraído do crescimento bacteriano *overnight* em caldo Luria Bertani em água do mar (20 g L<sup>-1</sup>) sob agitação em 120 rpm a 35°C. Antes do processo de lise da parede celular, alguns passos foram adicionados. A solução de crescimento de cada cepa foi centrifugada 13.000 g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado para a formação do *pellet*. Logo em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de EDTA (50 mM) e lisoenzima (2 mg.ml<sup>-1</sup>) e mantido em banho-maria a 37°C por 60 min. A partir deste ponto, utilizamos o protocolo proposto Wizard® SV Genomic DNA Purification System de acordo com as normas do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% intercalada por Gel Red TM Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®). A quantificação do DNA genômico foi medida pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (THERMO SCIENTIFIC).

- **Identificação das cepas bacterianas**

As regiões hipervariáveis V6 – V8 (430 pb) do gene 16S RNAr bacteriano foi amplificado utilizando primers universais Forward: U968 - AAC GCG AAG AAC CTT AC e Reverse: L1401 - CGG TGT GTA CAA GAC CC (NÜBEL *et al.* 1996) em um volume final de 12,5 µL contendo: 1x PCR Buffer (10 mM, Tris-HCL, pH 8,3), 0,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,016 mM

de DNTP, 0,08 pmol de cada primer e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 50 a 100 ng de DNA. As condições de ciclagem da PCR foram submetidas a uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguidos por ciclos de desnaturação de 94°C por 60 segundos, anelamento de 52°C por 60 segundos e extensão de 72°C por 60 segundos para um total de 30 ciclos e uma extensão final de 72°C por oito minutos. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1,5% e sequenciados utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit por meio de eletroforese capilar ABI3500 Genetic Analyser (APPLIED BIOSYSTEMS, CA, USA.).

As sequências obtidas foram analisadas e editadas usando o programa Geneious versão 10.3 (KEARSE *et al.*, 2012) e comparada ao banco de dados RDP (Ribosomal Database Project) (COLE *et al.*, 2014), utilizando as opções Seqmacth e Classifier para a determinação dos índices de similaridade e do S-ab score para seleção de sequências com valores próximos a 1 e o nível de confiança de 80% para o estabelecimento do threshold (WANG *et al.*, 2007). Além disso, as sequências foram submetidas a base de dados Nucleotide Blast (MORGULIS *et al.*, 2008) para a seleção de sequências com o maior índice de identidade ( $\geq 90\%$ ) e E-value próximo a zero. As sequências foram alinhadas e utilizadas na construção de dendograma mediante o algoritmo de agrupamento Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), o modelo de substituição de Kimura-2-parameter (KIMURA, 1980) e o teste de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 repetições através do software MEGA7 (KUMAR *et al.*, 2016).

Análise de variância unifatorial (ANOVA – one way) foi usado para testar diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre a microbiota residente e transitória comparando os grupos funcionais cultiváveis, como também entre os ambientes estudados.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. P. D. ; SRISUVAN, T. ; TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, p. 9–15, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.030>>. Acesso em: 15 out. 2017.

APHA – American Public Health Association (2000) **Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater**. Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. and Eaton, A. D. (20th ed.), APHA/AWWA/WEF, p. 1–10. Disponível em: <<https://nla.gov.au/anbd.bib-an22987801>>. Acesso em: 19 de out. 2017.

COLE, J. R.; Q. WANG, J. A.; FISH, B.; CHAI, D. M.; MCGARRELL, Y.; SUN, C. T.; BROWN, A.; PORRAS-ALFARO, C. R.; KUSKE; J. M. T. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucl Acids Res**, v. 42, p.D633–D642, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1244

DEFOIRDT, T.; THANH, D. L; DELSEN, V. B.; DE SCHRYVER, P.; SORGELOOS, P.; BOON, N.; BOSSIER, P. N-acylhomoserine lactone-degrading *Bacillus* strains isolated from aquaculture animals. **Aquaculture**, v. 311, p. 258-260, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.046>>. Acesso em: 10 jan 2018.

FEIJÓ, R. G.; KAMIMURA, M. T.; OLIVEIRA-NETO, J. M.; VILA-NOVA, C. M. V. M.; GOMES, A. C. S.; COELHO, M. DAS G. L.; VASCONCELOS, R. F.; GESTEIRA, T. C. V; MARINS, L. F.; MAGGIONI, R. Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 380–383, p. 1–5, 2013. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.11.026

FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

KEARSE, M.; MOIR, R., WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1647–1649, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199

KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016. doi: 10.1093/molbev/msw054

LUCZKOVICH, J. J.; STELLWAG, E. J. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish, *Lagodon rhomboides* : size-related changes in diet and microbial abundance. **Marine Biology**, v. 116, p. 381–388, 1993.

MATURIN L.; PEELER, J. T. (2001) **Aerobic Plate Count**. In: Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online, 8th Chapter 3. Edition, Silver Spring, Berlin. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063346.htm>>. Acesso em 16 oct. 2017.

MORGULIS A.; COULOURIS G.; RAYTSELIS Y.; MADDEN T.L.; AGARWALA R.; SCHÄFFER A. A. Database indexing for production MegaBLAST searches. **Bioinformatics**, v. 15, p. 1757-1764, 2008. doi: 10.1093/bioinformatics/btn322

NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 175–185, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03730.x.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKÉ, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H.; ENGELEN, B.; FELSKÉ, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636–5643, 1996.

OIE (Office International de Epizooties) (2009). Manual of diagnostic tests for aquatic animal diseases. **6<sup>th</sup> Ed. World Organization for Animal Health**. Paris, France. 383.

POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, p. 69–72, 2006. doi: 10.3354/dao073069.

RAMÍREZ, N. B., SEIFFERT, W. Q., VIEIRA, N. AND PEDREIRA, J. L. Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. **Pesq agropec bras**, 48, p. 913–919, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800015>> Acessado em 20 out. 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) **Molecular cloning : a laboratory manual**, 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, p. 15–22, 1957.

SIZEMORE, R. K.; STEVENSON, L. H. Method for the isolation of proteolytic marine bacteria. **Applied microbiology**, v. 20, p. 991–992, 1970.

SOARES, Juarez Braga; CASIMIRO, Renato; ALBUQUERQUE, Laurênia Maria Braga de. **Microbiologia básica**. 2. ed. rev. e ampl. Fortaleza: Edições UFC, 1991. 180 p.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental**

**Microbiology**, v. 73, p. 5261–5267, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00062-07

WEST, P.A.; COLWELL, R.R. (1984). **Identification and classification of Vibrionaceae - an overview**. In *Vibrios in the Environment*, R.R. Colwell (Editor), John Wiley, New York, p. 285-363.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos capítulos apresentados, esta pesquisa apresenta perfis de comunidades microbianas intestinais de diferentes espécies camarões sob condições de cultivo e natural. Esse estudo concluiu que a composição microbiana associada a animais livres ou infectados pelo vírus IMNV é similar, exibindo diferentes abundâncias relativas nos respectivos ambientes estudados.

As comunidades bacterianas na porção média do intestino de camarões apresentam as maiores densidades para o conteúdo intestinal. Apesar do maior número de bactérias residentes para o grupo bacteriano amilolítico no ambiente de água verde. Evidenciado uma maior fonte de reserva carboidrato diante da sua elevada atividade de degradação. Além disso, as maiores atividades enzimáticas em todos os ambientes foram registradas para os grupos lipolíticos, amilolíticos, BHC e celulolíticos. A produção de celulases é destaque para o ambiente estuarino. Esses casos devem abrir novas abordagens de pesquisas relacionadas a questões nutricionais para camarões submetidos a condições de cultivo semelhantes.

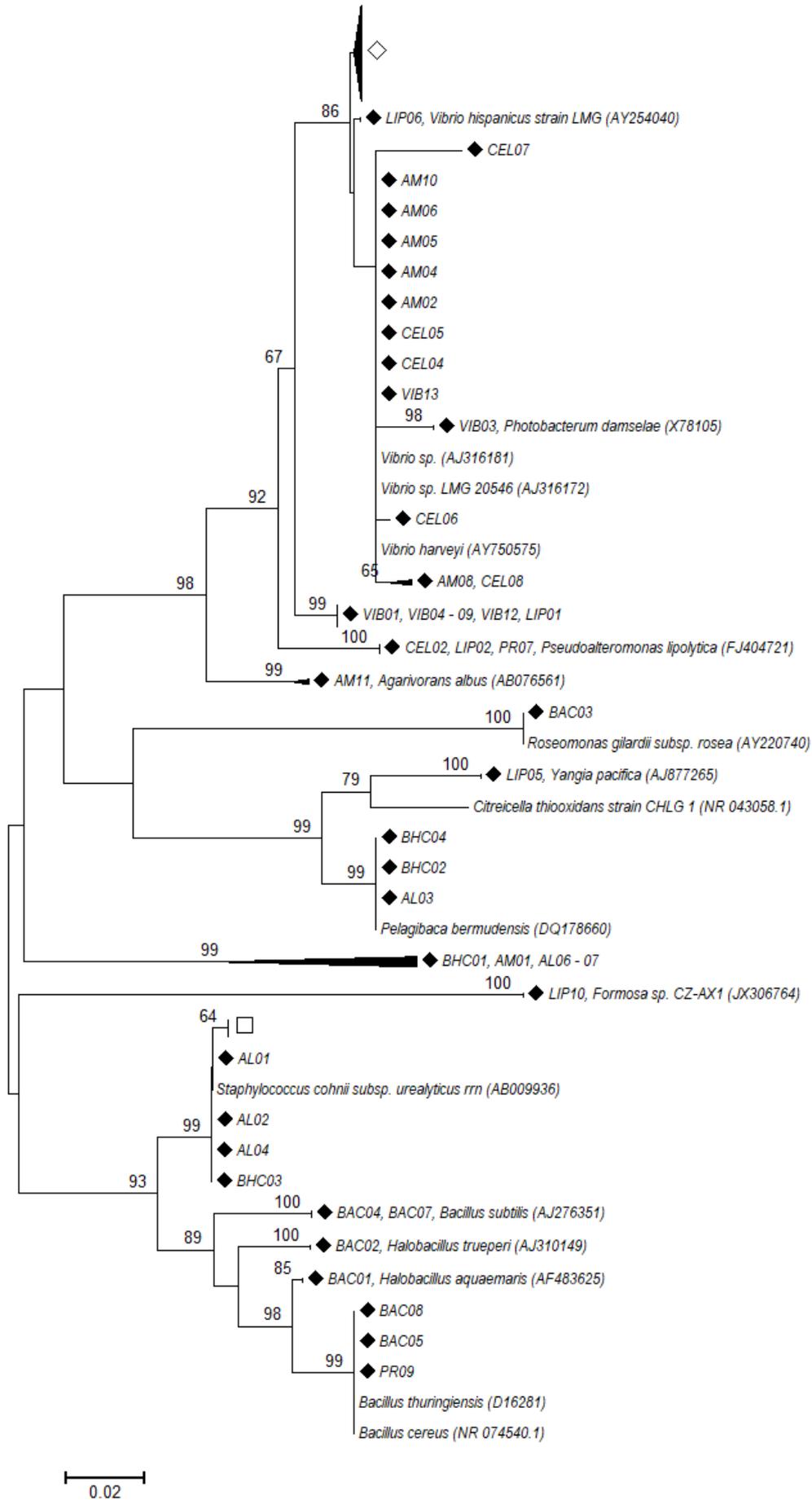
Os vibrios, junto aos bacilos e ácido lácticas apresentaram-se em todo este estudo como espécies bacterianas associadas a potenciais candidatas a probióticos e, também, como bactérias oportunistas e extremamente patogênicas ao camarão. Diante dessa situação, a adoção de práticas de monitoramento dessas bactérias é indicada como uma forma de acompanhamento de táxons que são indicativos do estado de saúde do animal.

A presença de fungos no ambiente e no intestino dos camarões merece devida atenção, pois diante da capacidade virulenta de algumas espécies, a principal via de contaminação é atribuída a ração administrada aos animais. Sob esta perspectiva, verificamos que para rações fabricadas no Brasil, não há um padrão de contagens de fungos que os classifique como aceitáveis ou não. Além disso, a falta de uma regulamentação padrão pode acarretar em problemas na produção com a presença de fungos nos cultivos podendo trazer um perigo potencial com a produção de toxinas.

A presença do vírus IMN em camarões nativos no estuário do rio Pacoti (CE) mostra-se também como um alerta diante das questões sanitárias e patológicas do ambiente e aos camarões que ali habitam. Mesmo que esse patógeno seja considerado endêmico no estado, não se sabe quais são as principais fontes responsáveis pela disseminação do vírus nesta região onde foi realizado o estudo. Esta circunstância pode ser abordada por mais estudos que podem ser realizados no futuro.

## ANEXOS

**ANEXO 1** - Árvore Neighbor-Joining baseada no método de distância Kimura 2 – parâmetros (Kimura, 1980), incluindo sequências de 16S rRNA de maior similaridade de acordo com a classificação do banco de dados do RDP (Ribossomal Database Project) e GenBank. Números plotados nos ramos indicam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições), apenas os valores maiores que 60 foram plotados. ♦ Sequências em estudo e/ou agrupadas com sequências do banco de dados. ◇ Sequências agrupadas no mesmo ramo: VIB02, VIB10 - 11, VIB14 – 15, PR01 – 08, LIP03 – 04, LIP07 – 09, CEL01, CEL03, AL09, AM03, AM07, BAC06, BAC09, BHC07 – 10, *V. corallilyticus* (AJ440005), *V. proteolyticus* ATCC 15338T (X74723), *V. azureus* strain NBRC 104587 (NR\_114268.1), *V. mytili* (X99761), *V. natriegens* (X74714), *V. nigripulchritudo* (X74717), *V. parahaemolyticus* clone Vp23 (AF388386), *Vibrio probioticus* (AJ345063), *Vibrio rumoiensis* (AB013297), *V. variabilis* (GU929924), *V. vulnificus* ATCC 27562 T (X76333). □ Sequências agrupadas no mesmo ramo: AL05, AL08, AM09, BHC05 – 06, *Staphylococcus warneri* (L37603), *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* (AB233326).



**ANEXO 2** – Identificação das sequências homólogas sequências oriundas do SAV das regiões V6–V8 16S rRNA. Porcentagem (%) do total de sequências obtidas por grupo funcional de acordo com a ferramenta Ribosomal Database Project (RDP) *Classifier*; Identidade e S<sub>ab</sub> score (similaridade par a par) de acordo com a classificação procariótica do 16S BLAST e RDP *Seqmatch*, respectivamente.

<b>Grupo funcional</b>	<b>%</b>	<b>Descrição do gênero</b>	<b>Espécies</b>	<b>Identidade</b>	<b>S<sub>ab</sub></b>	<b>Nº de acesso GenBank</b>
Ácido Láctica	1,23	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	0,977	0,950	X76333
	1,23	<i>Pelagibaca</i>	<i>Pelagibaca bermudensis</i>	1	1	DQ178660
	2,47	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1	AB009936
			<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1	AB233326
Proteolítica	1,23	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	1	1	AE016877
	8,64	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1	AF388386
	1,23	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	1	1	FJ404721
Bacillus	6,17	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus aquimaris</i>	1	1	AF483625
			<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	AJ276351
			<i>Bacillus cereus</i>	1	1	AE016877
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	1	D16281
	1,23	<i>Halobacillus</i>	<i>Halobacillus trueperi</i>	0,992	0,962	AJ310149
	1,23	<i>Roseomonas</i>	<i>Roseomonas gilardii</i>	1	1	AY220740
	2,47	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
<i>Vibrio spp.</i>	7,41	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio mytili</i>	0,958	0,763	X99761
			<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
			<i>Vibrio rumoiensis</i>	1	1	AB013297
			<i>Vibrio corallilyticus</i>	1	1	AJ440005
			<i>Vibrio xuii</i>	1	1	AJ316181
	1,23	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	1	1	X78105
	9,88	<i>Celerinatantimonas</i>				
Lipolítica	11,1	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio mytili</i>	0,958	0,763	X99761
			<i>Vibrio xuii</i>	1	1	AJ316181
			<i>Vibrio proteolyticus</i>	1	0,982	X74723
			<i>Vibrio rumoiensis</i>	1	1	AB013297

Grupo funcional	%	Descrição do gênero	Espécies	Identidade	S_ab	Nº de acesso GenBank
			<i>Vibrio hispanicus</i>	1	1	AY254040
	1,23	<i>Psychroserpens</i>				
	1,23	<i>Citricella</i>	<i>Citricella thiooxidans</i>	0,997	0,981	AY639887
	1,23	<i>Yangia</i>	<i>Yangia pacifica</i>	1	1	AJ877265
	1,23	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	1	1	FJ404721
	1,23	<i>Formosa</i>	<i>Formosa sp.</i>	0,979	0,864	JX306764
Amilolítica	1,23	<i>Agarivorans</i>	<i>Agarivorans albus</i>	0,971	0,838	AB076561
	8,64	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	1	1	AY750575
			<i>Vibrio variabilis</i>	0,986	0,908	GU929924
			<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	0,968	0,908	X74717
			<i>Vibrio brasiliensis</i>	1	0,969	AJ316172
			<i>Vibrio xuii</i>	1	1	AJ316181
	1,23	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,982	L37603
Celulolítica	1,23	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	1	1	FJ404721
	4,94	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	1	1	AY750575
			<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
BHC	4,94	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
			<i>Vibrio hepatarius</i>	1	1	AJ345063
	3,70	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1	AB233326
			<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,982	L37603
	2,47	<i>Pelagibaca</i>	<i>Pelagibaca bermudensis</i>	1	1	DQ178660
	1,23	<i>Nocardiaceae</i>				

**Anexo 3** - Identificação de cepas isoladas da microbiota residente do cultivo em água clara. Porcentagem (%) de sequências da região 16S rRNA descritas conforme análise do *Classifier*, Similaridade e S\_ab score (similaridade par a par) conforme a análise *Seqmatch* da base de dados do RDP.

<b>Grupo funcional</b>	<b>%</b>	<b>Descrição</b>	<b>Espécies</b>	<b>Similaridade</b>	<b>S_ab</b>	<b>Nº acesso</b>
Ácido láctica	4,69	<i>Micrococcineae</i>	<i>Arthrobacter nicotianae</i>	1	1	X80739
	9,38	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	1	1	AJ831842
			<i>Bacillus subtilis</i>	0,989	0,978	AJ276351
1,56	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i>	1	0,981	X74723	
Proteolítica	1,56	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus provencensis</i>	0,989	1	EF212893
	1,56	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella loihica</i>	0,992	0,962	DQ286387
	3,13	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	0,992	0,962	X76333
			<i>Vibrio azureus</i>	0,994	0,956	AB428897
1,56	<i>Micrococcineae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	0,986	0,954	AJ536198	
<i>Bacillus</i>	10,94	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus enclensis</i>	0,997	0,985	KF265350
			<i>Bacillus sonorensis</i>	0,986	0,970	AF302118
			<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	AY876289
			<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	AJ276351
<i>Vibrio spp</i>	9,38	<i>Aliivibrio</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i>	0,995	0,979	X74702
	6,25	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	0,992	0,981	X78105
	14,06	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i>	1	0,982	X74723
			<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	0,992	0,908	X74717
			<i>Vibrio harveyi</i>	1	1	AY750575
Lipolítica	9,38	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio xuii</i>	1	0,981	AJ316181
			<i>Vibrio natriegens</i>	0,997	0,963	X74714
Amilolítica	4,69	<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella haliotis</i>	0,989	0,997	EF178282
			<i>Shewanella marisflavi</i>	0,984	0,908	AY485224
	4,69	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
	1,56	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	AJ276351
Celulolítica	1,56	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,997	0,995	AF094748
	6,25	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
			<i>Vibrio hepatarius</i>	0,997	0,995	AJ345063
BHC	6,25	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714
	1,56	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	0,989	0,978	AJ276351
			<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714

**Anexo 4** - Identificação de cepas isoladas da microbiota cultivável do ambiente estuarino do rio Pacoti, Ceará. Porcentagem (%) de sequências da região 16S rRNA descritas conforme análise do *Classifier*, Similaridade e S\_ab score (similaridade par a par) conforme a análise *Seqmatch* da base de dados do RDP (Ribosomal Database Project) e o número de acesso *Genbank*.

Grupo funcional	%	Descrição	Espécies	Similaridade	S_ab	Nº acesso	
Ácido láctica	2,62	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1	X74690	
			<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714	
			<i>Vibrio hepatarius</i>	1	1	AJ345063	
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1	AF388386	
			<i>Vibrio harveyi</i>	1	1	AY750575	
	7,85	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	1	1	AB032015	
	0,52	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	AF516176	
	0,52	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Oceanobacillus caeni</i>	0,995	0,972	AB275883	
	0,52	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1	AB009936	
	Proteolítica	11,52	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1	X74690
<i>Vibrio natriegens</i>				1	1	X74714	
<i>Vibrio hepatarius</i>				1	1	AJ345063	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>				1	1	AF388386	
<i>Vibrio harveyi</i>				1	1	AY750575	
1,57		<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	1	1	AF290549	
0,52		<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	1	AJ421446	
<i>Bacillus</i> spp.		8,90	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	0,997	0,987	EU373308
				<i>Bacillus pocheonensis</i>	1	1	KJ126906
				<i>Bacillus endophyticus</i>	1	0,987	EU434355
	<i>Bacillus cereus</i>			1	1	Z84581	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>			1	1	AF290549	
	<i>Bacillus aquimaris</i>			1	1	AY647307	
	0,52			<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	1	1
<i>Vibrio</i> spp.	24,61	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1	X74690	
			<i>Vibrio natriegens</i>	1	1	X74714	

Grupo Funcional	%	Descrição	Espécies	Similaridade	S_ab	Nº acesso
			<i>Vibrio hepatarius</i>	1	1	AJ345063
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1	AF388386
			<i>Vibrio alfacensis</i>	1	1	JF316656
			<i>Vibrio atypicus</i>	0,989	0,961	FJ009624
			<i>Vibrio diabolicus</i>	0,989	0,961	JX257006
	2,09	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	1	1	AB032015
			<i>Photobacterium leiognathi</i>	1	1	AB243239
Lipolítica	10,01	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1	X74690
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1	AF388386
			<i>Vibrio natrie</i>	0,997	0,986	X74714
			<i>Vibrio hepatarius</i>	1	1	AJ345063
	2,03	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	1	1	EU373308
Amilolítica	10,99	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1	X74690
			<i>Vibrio hyugaensis</i>	1	1	LC004912
			<i>Vibrio natrie</i>	1	1	X74714
			<i>Vibrio hepatarius</i>	1	1	AJ345063
			<i>Vibrio harveyi</i>	1	1	AY750575
	0,52	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas sp</i>	1	1	AY669164
	1,05	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus indicus</i>	1	1	AJ583158
			<i>Bacillus sp.</i>	1	1	AB043854
BHC	8,90	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1	X74690
			<i>Vibrio brasiliensis</i>	1	1	HM771338
			<i>Vibrio natrie</i>	1	1	X74714
			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1	AF388386
			<i>Vibrio hepatarius</i>	1	1	AJ345063
			<i>Vibrio harveyi</i>	1	1	AY750575
			<i>Vibrio xuii</i>	1	1	AJ316181
			<i>Vibrio campbellii</i>	1	1	AY544985
	4,19	<i>Photobacterium</i>	<i>Photobacterium damsela</i>	1	1	X78105
	0,52	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	1	1	AY626834