



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

JADE OLIVEIRA ABREU

**ELABORAÇÃO DE CONSÓRCIOS PROBIÓTICOS BACTERIANOS PARA USO EM
CULTIVO DE CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*)**

FORTALEZA

2019

JADE OLIVEIRA ABREU

ELABORAÇÃO DE CONSÓRCIOS PROBIÓTICOS BACTERIANOS PARA USO EM
CULTIVO DE CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhas e Estuarinos.

Orientador: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa

Coorientador: Profa. Dra. Rosa Helena Rebouças

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)

A145e Abreu, Jade Oliveira.
Elaboração de consórcios probióticos bacterianos para uso em cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) / Jade Oliveira Abreu. – 2019.
88 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Rosa Helena Rebouças.

1. Carcinicultura. 2. Microrganismos. 3. Bioencapsulamento. 4. Sanidade. I. Título.

CDD 551.46

JADE OLIVEIRA ABREU

ELABORAÇÃO DE CONSÓRCIOS PROBIÓTICOS BACTERIANOS PARA USO EM
CULTIVO DE CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhas e Estuarinos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Paulo e Marinete, ao meu
marido, Felipe e aos meus irmãos, Eugênia,
Alyne e Júnior.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me presentear com saúde, força e coragem a cada amanhecer, por iluminar meus passos em cada nova jornada e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, Paulo Sérgio Teixeira de Abreu e Maria Marinete Oliveira Abreu, que fizeram o que estava ao seu alcance para que eu pudesse atingir meus objetivos e realizar meus sonhos. Vocês são os responsáveis pelo adulto que me tornei e até onde consegui chegar. Essa conquista não é só minha, é de vocês.

Aos meus irmãos, Eugênia Mara Oliveira Abreu, Alyne Oliveira Abreu Vidal e Paulo Sérgio Teixeira de Abreu Júnior, que sempre apoiaram minha escolha de carreira, mesmo ela sendo totalmente diferente das suas, e de uma forma ou outra fizeram de tudo para que isso desse certo.

Ao Felipe Vieira Barth, meu amigo, companheiro, confidente e agora, marido, por me acompanhar nessa estrada da vida, segurar minha mão e enfrentar comigo os obstáculos que surgem. Por virar noites comigo durante a escrita, por aprender funções de excel para me ensinar, por passar os fins de semana de descanso ao meu lado trabalhando no CEAC e por aguentar meus choros sempre com paciência.

Ao grande amigo Murilo Costa e à Eunice Maria de Oliveira, que foram dois dos grandes presentes que Deus colocou em meu caminho.

Ao Rafael Santos Rocha, pela ajuda, ensinamentos, explicações e paciência durante todo o experimento e escrita.

Ao Prof. Rodrigo Maggioni, por disponibilizar espaço, equipamentos e pessoal para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Alberto Jorge Pinto Nunes e ao Hassan Sabry Neto, por fornecer os animais e a ração utilizados no trabalho.

Ao Ricardo Camurça, que ajudou desde o início do experimento no Ceac mesmo com um braço imobilizado e desobedecendo orientações médicas, fez o possível para que o experimento pudesse ocorrer. Sempre paciente e solícito mesmo nas horas de desespero (rsrs).

À toda equipe LAMAP, que de uma forma ou outra creio que todos os integrantes do laboratório tenham ajudado na realização desse trabalho, principalmente durante o período de experimento no Ceac e durante os dias de amostragem, vocês foram essenciais para o sucesso desse trabalho.

Ao Hudson Damasceno Maia, que, muito solícito, ajudou em todos os dias de amostragem.

Aos meus filhos de laboratório, Eduarda e Danilo Cavalcante que me acompanharam nos cuidados com os camarões no Ceac e no laboratório.

À Marina Teresa Torres Rodrigues, por ter se tornado uma amiga tão querida, pelos conselhos e ensinamentos, pelo apoio e carinho. Tive muita sorte de poder conhecê-la melhor, pois parte do que me tornei agora foi graças a você.

À grande companheira Jéssica Lucinda Saldanha da Silva, por ser minha parceira durante toda a segunda fase do experimento, por me ensinar o que eu precisei saber sobre engenharia de pesca durante esse processo, pela paciência, força de trabalho, companhia, conversas, apoio e, principalmente, coragem para ser minha cobaia durante meus dias de direção rsrs. Apesar de todas as nossas picuinhas eu amo você, irmãzinha! (Aproveita, porque não pretendo repetir essa frase rsrs).

À Cristiane Teles, minha mãe de laboratório, que me ensinou o máximo que pode sempre com coração cheio de carinho e, que mesmo não podendo ajudar em algumas coisas dava um jeito para ajudar no máximo que pudesse e tornava possível o restante.

À Rosa Helena Rebouças pela ajuda e dedicação a mim e a este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos.

À Prof^a. Oscarina, que me apoiou a seguir a carreira que escolhi, que ensinou e possibilitou que eu aprendesse trabalhar em diversas áreas dentro do mundo que é a microbiologia, me tirando de uma zona de conforto e me aprimorando como profissional. Que mesmo em dias mais tortuosos respira fundo e acha soluções para os problemas que vão surgindo. Professora, você teima em se dizer madrasta, mas age como mãe, você acredita em nós muitas vezes antes de nós mesmos e é isso que realmente dá sentido a palavra “Orientadora”.

À Prof^a. Regine, por me permitir fazer parte da família LAMAP e acolher todos nós como seus filhos e netos.

A todos os professores e servidores do LABOMAR, que durante esses meus sete anos por lá fizeram parte dessa trajetória que segui e acabaram se tornando presenças marcantes em minha vida.

Aos servidores do Ceac, que nos receberam tão bem durante o período que passamos com eles e nos fizeram sentir sempre bem-vindos. Sempre carinhosos e atenciosos.

À Capes pelo apoio e concessão da bolsa de pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, deixo meu muito obrigada!

“Educação não transforma o mundo
Educação muda pessoas.
Pessoas transformam o mundo.”
(Paulo Freire)

RESUMO

O uso massivo de substâncias químicas para o controle de patógenos e para a fertilização dos viveiros gera forte pressão ecológica sobre as áreas próximas aos cultivos de camarão e torna a atividade ambientalmente insustentável. Esses químicos lançados nos efluentes da aquicultura geram consequências para o meio ambiente além dos riscos para a saúde da população e da própria atividade. Uma das alternativas encontradas para minimizar esses impactos e otimizar a produção é o uso de agentes probióticos na carcinicultura. Partindo desse pressuposto, o objetivo da presente pesquisa foi selecionar dentre um grupo de bactérias isoladas do trato intestinal de camarões cultivados as que apresentaram características diferenciais para melhoria da sanidade animal para aplicação como consórcio probiótico na carcinicultura. Essas estirpes bacterianas foram identificadas através de sequenciamento do DNA cromossomal e caracterizadas quanto a susceptibilidade a antimicrobianos, potencial de virulência, estabilidade a estresses, aderência e atividade antagônica das estirpes selecionadas entre si e frente aos patógenos *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus*. A partir dos resultados para os testes fenotípicos foram formados três consórcios probióticos que foram imobilizados em micropérolas de alginato de cálcio e então liofilizados. Os consórcios probióticos liofilizados foram adicionados à ração comercial para camarões para uso no ensaio *in vivo* de desafio contra o patógeno *V. harveyi*. O teste *in vivo* foi realizado em cinco grupos sendo um controle negativo (C1), um controle positivo (C2) e três tratamentos com consórcios probióticos distintos (T1, T2 e T3). Os probióticos foram ofertados aos animais pela ração, a uma taxa de arraçoamento de 5% numa concentração de 10^7 UFC/mL de bactérias. Após 30 dias de consumo dos consórcios probióticos, os animais foram expostos ao patógeno *Vibrio harveyi* via imersão. Os animais oriundos dos tratamentos T1, T2 e T3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto a peso médio, biomassa e sobrevivência em relação aos animais dos controles. No entanto quanto a presença de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e *Vibrio* na microbiota residente e transitória e a contagem total de hemócitos os camarões dos tratamentos apresentaram maior estabilidade e a resposta imune mais eficiente. Os três tratamentos apresentaram mecanismos de ação diferentes, o tratamento T1 se mostrou capaz de colonizar o trato intestinal dos animais, o T2 apresentou potencial de inibir o patógeno e, assim como o T3 estimular o sistema imune inato dos camarões

Palavras-chave: Carcinicultura. Microrganismos. Bioencapsulamento. Sanidade.

ABSTRACT

The massive use of chemicals for pathogen control and nursery fertilization creates strong ecological pressure on areas near shrimp farms and makes the activity environmentally unsustainable. These chemicals released into aquaculture effluents have consequences for the environment beyond the risks to the health of the population and the activity itself. One of the alternatives found to minimize these impacts and optimize production is the use of probiotic agents in shrimp farming. Based on this assumption, the objective of this research was to select between a group of bacteria isolated from the intestinal tract of farmed shrimp, those that presented differential characteristics to improve animal health for application as probiotic consortium in shrimp farming. These bacterial strains were identified by chromosomal DNA sequencing and characterized for antimicrobial susceptibility, virulence potential, stress stability, adhesion and antagonistic activity of the selected strains among themselves and against the pathogens *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. From the results of the phenotypic tests three probiotic consortia were formed and immobilized on calcium alginate micropearls and then lyophilized. The lyophilized probiotic consortia were added to the commercial shrimp diet for use in the *in vivo* challenge assay against the pathogen *V. harveyi*. The *in vivo* test was performed in five groups: one negative control (C1), one positive control (C2) and three treatments with distinct probiotic consortia (T1, T2 and T3). The probiotics were offered to the animals with a feeding rate of 5%, at a concentration of 10^7 CFU/mL of bacteria. After 30 days of consumption of the probiotic consortia, the animals were exposed to the pathogen *Vibrio harveyi* via immersion. The animals from treatments T1, T2 and T3 did not present statistically significant difference regarding the average weight, biomass and survival in relation to the control animals. However, regarding the presence of heterotrophic bacteria and *Vibrio* in the resident and transient microbiota and in the Total Hemocyte Count (THC), the shrimp of the treatments presented greater stability and the most efficient immune response. The three treatments presented different mechanisms of action, T1 treatment was able to colonize the intestinal tract of animals, T2 showed potential to inhibit the pathogen and, as well as T3, to stimulate the innate immune system of shrimps.

Keywords: Shrimp farming. Microorganisms. Bioencapsulation. Sanity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma representativo da Técnica de Coloração de Gram.....	29
Figura 2 – Representação esquemática do teste de antagonismo por estrias cruzadas (<i>streak cross</i>)	34
Figura 3 – Fluxograma com critérios utilizados para a seleção das estirpes formadoras dos consórcios probióticos	36
Figura 4 – Fluxograma da metodologia aplicada para a formação dos consórcios e concentração das células bacterianas	38
Figura 5 – Fluxograma da metodologia aplicada para a microencapsulamento dos consórcios probióticos e quantificação do concentrado bacteriano	40
Figura 6 – Fluxograma da metodologia aplicada para a recuperação e quantificação da micropérolas liofilizadas	42
Figura 7 – Fotografias das micropérolas dos consórcios reidratadas feitas em microscópio óptico em objetiva 10x	61
Figura 8 – Fotografias da carapaça dos camarões do experimento que apresentaram melanomas	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Frequência de gêneros e estirpes bacterianas isolados do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	50
Gráfico 2	– Distribuição relativa de estirpes por número de fenótipos de virulência expressos	51
Gráfico 3	– Percentual de estirpes dos quatro grupos formados com base nos resultados do teste de termorresistência a temperaturas extremas	52
Gráfico 4	– Agrupamento das estirpes bacterianas isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> , de acordo com as respostas a diferentes condições de pH (9,0 e 5,0) no meio de cultura	54
Gráfico 5	– Porcentagem das estirpes bacterianas isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> , de acordo com as respostas ao teste de aderência em microplaca de poliestireno	55
Gráfico 6	– Percentual de resistência das estirpes bacterianas isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> quando testadas frente a Oxitetraciclina	56
Gráfico 7	– Contagens de BHC no tecido e conteúdo intestinal dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas	64
Gráfico 8	– Contagens de <i>Vibrio</i> spp. no tecido e conteúdo intestinal dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas	66
Gráfico 9	– Gráfico da Contagem Total de Hemócitos (CTH) de todos os grupos do experimento ao longo das amostragens	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Características e identificação taxonômica das estirpes selecionadas para formação dos consórcios	59
Tabela 2	– Resultado da quantificação de células viáveis da suspensão bacteriana, das micropérolas e o rendimento de encapsulamento de cada consórcio	60
Tabela 3	– Média da BM_T de cada tratamento em cada biometria realizada e ganho de biomassa final	61
Tabela 4	– Análise estatística das taxas de sobrevivência, peso médio e biomassa	62
Tabela 5	– Contagens de BHC no tecido e conteúdo intestinal dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas após exposição a bactéria <i>V. harveyi</i>	63
Tabela 6	– Contagens de <i>Vibrio</i> spp. no tecido e conteúdo intestinal dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas	65
Tabela 7	– Contagem Total de Hemócitos (CTH) de todos os grupos testados do experimento ao longo das amostragens	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Técnicas e meios de cultura aplicados para o isolamento de bactérias com potencial probiótico	28
Quadro 2 – <i>Primers</i> e sondas utilizados para detecção e quantificação de WSSV e IMNV	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AHPNS	Síndrome da Necrose Hepatopancreática Aguda (Sigla em inglês)
BHC	Bactérias Heterotróficas Cultiváveis
CTH	Contagem Total de Hemócitos
EMS	Síndrome da Mortalidade Precoce (Sigla em inglês)
HPV	Parvovírus hepatopancreático (Sigla em inglês)
IHHNV	Vírus da Necrose Hipodérmica Infecciosa (Sigla em inglês)
IMNV	Mionecrose Infecciosa Viral (Sigla em inglês)
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
MBV	<i>Baculovirus monodon</i> (Sigla em inglês)
PCA	Ágar de Contagem Padrão em Placa (Sigla em inglês)
SPF	Camarões sem Patógeno Específico
TSV	Vírus da Síndrome de Taura (Sigla em inglês)
WSSV	Vírus da Síndrome da Mancha Branca (Sigla em inglês)
NaCl	Cloreto de Sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

t	Toneladas
C	Celsius
%	Porcentagem
kg/ha	Quilograma por hectare
ppm	Parte por milhão
ha	Hectare
μL	Microlitro
mL	Mililitro
kg/ha/ano	Quilograma por hectare por ano
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Problemas no cultivo do camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> – Doenças e Patógenos	20
3.2	Impactos ambientais resultantes do cultivo de camarões	22
3.3	Soluções para a carcinicultura sustentável	23
3.4	Probióticos na Carcinicultura	24
3.5	Otimização do uso de probióticos na carcinicultura	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Seleção das Estirpes Bacterianas	28
4.2	Identificação das Estirpes Bacterianas	29
4.2.1	<i>Identificação Morfotintorial</i>	29
4.2.2	<i>Identificação Genética</i>	29
4.2.2.1	<i>Extração de DNA</i>	29
4.2.2.2	<i>Amplificação do produto da extração</i>	30
4.2.2.3	<i>Verificação dos produtos da extração e da PCR</i>	30
4.2.2.4	<i>Sequenciamento do DNA bacteriano</i>	30
4.2.2.5	<i>Alinhamento das sequências geradas</i>	31
4.3	Verificação de potenciais fenótipos de virulência nas estirpes bacterianas selecionadas	31
4.3.1	<i>Elastase</i>	31
4.3.2	<i>Gelatinase</i>	31
4.3.3	<i>Caseinase</i>	32
4.3.4	<i>Fosfolipase</i>	32
4.3.5	<i>Lipase</i>	32
4.4	Testes de estabilidade a estresses	32
4.4.1	<i>Termorresistência</i>	32
4.4.2	<i>Teste de tolerância a variação de pH</i>	33
4.5	Teste de aderência em microplaca de poliestireno (TMC)	33
4.6	Antibiograma	33
4.7	Testes de Antagonismo	34
4.7.1	<i>Teste de antagonismo frente a patógenos</i>	35
4.7.2	<i>Teste de antagonismo entre estirpes</i>	35
4.8	Seleção dos consórcios	35
4.9	Reativação das estirpes	36
4.10	Teste de Protocolo de Liofilização	36
4.11	Formação dos consórcios e concentração das células bacterianas	37
4.11.1	<i>Quantificação do concentrado bacteriano</i>	38

4.12	Imobilização dos consórcios probióticos (Microencapsulamento).....	39
4.12.1	<i>Recuperação das micropérolas liofilizados e Quantificação</i>	41
4.12.2	<i>Rendimento de Encapsulamento (RE)</i>	42
4.13	Teste <i>in vivo</i>	43
4.13.1	<i>Preparo da Ração</i>	44
4.13.2	<i>Taxa Final de Sobrevivência</i>	44
4.13.3	<i>Teste Desafio</i>	44
4.14	Análise dos animais após exposição ao patógeno.....	45
4.14.1	<i>Contagem Total de Hemócitos (CTH)</i>	45
4.14.2	<i>Contagem Padrão em Placa (CPP) – BHC e Vibrio</i>	46
4.15	Quantificação viral (WSSV e IMNV)	46
4.15.1	<i>Extração de DNA</i>	47
4.15.2	<i>Extração de RNA e Síntese de cDNA</i>	47
4.15.3	<i>PCR em Tempo Real (TaqMan®)</i>	48
4.16	Análise estatística	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Identificação das Estirpes Bacterianas	50
5.2	Detecção de fenótipos de virulência nas estirpes bacterianas selecionadas..	51
5.3	Testes de estabilidade a estresses	52
5.3.1	<i>Termorresistência</i>	52
5.3.2	<i>Teste de tolerância a variação de pH</i>	53
5.4	Teste de aderência em microplaca de poliestireno (TMC)	54
5.5	Antibiograma	56
5.6	Testes de Antagonismo	57
5.6.1	<i>Teste de antagonismo frente a patógenos</i>	57
5.6.2	<i>Teste de antagonismo entre estirpes</i>	58
5.7	Seleção dos consórcios	58
5.8	Reativação das Estirpes	59
5.9	Formação e imobilização dos consórcios probióticos	60
5.9.1	<i>Quantificação da suspensão bacteriana, das micropérolas e Rendimento de Encapsulamento (RE)</i>	60
5.10	Teste <i>in vivo</i>	61
5.11	Contagens.....	63
5.11.1	<i>Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC)</i>	63
5.11.2	<i>Vibrio</i>	65
5.12	Contagem Total de Hemócitos (CTH).....	67
5.13	Quantificação Viral	69
6	CONCLUSÕES	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS PARA SELEÇÃO E FORMAÇÃO DOS CONSÓRCIOS PROBIÓTICOS. CONTINUA	83

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura é uma atividade agroindustrial com produção expressiva no Brasil e que alcançou 65.000 t de camarão no ano de 2017. No entanto, vem sofrendo alguns entraves relacionados a competitividade com o mercado externo e queda na produção motivadas por surtos de doenças nos cultivos (ROCHA, 2018).

Os patógenos de camarão têm sido responsáveis por grandes perdas econômicas desde o ano de 2003, sendo o principal problema enfrentado pelos produtores afetando negativamente a produção e a receita de exportação (MOSS *et al.*, 2012; THITAMADEE *et al.*, 2016; ROCHA, 2018).

Na tentativa de conter os impactos negativos acarretados por essas enfermidades, inúmeras alternativas têm sido desenvolvidas para impedir a multiplicação de microrganismos patogênicos nos viveiros e promover o crescimento dos organismos cultivados. Desde então, uma prática que se tornou comum para os criadores de camarão foi o emprego de substâncias químicas tais como os antimicrobianos (PAEZ-OSUNA, 2001; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016).

A utilização dos antimicrobianos foi uma estratégia efetiva no controle de infecções bacterianas na carcinicultura no início. No entanto, seu uso constante e indiscriminado pode gerar consequências negativas como a indução e transferência de genes de resistência a antimicrobianos, tornando esses químicos ineficazes para o combate das enfermidades (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2017).

Ao falarmos sobre o uso de compostos químicos e presença de patógenos no ambiente aquático, devemos levar em conta a fácil disseminação de ambos entre os viveiros de uma mesma fazenda e de fazendas vizinhas que se utilizam do mesmo curso de água para seu abastecimento e descarte. Essa dinâmica alimenta um ciclo sucessivo de contaminações químicas e biológicas (PAEZ-OSUNA, 2001; BRUMMETT, 2014).

O uso de probióticos tem sido uma das alternativas mais promissoras para controlar doenças e melhorar a saúde do camarão, numa tentativa de minimizar problemas enfrentados durante sua produção (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2017).

Dá-se o nome de probiótico ao microrganismo vivo que possui efeitos benéficos sobre o hospedeiro, modificando sua comunidade microbiana ou de seu ambiente otimizando o uso e o valor nutricional da ração, podendo também incrementar sua resposta imune contra as doenças (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

O maior desafio na busca para utilização de bactérias como probiótico é definir o método adequado de seleção e colonização dessas estirpes, para que as mesmas desempenhem a função esperada ao serem aplicadas no cultivo. Para isso têm sido empregadas algumas técnicas para otimizar o efeito do probiótico, como por exemplo: isolar bactérias do próprio ambiente de cultivo e até mesmo do intestino de camarões cultivados para uso como probiótico e, a utilização de múltiplas estirpes bacterianas, ou seja, um consórcio, para que assim elas exerçam efeito sinérgico entre si e potencializem o efeito do probiótico (NINAWA; SELVIN, 2009; VIEIRA *et al.*, 2013; SWAPNA; VENKATRAYULU; SWATHI, 2015).

Partindo desse pressuposto, o objetivo da presente pesquisa foi identificar, dentre estirpes bacterianas isoladas do trato intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, bactérias com características diferenciais para melhoria do desempenho zootécnico e da sanidade animal para aplicação como consórcio probiótico na carcinicultura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar bactérias, isoladas do trato intestinal de camarões cultivados, com características diferenciais para melhoria do desempenho zootécnico e da sanidade animal.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar as estirpes bacterianas através da técnica de sequenciamento do DNA cromossomal;
2. Pesquisar potenciais fenótipos de virulência nas estirpes bacterianas selecionadas;
3. Verificar a atividade antagonista das estirpes bacterianas frente aos patógenos *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus*;
4. Verificar a susceptibilidade a antimicrobianos das estirpes bacterianas selecionadas;
5. Formação de consórcios probióticos com as estirpes bacterianas selecionadas.
6. Verificar o efeito probiótico de consórcios bacterianos formados com as estirpes selecionadas através de testes *in vivo*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Problemas no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* – Doenças e Patógenos

O maior problema enfrentado na carcinicultura tem sido a aparição de doenças nos cultivos com perdas significativas em toda a cadeia produtiva, a exemplo da região Nordeste do Brasil, mais precisamente no estado do Rio Grande do Norte, que em 2014 reportou altos índices de mortalidade nos cultivos em decorrência da doença da mancha branca (MOSS *et al.*, 2012; THITAMADEE *et al.*, 2016; NUNES; FEIJÓ, 2016).

Enfermidades como a mionecrose infecciosa (IMNV, sigla em inglês) e a síndrome da mancha branca (WSSV, sigla em inglês) geraram custos bilionários a indústria mundial de camarão com perda de colheitas, empregos e receita e, têm causado grande impacto negativo na produção de camarão da região Nordeste do Brasil (MOSS *et al.*, 2012; NEVES, 2018).

Outra doença que vem afetando expressivamente a indústria de camarão é a Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS, sigla em inglês), também conhecida como Síndrome da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPNS, sigla em inglês). Primeiramente correlacionou-se uma linhagem da espécie *Vibrio parahaemolyticus* como sendo o agente etiológico responsável por ocasionar a EMS/AHPNS. Por ser uma virulência mediada por um gene plasmidial, recentemente outras espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, tais como *V. campbellii*, *V. harveyi* e *V. owensii* já foram associadas ao desencadeamento desta enfermidade (TRAN *et al.*, 2013; KONDO, *et al.*, 2015; AHN, *et al.*, 2017; LIU, *et al.*, 2018; VARELA, 2018).

Como parte de uma tentativa de conter doenças e enfermidades, assim como prevenir o crescimento de patógenos nos viveiros e promover o crescimento dos organismos cultivados, foram utilizadas como prática comum na carcinicultura, diferentes substâncias químicas como os antimicrobianos. No entanto, hoje em dia se sabe que o uso desses químicos propicia a proliferação de microrganismos patogênicos que carregam genes de resistência o que agrava esta problemática (PAEZ-OSUNA, 2001; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016).

Os antibióticos foram utilizados por um período de tempo longo nas fazendas de cultivo o que trouxe grandes problemas conhecidos como, por exemplo a presença de resíduos de antibióticos nos tecidos dos organismos cultivados, desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência bacteriana e um desequilíbrio na microbiota intestinal dos organismos aquáticos, afetando a saúde dos mesmos (BOLEM *et al.*, 2017).

É importante destacar que a presença de microrganismos patogênicos e substâncias químicas tais como os antimicrobianos na água dos viveiros de cultivo pode constituir uma fonte contaminante para outros viveiros, uma vez que aconteça uma eventual contaminação por descarte desses efluentes nos restantes aquíferos (PAEZ-OSUNA, 2001; BRUMMETT, 2014).

No Brasil, desde 2003 a produção de camarão sofreu graves declínios em função de surtos de doenças como a Doença da Mancha Branca (WSSV, sigla em inglês), que resultou em grandes perdas financeiras em diversos países, fato que agora se repete em todas as regiões produtoras de camarão do Brasil (PINCINATO; ASCHE, 2016; COZER *et al.*, 2019).

No entanto, a presença do vírus da WSSV não tem sido mais uma barreira para comercialização do camarão, uma vez que a cauda pode apresentar até 34.000.000 de cópias do material genético deste vírus por micrograma de DNA extraído, então as atenções têm sido voltadas para doenças emergentes, como as vibrioses (ROCHA, 2018).

A preocupação com as bactérias do gênero *Vibrio* é devido a estas espécies ocorrerem naturalmente em ambientes marinhos e estuarinos, compondo a microbiota da água e de organismos que habitam esses locais, logo, cultivos de camarões realizados em águas estuarinas terão a presença de bactérias desse gênero, o que os torna passíveis de ocorrências de vibrioses, já que algumas espécies do gênero *Vibrio* são reconhecidas como patógenos oportunistas (CHENG, *et al.*, 2010; KITAOKA *et al.*, 2011; PARVATHI; MENDEZ; ANTO, 2011; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016; SILVEIRA, *et al.*, 2016).

Dentre as espécies de *Vibrio* de importância para o cultivo de camarões estão em destaque *V. harveyi* por ser responsável por causar uma doença conhecida como vibriose luminosa em camarões peneídeos e *V. parahaemolyticus* por ser o agente etiológico de uma doença emergente para os camarões e também provocar gastroenterites em humanos (CHENG, *et al.*, 2010; MURATORI, *et al.*, 2014; SILVEIRA, *et al.*, 2016).

A sintomatologia provocada pelo *V. harveyi* nos camarões incluem destruição do sistema digestório, especialmente hepatopâncreas e intestino anterior, opacidade do corpo, necrose e letargia (CHENG, *et al.*, 2010).

Vibrio parahaemolyticus passou a ser foco de maiores preocupações, desde a descoberta, em 2013, de que uma linhagem dessa espécie é a causadora da enfermidade que causou mais prejuízos à carcinicultura mundial atualmente, a EMS/AHPNS (ROCHA, 2018).

Camarões portadores da EMS manifestam alguns sintomas macroscópicos como a coloração pálida e esbranquiçada do hepatopâncreas, atrofia do órgão bem evidente, na fase aguda da enfermidade é possível observar estrias ou pontos escuros no hepatopâncreas, com mortalidade de até 100% em poucos dias nos viveiros afetados (TRAN *et al.*, 2013).

Ainda não relatada no Brasil, a EMS já foi confirmada no Equador, país do qual o Brasil ainda importa camarões, desde 2017 (ROCHA, 2018).

3.2 Impactos ambientais resultantes do cultivo de camarões

De acordo com Páez-Osuna (2001), a atividade de carcinicultura pode gerar impactos em função do local de implantação dos viveiros, da gestão e tecnologia aplicada a atividade, o tamanho ou escala de produção e a superfície dedicada a ela e, a capacidade do aquífero receptor.

Alguns dos impactos mais relatados na literatura são: degradação de manguezais, salinização do solo, poluição da água dos aquíferos por descarga de efluentes, liberação de organismos (poluição biológica), descargas de substâncias químicas utilizadas no cultivo, liberação e disseminação de doenças, intrusão de água salgada e deposição de sedimentos (PÁEZ-OSUNA, 2001; PAUL; VOGL, 2011).

Os efeitos desses impactos atingem não só o ecossistema como também o setor econômico e social, são eles: a perda de áreas agricultáveis, eutrofização dos aquíferos, introdução de espécies exóticas, perda de biodiversidade, seleção de patógenos resistentes a antibióticos, surtos de doenças nos viveiros e risco de comercialização de alimentos contaminados (PÁEZ-OSUNA, 2001; PAUL; VOGL, 2011; HOSSAIN; UDDIN; FAKHRUDDIN, 2013).

Numa tentativa de minimizar alguns impactos gerados pela produção de camarões cultivados tem sido empregado o uso de químicos, como terapicos, desinfetantes, condicionadores de água e sedimentos, decompositores da matéria orgânica, algicidas, fertilizantes e aditivos alimentares. No entanto, se seu uso for indiscriminado sua presença no ambiente de cultivo deixa de ser um benefício e passa a ser um impacto negativo (PÁEZ-OSUNA, 2001).

Informações precisas sobre o uso de antimicrobianos nos cultivos de camarões a nível mundial são raras. No entanto sabe-se que seu uso vem sendo aplicado como medida profilática e para tratamento das doenças. O uso indiscriminado dos antimicrobianos pelos produtores deve-se em parte pela falta de informação ou conhecimento equivocado da atuação desses químicos que podem afetar a sanidade humana e ambiental devido suas características de persistência. Acredita-se que esse uso equivocado possa ser reduzido drasticamente pela disseminação de informações e pela implementação de melhores práticas de gestão (HOLMSTROM *et al.*, 2003; ROMERO; FEIJÓ; NAVARRETE, 2012)

Algumas alternativas ao uso dos antimicrobianos para combate de bacterioses já têm sido desenvolvidas, tais como o uso de óleos essenciais, fagoterapia e aplicação de probióticos merecendo destaque para novos e mais aprofundados estudos para comprovação de sua eficácia (RANDRIANARIVELO, *et al.*, 2010; CARRIAS, *et al.*, 2012; ROMERO; FEIJÓ; NAVARRETE, 2012; GRACIA-VALENZUELA, *et al.*, 2014).

3.3 Soluções para a carcinicultura sustentável

A busca por alternativas econômicas e ambientalmente viáveis que solucionem problemas comuns da produção de camarões marinhos tem sido o objetivo principal dos carcinicultores no decorrer do tempo (THITAMADEE, *et al.*, 2016).

Uma solução encontrada para minimizar a incidência e efeitos de enfermidades nos cultivos foi a utilização de Camarões sem Patógenos Específicos (SPF, sigla em inglês) (LOTZ, 1997; LIGHTNER *et al.*, 2009). Para isso, produtores têm empregado o uso de pós-larvas produzidas a partir de reprodutores domesticados saudáveis. Algumas larvas podem apresentar resistência a patógenos já disseminados no ambiente de carcinicultura, como por exemplo indivíduos SPF de *L. vannamei* altamente tolerantes a patógenos como o vírus da síndrome de Taura (TSV, sigla em inglês) e o vírus da necrose hipodérmica infecciosa (IHHNV, sigla em inglês), da mesma forma, no caso das doenças causadas por *Baculovírus monodon* (MBV, sigla em inglês) e *Parvovírus hepatopancreático* (HPV, sigla em inglês) (KUMAR; ENGLE, 2016; THITAMADEE *et al.*, 2016).

Práticas de biossegurança têm sido amplamente empregadas no manejo da carcinicultura nas diferentes fazendas devido a sua praticidade e por exigir um trabalho menos dispendioso para a aplicação quando comparados a programas que tem como objetivo uma reprodução seletiva que visa aumentar a resistência a doenças (BOOPATHY., 2018).

Um exemplo dessas práticas é a redução das trocas de água. Isso diminui a introdução de patógenos externos como artrópodes portadores do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e a disseminação de contaminantes de uma fazenda a outra (MOSS *et al.*, 2012).

A manutenção da qualidade da água para reuso realizada por aeração intensa e aproveitamento da microbiota autóctone para biofiltração e como alimento suplementar para os camarões nas fazendas foi o início da tecnologia de bioflocos utilizada atualmente, que permite que a pressão seletiva determine o crescimento e sobrevivência dos camarões e não a busca constante por resistência a doenças (BOOPATHY., 2018).

Atualmente, a tecnologia mais empregada na tentativa de minimizar os problemas enfrentados na produção do camarão é o uso de probióticos. Um probiótico é um suplemento bacteriano formado por uma única estirpe ou um consórcio de culturas bacterianas selecionadas não patogênicas (KUMAR *et al.*, 2016).

O conceito de controle biológico de doenças, particularmente usando microrganismos moduladores como elementos de prevenção, vem recebendo grande atenção nos países produtores de organismos aquáticos cultivados, uma vez que a utilização de probióticos na carcinicultura é uma prática comum e amplamente disseminada no controle da qualidade da água e possui uma vital importância na sobrevivência, crescimento e resistência as enfermidades do camarão (BOLEM *et al.*, 2017)

3.4 Probióticos na Carcinicultura

Segundo Fuller (1989), esses agentes biológicos são definidos como microrganismos usados como suplemento da ração que trazem benefícios para os animais hospedeiros melhorando seu balanço intestinal.

Um probiótico é um microrganismo vivo que possui efeitos benéficos sobre o hospedeiro por modificação da comunidade microbiana associada ao mesmo ou de seu ambiente favorecendo o uso da ração ou aumentando seu valor nutricional. Também incrementa a resposta imune dos organismos contra as doenças e favorece a melhoria da qualidade da água de seu ambiente de cultivo (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

As primeiras pesquisas realizadas com intuito de buscar probióticos para os ambientes de aquicultura datam desde o final dos anos 80 (NINAWE; SELVIN, 2009).

Inicialmente, no Equador, foi utilizado *Vibrio alginolyticus* como probiótico bacteriano em muitos viveiros, mas posteriormente esta bactéria passou a ser considerada um patógeno secundário e oportunista, pois causa diminuição da imunidade e aumento da mortalidade em camarões sob estresse ambientais como baixa salinidade e estresse por baixa e alta temperatura (NINAWE; SELVIN, 2009; CHEN *et al.*, 2015).

Atualmente, as bactérias que têm sido mais amplamente utilizadas como probióticos pertencem ao gênero *Bacillus*. Esse gênero é composto por bactérias Gram-positivas em forma de bastonete, caracterizadas por sua capacidade de produzir um esporo (IBRAHEM, 2015).

A maioria das espécies de *Bacillus* é inócua para mamíferos, incluindo humanos e, sua grande relevância comercial é devido à alta e diversa quantidade de metabólitos secundários

que produzem, incluindo antibióticos, bio-inseticidas, biossurfactantes e enzimas extracelulares (NINAWA; SELVIN, 2009).

O maior desafio na busca por bactérias para utilização como probióticos é definir o método adequado de seleção e colonização dessas estirpes, para que as mesmas desempenhem a função esperada ao serem aplicadas no cultivo (KUMAR *et al.*, 2016).

Probióticos têm diferentes aplicações variando de acordo com seu modo de ação, podendo ser destinados a melhoria da qualidade da água ou a sanidade animal (VERSCHUERE, *et al.*, 2000).

Quanto a sanidade animal, os probióticos aplicados podem ter os seguintes modos de ação: atividade antagônica frente a patógenos, podendo ser por competição de nutrientes, de espaço e de sítios de adesão (mucosa intestinal e carapaça); produção de enzimas extracelulares, que podem atuar como enzimas digestivas e auxiliar o processo metabólico do hospedeiro e/ou ter efeito inibitório sobre patógenos e, imunomodulação, quando, já aderido a mucosa, o probiótico estimula a ação do sistema imune inato do hospedeiro quando confrontado com um patógeno (IBRAHEM, 2015; BANERJEE; RAY, 2017).

Quanto a melhoria da qualidade da água, tem se buscado empregar o uso de microrganismos nitrificantes, capazes de oxidar a amônia para nitrito e posteriormente para nitrato, e assim controlar mais rapidamente os níveis de amônia na água dos viveiros (ZORRIEHZAHRA *et al.*, 2016).

3.5 Otimização do uso de probióticos na carcinicultura

Os critérios para seleção de microrganismos probióticos devem avaliar os métodos e a capacidade de colonização da via gastrointestinal, a interação antagonista seletiva com patógenos, a modulação do sistema imunológico do camarão, a promoção de crescimento e possível potencial de manutenção da qualidade da água e biorremediação de detritos (NINAWA; SELVIN, 2009).

Um grupo bacteriano que se destaca durante o processo de seleção de estirpes probióticas são as bactérias ácido lácticas, pois essas produzem compostos com atividade antimicrobiana como ácidos orgânicos, ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio e, também tem potencial de estimular resposta imunológica inespecífica no hospedeiro (VIEIRA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2016).

Microrganismos que apresentam atividade antagonista frente a patógenos também são de grande relevância para a seleção de estirpes probióticas, pois além de reduzirem a carga

de patógenos por exclusão competitiva podem produzir enzimas que inibam seu crescimento, porém a atividade antagonista é altamente dependente de fatores ambientais e pode ser perturbada por condições físicas, por isso indica-se o uso de bactérias probióticas que tem origem no próprio ambiente de cultivo (NINAWÉ; SELVIN, 2009; ZOKAEIFAR, H. *et al.*, 2012a).

Alguns probióticos comerciais utilizados na aquicultura são compostos de bactérias alóctones ao ambiente de cultivo, alguns podem conter até estirpes de origem terrestre, o que pode interferir no desempenho de suas funções, uma vez que as características das bactérias dependem do ambiente em que elas prosperam tendo em conta que a mudança das variáveis ambientais pode ser estressante para elas (NINAWÉ; SELVIN, 2009; VIEIRA *et al.*, 2013).

Bactérias isoladas do ambiente de cultivo e do intestino de camarões cultivados para o uso como probiótico resultou em uma solução viável aos problemas gerados como consequência da adaptação das bactérias não oriundas ao ambiente dos organismos cultivados, pois a introdução de espécies exóticas pode representar um risco para o equilíbrio do ecossistema (VIEIRA *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2016; VARGAS-ALBORES *et al.*, 2016).

Outra alternativa que visa otimizar o efeito dos probióticos na carcinicultura é o uso de dois ou mais microrganismos probióticos simultaneamente, que é chamado de consórcio probiótico. A utilização de múltiplas bactérias tem um papel promissor para os probióticos, pois elas exercem efeito sinérgico entre si o que poderia promover o crescimento do camarão e melhorar sua resposta imune e sua absorção de nutrientes (SWAPNA; VENKATRAYULU; SWATHI, 2015).

Wang *et al.* (2019) consideram que probióticos multiespécie tem capacidade de inibição de patógenos mais eficiente que probióticos formados com uma única estirpe e ponderam que estudos mais aprofundados a respeito da capacidade de adesão e de inibição de patógenos desses probióticos possam esclarecer a razão dessa diferença.

A forma ou via de administração do probiótico é outro aspecto relevante e necessário de estudo, uma vez que a disposição do produto influencia diretamente na ação e na obtenção de resultados satisfatórios durante o cultivo. Visto que podem vir a ocorrer perdas na viabilidade durante o processamento e armazenamento (BIDHAN *et al.*, 2014; TUAN; DUC; HATAI, 2013), bem como em sua reativação. A administração do probiótico via ração é uma forma fácil e viável, sendo geralmente empregadas culturas microbianas liofilizadas, no entanto, a utilização de células microbianas livres torna a oferta de probióticos passível de perda de densidade celular e assim da produtividade volumétrica (BIDHAN *et al.*, 2014).

Como uma solução tem-se a tecnologia de encapsulamento probiótico (TEP), que tem como objetivo proteger os microrganismos para disponibilizá-los apenas no intestino, uma vez que sua utilização foi sugerida para que os microrganismos probióticos chegassem viáveis e biologicamente ativos ao local alvo do hospedeiro. Essa técnica de imobilizar as culturas probióticas proporciona proteção física e química das células microbianas, além de estabilidade durante longos períodos de fermentação, retenção de plasmídeos, resistência à contaminação e estimulação da produção e secreção de metabólitos secundários (BIDHAN *et al.*, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das Estirpes Bacterianas

As estirpes utilizadas no presente trabalho foram isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* e pertencem a coleção de culturas microbianas Profa. Regine Vieira do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP).

Foram selecionadas 191 estirpes dentre as obtidas por meio do projeto Caracterização e Envolvimento da Microbiota Natural nos Mecanismos de Defesa de Crustáceos e Moluscos Cultivados na Costa Brasileira (CIMAR), em que foram isoladas bactérias de camarões de dois diferentes sistemas de cultivo, bioflocos e águas claras.

Foram selecionadas estirpes bacterianas pertencentes aos grupos: *Bacillus*, Bactérias Ácido Lácticas (BAL), Proteolíticas, Amilolíticas, Lipolíticas e Celulolíticas.

Essas bactérias foram isoladas utilizando técnicas e meios de cultura seletivos, como descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Técnicas e meios de cultura aplicados para o isolamento de bactérias com potencial probiótico.

Grupo microbiano	Meio de cultivo	Técnica de inoculação	Condições de crescimento	Referência
<i>Bacillus spp.</i>	Ágar para Contagem Padrão em Placa (PCA)		30°C/72 h	Adaptado de Travers, Martin e Reichelderfer (1987)
Bactérias Ácido Lácticas (BAL)	Ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS)		35°C/748 h	Adaptado de Hajar e Hamid (2013)
Proteolíticas	Ágar ágar + Leite (2%)	<i>Pour-Plate</i>	30°C/72 h	Sizemore e Stevenson (1970)
Amilolíticas	Ágar ágar + Amido (2%)		30°C/2 a 5 dias	
Lipolíticas	Ágar peptona + Tween 80 (1%)		30°C/72 h	Sierra (1957)
Celulolíticas	Ágar, meio mineral, carboximetilcelulose		30°C/72 h	Adaptado de Luczkovich e Stellwag (1993)

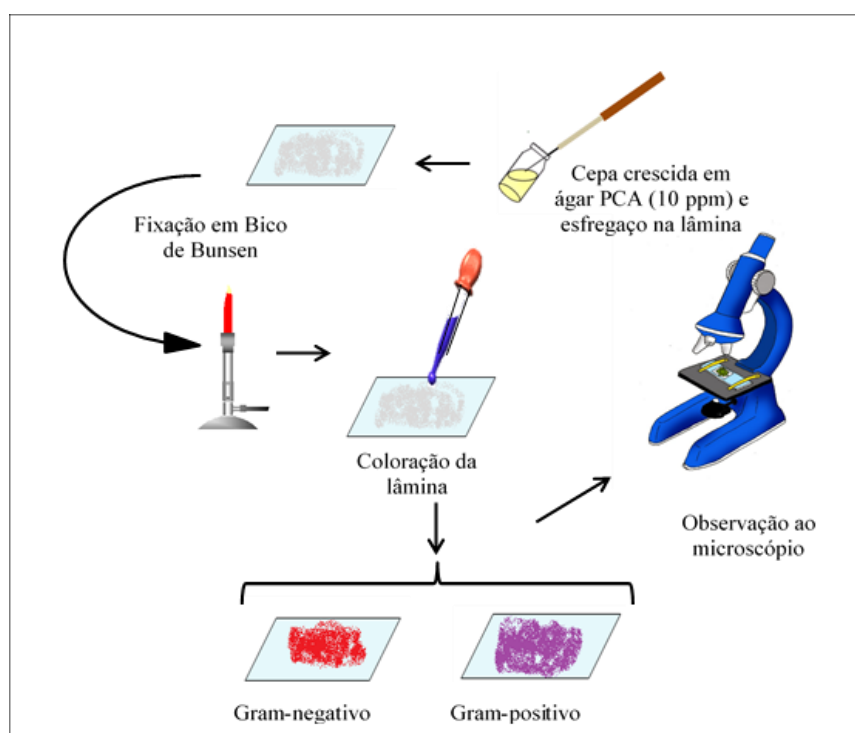
Fonte: Próprio autor.

4.2 Identificação das Estirpes Bacterianas

4.2.1 Identificação Morfotintorial

A análise da morfologia e estrutura da parede celular bacteriana para identificação foi feita por meio da técnica de coloração de Gram, que classifica as bactérias em dois grandes grupos, Gram positivas e Gram negativas, de acordo com sua reação aos corantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016) (FIGURA 1).

Figura 1 – Fluxograma representativo da Técnica de Coloração de Gram.



Fonte: Adaptado de SANTOS (2013).

4.2.2 Identificação Genética

4.2.2.1 Extração de DNA

As estirpes bacterianas puras foram inoculadas em meio Luria Bertani (LB) e incubadas a 35°C por 48 horas. Após esse período, foram retiradas alíquotas de 1mL dos inóculos para extração do DNA total. A extração foi realizada utilizando kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

A eficiência da extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2.2.2 Amplificação do produto da extração

O produto da extração do DNA foi amplificado por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universais 1401L (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CC-3') e 968U (5'-AAC GCG AAGAAC CTT AC-3') descritos por Pereira *et al.* (2011) e Zhang e Fang (2001), num volume final de 12,5µL, contendo: 0,8x PCR Buffer (10 mM, Tris-HCL, pH 8,3), 0,4 mM de MgCl₂, 0,032 mM de dNTP, 0,16 mM de cada primer e 0,04 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 2 minutos para um total de 30 ciclos e uma extensão final de 72°C por oito minutos (NÜBEL *et al.*, 1996). A PCR foi realizada em termociclador AmpliTherm modelo TX96.

4.2.2.3 Verificação dos produtos da extração e da PCR

Os produtos da extração e da reação de PCR foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% com a adição dos corantes *GelRed*TM e *Blue Juice* para auxiliar na visualização das bandas. Além disso, foi utilizado o marcador molecular de 1kb *ladder* (Sigma®) para visualizar o tamanho dos amplicons gerados.

Cada *mix* (amostras acrescidas dos corantes e marcador) foi colocado em poços do gel de agarose. A migração das moléculas no gel (corrida) foi feita sob voltagem de 120V/cm³, amperagem de 120mA por um período de 60 minutos em solução tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 45 mM; EDTA 1 Mm, pH 7,8). Após a corrida, os géis (extração e PCR) foram fotodocumentados em sistema Kodak EDAS290.

4.2.2.4 Sequenciamento do DNA bacteriano

Após a amplificação, as amostras foram sequenciadas por ciclagem pelo método modificado de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) utilizando o *BigDye*®

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), seguindo recomendações do fabricante.

Os produtos da reação do sequenciamento foram purificados por precipitação em isopropanol/etanol líquidos, aplicados e lidos em um sequenciador automático capilar ABI PRISM 3500 (*Applied Biosystems*).

4.2.2.5 Alinhamento das sequências geradas

Os produtos do sequenciamento foram analisados quanto à similaridade dos nucleotídeos gerados utilizando o software MEGA (TAMURA *et al.*, 2013) versão 6. E posteriormente comparados a sequências previamente publicadas no banco de dados do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4.3 Verificação de potenciais fenótipos de virulência nas estirpes bacterianas selecionadas

A determinação do perfil potencial de virulência das estirpes bacterianas foi realizada através da detecção de enzimas extracelulares relacionadas a patogenicidade. A produção dessas enzimas foi verificada por meio da utilização de meios de cultura específicos. Para padronizar os inóculos, em cada meio foram utilizados 4µL de cada estirpe previamente crescidas em caldo LB com água do mar a 10ppm, a 35°C por 24 horas.

4.3.1 Elastase

O teste foi feito de acordo com metodologia descrita por Rust, Messing e Iglewski (1994). As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas contendo meio de cultura Ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA) com elastina (0,3%) e incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação o resultado foi avaliado pela presença ou não de um halo transparente ao redor do inóculo.

4.3.2 Gelatinase

O teste foi feito de acordo com metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (1993). As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura PCA com

0,5% de gelatina e incubadas a 35°C por até 7 dias. Para verificar os resultados foi adicionada uma solução saturada de sulfato de amônio sobre o meio, essa solução revelou a presença ou não de um halo transparente ao redor do inóculo.

4.3.3 Caseinase

As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura Ágar Leite (Ágar ágar acrescido de 2% de leite em pó desnatado) e incubadas a 35°C por até 5 dias. O resultado foi avaliado pela presença ou não de um halo transparente ao redor do inóculo (RODRIGUES *et al.*,1993).

4.3.4 Fosfolipase

O teste foi feito de acordo com metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (1993). As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura PCA com 1% de solução de gema de ovo e incubadas a 35°C por até 7 dias. O resultado foi avaliado pela presença ou não de um halo opalescente ao redor do inóculo.

4.3.5 Lipase

As estirpes bacterianas foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura PCA com 1% de Tween 80 e incubadas a 35°C por 24 horas. O resultado foi avaliado pela presença ou não de um halo opaco ao redor do inóculo (RODRIGUES *et al.*,1993).

4.4 Testes de estabilidade a estresses

4.4.1 Termorressistência

A estirpes bacterianas foram inoculadas em tubos contendo caldo LB feito com água do mar 10ppm e incubadas em duas temperaturas: 4°C (geladeira) e 40°C (banho-maria) por até 48 horas. Após o período de incubação os resultados foram analisados pelo crescimento ou não de cada estirpe, pela turvação do meio, nas diferentes temperaturas, adaptado de Cai *et al.* (1999).

4.4.2 Teste de tolerância a variação de pH

A estirpes bacterianas foram inoculadas em tubos contendo caldo LB feito com água do mar 10ppm com valores de pH diferentes (5,0 e 9,0) e incubadas a 35°C por até 48 horas. Após o período de incubação os resultados foram analisados pelo crescimento ou não de cada estirpe, pela turvação do meio, nos diferentes valores de pH, adaptado de Cai *et al.* (1999).

4.5 Teste de aderência em microplaca de poliestireno (TMC)

O teste de agregação em microplacas de poliestireno foi adaptado do protocolo proposto por Christensen *et al.* (1985).

As estirpes bacterianas foram inoculadas em caldo LB 10ppm e incubadas a 35°C por 48 horas, após esse período foram inoculadas em microplacas de poliestireno de 96 poços estéreis com fundo em “u”.

As estirpes foram inoculadas em triplicata com cada poço contendo 200µL. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Após esse período, os inóculos foram removidos da placa e os poços lavados com água destilada 3 vezes, posteriormente, a placa foi seca em estufa de 60°C por 1 hora.

Após a secagem, foi adicionado em cada poço 200µL de solução de cristal violeta a 1% e deixado em temperatura ambiente por 1 minuto. Após esse período, os poços foram novamente lavados com água destilada 3 vezes e a placa seca em temperatura ambiente.

A análise do resultado consistiu na verificação da presença ou não de um anel de coloração roxa aderido as paredes dos poços, onde estava o inóculo bacteriano.

4.6 Antibiograma

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado seguindo as recomendações do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Para isso, as estirpes bacterianas foram renovadas em ágar PCA com água do mar a 10ppm e incubadas em estufa de 35°C por 24 horas.

As estirpes renovadas foram ajustadas a escala 0,5 de McFarland em solução salina 1% com auxílio de espectrofotômetro, com leitura feita com comprimento de onda de 625nm. Essa escala equivale a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Cada estirpe ajustada foi inoculada em placa de petri contendo meio de cultura Ágar Muller Hinton (MH) com o auxílio de um *swab* estéril, de modo que o inóculo faça um tapete sobre a superfície do meio.

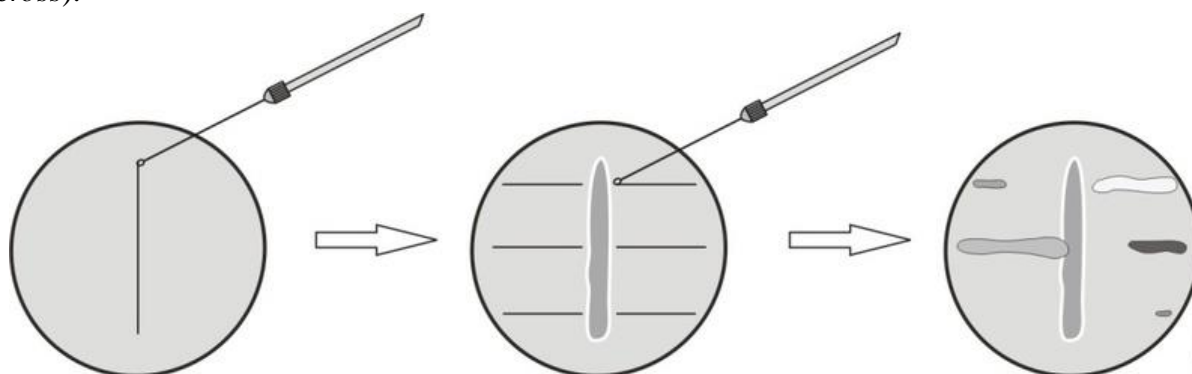
Sobre o inóculo foram colocados os discos comerciais dos antimicrobianos Cloranfenicol (30µg), Florfenicol (30µg) e Oxitetraciclina (30µg) e posteriormente as placas foram incubadas em estufa de 35°C por 24 horas. Após esse período, o resultado foi verificado utilizando um paquímetro digital para a medição dos halos de inibição ao redor dos discos, para determinar a sensibilidade ou resistência da bactéria.

4.7 Testes de Antagonismo

Os testes de antagonismos foram feitos pelo método de estrias cruzadas (*streak cross*), adaptado de Williston, Zia-Walrath e Youmans (1947).

As estirpes a serem testadas foram renovadas em caldo LB 10ppm a 35°C por 24 horas. Para o teste de antagonismo as estirpes renovadas foram estriadas em placas de PCA 10ppm de acordo com a representação na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do teste de antagonismo por estrias cruzadas (*streak cross*).



Fonte: TÓTH *et al.*, 2013.

A estirpe a ser testada frente as outras foi inoculada na estria central, as demais estirpes foram inoculadas perpendiculares a estria central, mantendo uma distância de 1cm da mesma. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e o resultado foi verificado pela inibição do crescimento da estria central (antagonismo positivo) ou o encontro da estria perpendicular com a central (antagonismo negativo).

4.7.1 Teste de antagonismo frente a patógenos

No antagonismo frente a patógenos conhecidos da carcinicultura, foram colocadas nas estrias centrais as cepas de *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950.

Com este teste é possível selecionar estirpes com potencial de inibição de estirpes patogênicas para o organismo hospedeiro.

4.7.2 Teste de antagonismo entre estirpes

Para este teste de antagonismos, só foram utilizadas as estirpes selecionadas a partir da triagem feita com base nos resultados dos testes anteriores, tanto na estria central como nas perpendiculares.

Esse teste é de grande relevância para a formação dos consórcios, pois indica quais bactérias podem ser mantidas no mesmo grupo de modo que nenhuma interfira na sobrevivência das outras.

4.8 Seleção dos consórcios

A seleção das estirpes formadoras dos consórcios foi feita por meio de triagem com base as respostas das mesmas aos testes a que foram submetidas.

Na Figura 3 estão representados os critérios utilizados na triagem para a formação dos consórcios probióticos.

Figura 3 – Fluxograma com critérios utilizados para a seleção das estirpes formadoras dos consórcios probióticos.



Fonte: Próprio autor.

4.9 Reativação das estirpes

Para reativação, as estirpes probióticas selecionadas nos testes anteriores foram inoculadas em caldo LB e incubadas a 35°C por 24 horas e posteriormente inoculadas em Ágar Triptona de Soja (TSA), sem adição de sal (NaCl), também incubadas a 35°C por 24 horas.

Este teste foi feito para verificar a capacidade dessas bactérias de crescer em meios com menor salinidade para que eles fossem utilizados nos testes posteriores.

4.10 Teste de Protocolo de Liofilização

Para analisar a capacidade de resistências das bactérias selecionadas para os consórcios ao processo de liofilização as estirpes foram crescidas em 200mL de caldo LB e incubadas em agitador *shaker* com rotação de 100 RPM por 24 horas a 30°C. Após a incubação,

os caldos foram centrifugados em tubos tipo *Falcon* de modo a concentrar as células em *pellets*, descartando o sobrenadante (Condições de centrifugação - 5.000 x g por 10 minutos a 25°C).

Os *pellets* foram ressuspensos em 50mL de solução salina 0,85% de NaCl e transferidos para balões de vidro estéreis e levadas a freezer a -20°C por 24 horas e então liofilizadas em bomba de alto vácuo (marca Edwards, modelo E2M8).

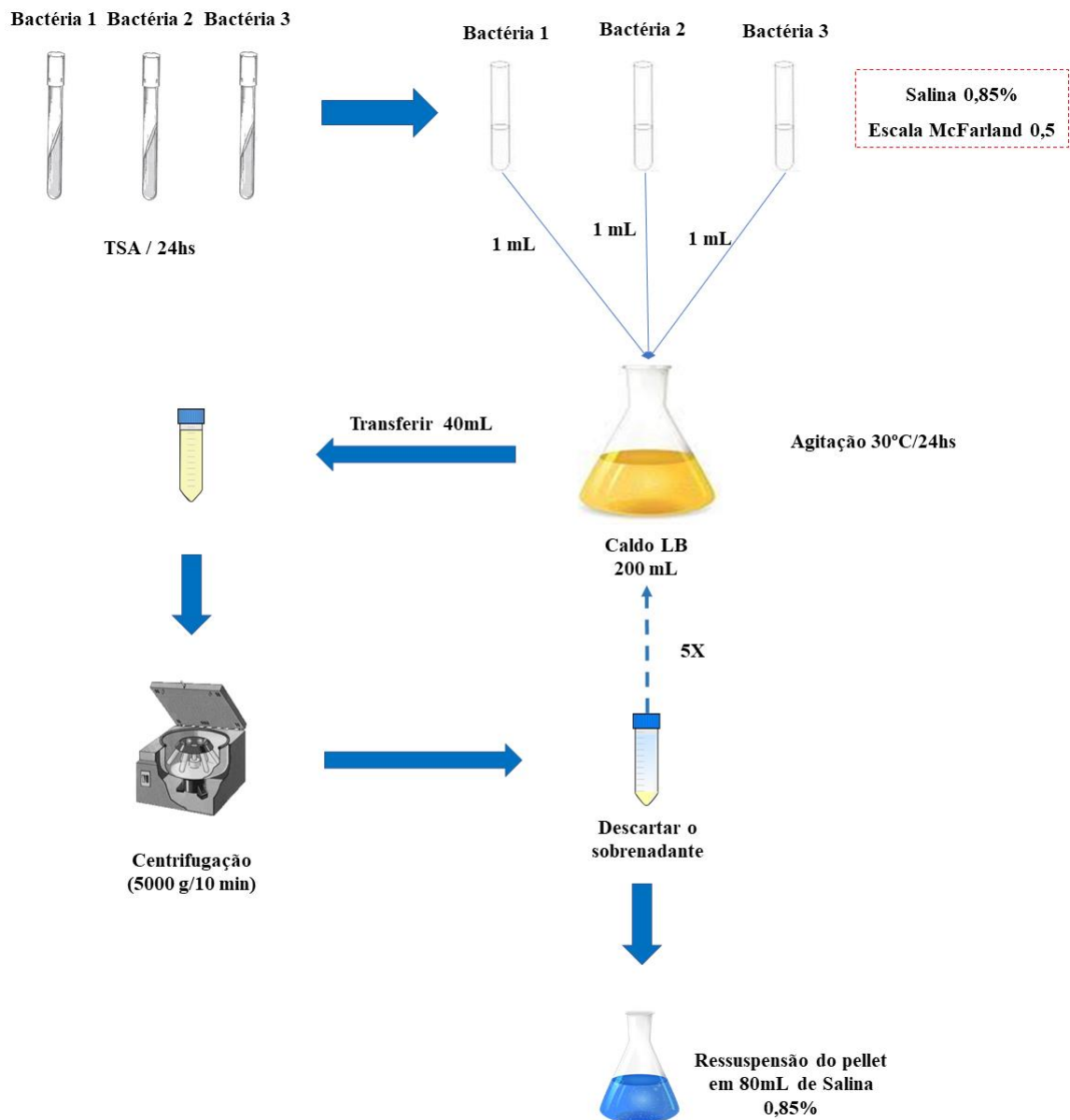
Para a reativação das estirpes liofilizadas foram passados 0,01g de cada bactéria e inoculados em solução salina 0,08% de NaCl (10^{-1}) e deixados a temperatura ambiente por 30 minutos para reidratação das células. Após esse período foram feitas diluições seriadas e alíquotas de 1mL das diluições foram inoculadas pela técnica do *Pour-plate* utilizando meio TSA. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas.

4.11 Formação dos consórcios e concentração das células bacterianas

Dentre as estirpes com potencial probiótico foi possível formar três consórcios. Para a montagem dos consórcios e concentração das células foi aplicada uma metodologia adaptada de Sheu e Marshall (1993). As estirpes foram crescidas em tubos com TSA a 35°C por 24 horas e então a concentração de cada uma delas foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland em solução salina 0,85% de NaCl. A partir dos inóculos padronizados de cada estirpe foram retirados 1mL e transferidos para um Erlenmeyer contendo 200mL de caldo LB. As amostras foram incubadas em agitador *shaker* com rotação de 100 RPM por 24 horas a 30°C. Após a incubação, os caldos foram centrifugados em tubos tipo *Falcon* de modo a concentrar as células em *pellets*, descartando o sobrenadante (Condições de centrifugação - 5.000 x g por 10 minutos a 25°C).

Ao término do processo os *pellets* de cada consórcio foram ressuspensos em 80mL de solução salina 0,85% na NaCl. A partir dessa solução foi feita a quantificação e a imobilização. A metodologia utilizada está representada na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma da metodologia aplicada para a formação dos consórcios e concentração das células bacterianas.



Fonte: Próprio autor.

4.11.1 Quantificação do concentrado bacteriano

Considerando as soluções ressuspensionadas como as diluição 10^{-1} , foram feitas diluições seriadas até a diluição 10^{-6} em solução salina 0,85% de NaCl.

A quantificação foi feita pelo método de contagem padrão em placas (CPP), as diluições foram plaqueadas pela técnica *Pour-plate* utilizando o meio TSA. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e após esse período foram realizadas as contagens.

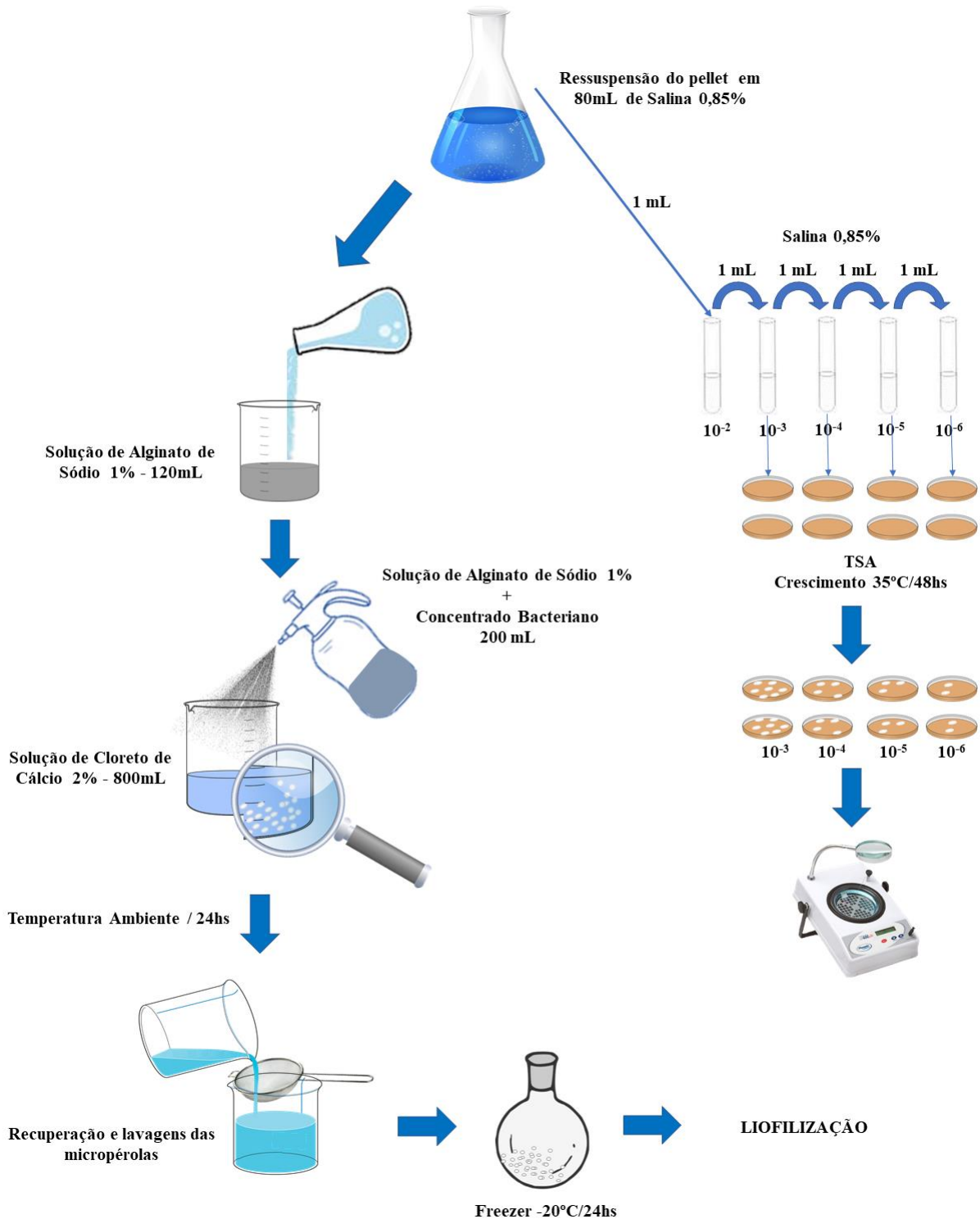
4.12 Imobilização dos consórcios probióticos (Microencapsulamento)

A imobilização dos consórcios probióticos foi feita por encapsulamento em micropérolas de alginato de cálcio adaptado de Amine *et al.* (2014).

Dois gramas de alginato de sódio foram diluídos em 120mL de água destilada estéril, e levado ao agitador magnético por 3 horas para solubilização total. Após esse período, os 80mL (4.11) do concentrado bacteriano ressuspendido foi adicionado à solução de alginato de sódio fazendo com que a concentração final de alginato fosse igual a 1%. A solução de alginato de sódio e concentrado bacteriano foi transferida para um pulverizador de compressão prévia (marca Top Garden) e então aspergida em 800mL de solução de cloreto de cálcio a 2% para o microencapsulamento das células bacterianas.

As micropérolas foram conservadas na solução de cloreto de cálcio 2% por até 24 horas, sendo posteriormente separadas por filtração em peneira com malha de 60 μ m e lavadas com água destilada estéril. As pérolas foram transferidas para balões de vidro estéreis e levadas a freezer ao -20°C por 24 horas e então liofilizadas em bomba de alto vácuo (marca Edwards, modelo E2M8). O material liofilizado foi armazenado em tubos estéreis à temperatura ambiente. Esse processo foi repetido para cada consórcio probiótico (FIGURA 5).

Figura 5 – Fluxograma da metodologia aplicada para a microencapsulamento dos consórcios probióticos e quantificação do concentrado bacteriano.



Fonte: Próprio autor.

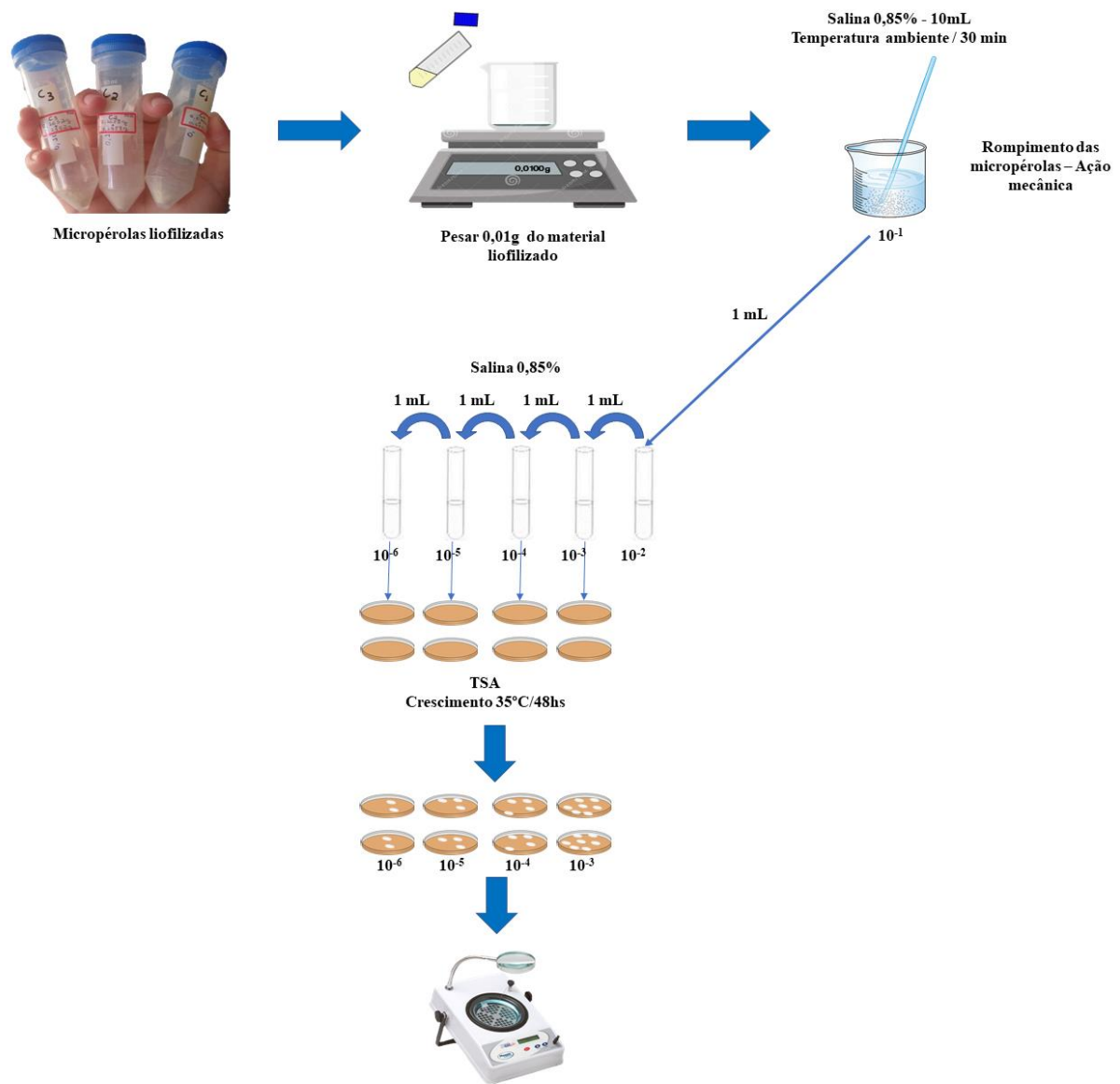
4.12.1 Recuperação das micropérolas liofilizados e Quantificação

Para a reativação do material liofilizado, foi aplicada a metodologia adaptada de Sheu, Marshall e Heymann (1993). Foram pesados 0,01g de cada consórcio e ressuspensos em 10mL de solução salina a 0,85%, essa solução equivaleu a diluição 10^{-1} . Essa solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos para a reidratação do material. Após esse período, as micropérolas foram rompidas por ação mecânica, com o auxílio de bastões de vidro, de modo a liberar as células encapsuladas para então serem feitas as demais diluições.

Foram feitas diluições seriadas até a diluição 10^{-8} e foram plaqueadas utilizando a técnica de *Pour-plate* e o meio TSA. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e após esse período foram realizadas as contagens (FIGURA 6).

As pérolas reidratadas também foram visualizadas em microscópio ótico para análise da sua estrutura.

Figura 6 – Fluxograma da metodologia aplicada para a recuperação e quantificação da micropérolas liofilizadas.



Fonte: Próprio autor.

4.12.2 Rendimento de Encapsulamento (RE)

O rendimento de encapsulamento (RE) nas pérolas representa o nível de recuperação de bactérias viáveis após todo o processo de encapsulamento, ele é calculado seguindo a Fórmula 1. Em que $N_{Pérolas}$ equivale ao total de células viáveis recuperadas das pérolas e $N_{Suspensão}$ equivale ao total de células viáveis do concentrado ressuspensionado em salina (AMINE *et al.*, 2014).

$$RE_{Pérolas} = \left(\frac{N_{Pérolas}}{N_{Suspensão}} \right) \times 100 \quad (\text{FÓRMULA 1})$$

4.13 Teste *in vivo*

Os testes *in vivo* foram realizados no Laboratório Multiuso do Centro de Diagnostico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM, localizado no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

Foram utilizados camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* da linhagem SPF (Specific Pathogen Free) com peso médio de 8g, cedidos pelo Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - LANOA.

O delineamento experimental foi feito inteiramente casualizado, e composto por cinco grupos experimentais, dois controles e três tratamentos, que foram nomeados e suplementados da seguinte maneira:

- Controle 1 – C1 (Apenas ração/Sem infecção no teste desafio);
- Controle 2 – C2 (Apenas com a ração/Com infecção no teste desafio);
- Tratamento 1 – T1 (Ração + Consórcio 1/ Com infecção no teste desafio);
- Tratamento 2 – T2 (Ração + Consórcio 2/ Com infecção no teste desafio);
- Tratamento 3 – T3 (Ração + Consórcio 3/ Com infecção no teste desafio).

Os camarões foram dispostos em aquários de 80-100 litros, cada grupo foi composto por seis aquários (repetições) e em cada aquário foram colocados seis indivíduos, num total de trinta aquários e 180 indivíduos.

A água dos aquários era renovada a cada dois dias em 50% do volume, diariamente era feita a retirada de fezes, restos de ração e muda pela técnica de sifonamento.

Baseado em dados obtidos por Antunes *et al.* (2018) foi definida uma taxa de arraçamento de 5% da biomassa total, para obter o máximo de produtividade. A ração foi ofertada duas vezes ao dia (9:00h e 15:00h) durante todo o período do experimento (30 dias).

Biometrias foram realizadas a cada 10 dias para acompanhar o desempenho zootécnico dos camarões e recalculando a oferta de ração. Durante todo o período do experimento foram observadas as características comportamentais dos indivíduos (letargia, anorexia, diminuição da capacidade natatória).

4.13.1 Preparo da Ração

Os consórcios liofilizados foram ressuspensos em água de estuário a 23ppm captada do mesmo reservatório que abastecia os aquários do cultivo, para reativação. O volume utilizado para ressuspender cada consórcio variou de acordo com a concentração de células obtida da quantificação no item 4.11.1 para que fosse padronizado a quantidade de bactérias disponibilizadas nos diferentes tratamentos.

Após a reativação, os consórcios foram adicionados a ração seguindo a proporção de 100mL de inóculo líquido por quilo de ração (VIEIRA *et al.*, 2016).

Para a adição dos probióticos na ração, a concentração dos inóculos bacterianos dos consórcios foi ajustada tomando como base o consórcio que apresentou quantificação mais baixa (Consórcio 1 – 10^7 UFC/g). Desta forma, a oferta de probióticos a todos os grupos do experimento foi padronizada em 10^7 UFC por quilo de ração.

As rações com os consórcios foram secas a temperatura ambiente sob incidência solar por 3 horas e acondicionada em recipientes fechados e armazenadas em geladeira (4°C).

Foi utilizada ração comercial 35% de proteína bruta.

4.13.2 Taxa Final de Sobrevivência

Diariamente foi observado o número de indivíduos vivos/mortos nos aquários e registrado para o cálculo da Taxa final de Sobrevivência seguindo a fórmula descrita por Bautista-Teruel, Eusebio e Welsh (2003) (FÓRMULA 2):

$$\text{Sobrevivência}_{(\%)} = \frac{\text{Número final de camarões}}{\text{Número inicial de camarões}} \times 100 \quad (\text{FÓRMULA 2})$$

4.13.3 Teste Desafio

Ao término dos 30 dias de experimento, os camarões cultivados foram desafiados frente a estirpe patogênica *Vibrio harveyi* ATCC 14126.

A escolha da estirpe *Vibrio harveyi* como patógeno para infecção dos camarões foi baseada em resultados obtidos por Xia *et al.* (2015) que ao analisar a via de infecção e a dose infectante dos patógenos *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus* em camarões, concluíram que o *V. harveyi* era a mais virulenta para os animais.

Para o teste desafio cinco galões de 50L foram lavados e desinfetados com cloro granular a uma concentração de 5ppm. Cada galão recebeu 30L da mesma água utilizada para abastecer os aquários. Em cada galão foram colocados todos os espécimes de cada grupo experimental.

Em todos os galões foi adicionado volume de 100mL do inoculo bacteriano em concentração inicial correspondente ao valor 10 da escala de McFarland (3×10^9 UFC/mL) para atingir concentração final de 10^7 UFC/mL (XIA *et al.*, 2015; SAULNIER *et al.*, 2000).

A exposição dos animais ao microrganismo patógeno foi feita por imersão, por um curto período de contato – 1 hora, após essa hora os camarões foram devolvidos para seus respectivos aquários para evitar possível reinfecção bacteriana durante o período experimental (SAULNIER *et al.*, 2000).

Após a infecção, nos dias que decorreram o processamento, os camarões continuaram a ser alimentados com a mesma ração ofertada ao longo do experimento.

4.14 Análise dos animais após exposição ao patógeno

Ao término da infecção foram iniciadas as amostragens, que ocorreram nos tempos: T_0 (imediatamente após a infecção), T_{24} (24 horas após a infecção), T_{48} (48 horas após a infecção) e T_{72} (72 horas após a infecção).

Para isso, em cada tempo, 6 animais de cada grupo foram levados para análise no LAMAP.

4.14.1 Contagem Total de Hemócitos (CTH)

A hemolinfa foi extraída de cada animal com uma seringa para insulina (100UI) por meio de uma punção ventral direta entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal (LIGHTNER, 1996). Para cada grupo foi feito um *pool*, esse *pool* foi diluído a uma proporção de 1 parte de hemolinfa para 9 de anticoagulante de Alsever modificado (9mM.L^{-1} EDTA; 27mM.L^{-1} citrato de sódio; 336mM.L^{-1} cloreto de sódio; 115mM.L^{-1} glicose).

A Contagem Total de Hemócitos (CTH) foi feita usando uma câmara de Neubauer em microscópio ótico (Olympus CX31) com objetiva de 10x.

Para a obtenção do resultado foi necessário calcular a média dos hemócitos contados nos quatro quadrantes da câmara, esse valor foi então aplicado na seguinte fórmula (FÓRMULA 3):

$$CTH = Média_{quad} \times 10 \times 10^4 \quad (\text{FÓRMULA 3})$$

Em que Média_{quad} é a média das células contadas nos quatro quadrantes, 10 corresponde a diluição 1:9 e 10⁴ corresponde a multiplicação de 10 (altura da câmara) vezes 10³ (conversão de mm³ para mL).

4.14.2 Contagem Padrão em Placa (CPP) – BHC e *Vibrio*

A análise da microbiota intestinal dos camarões foi feita de maneira diferencial para a microbiota residente (intestino) e transitória (conteúdo intestinal). Para isso os camarões foram insensibilizados por choque térmico em banho de gelo e então, assepticamente, os intestinos foram extraídos.

O conteúdo foi removido do intestino delicadamente com o auxílio de espátulas estéreis. O conteúdo intestinal dos seis indivíduos de cada grupo foi adicionado em um único microtubo contendo 1mL de água do mar 10ppm (*pool*), essa foi considerada a diluição 10⁻¹.

Depois de retirado o conteúdo, o tecido intestinal seguiu para uma sequência de três lavagens: solução salina 0,85% – álcool 70° – solução salina 0,85%, para reduzir quaisquer resíduos que ainda poderiam haver do conteúdo intestinal. Após as lavagens os intestinos foram colocados no mesmo microtubo contendo 1mL de água do mar a 10ppm (*pool*). A amostra de tecidos dos intestinos foi macerada com auxílio de bastões de vidro estéreis e então transferida para tubos contendo 9mL de água do mar 10ppm (10⁻²), a partir da qual foram feitas as demais diluições.

Para as contagens das BHC, alíquotas de 1mL das diluições foram inoculadas pela técnica do *Pour-plate* utilizando meio TSA e incubadas a 35°C por 48 horas.

Para as contagens de *Vibrio* spp. alíquotas de 200µL das diluições foram inoculadas pela técnica do *Spread-plate* sobre a superfície do meio ágar TCBS (Ágar de Tiosulfato, Citrato, Bilis e Sacarose) - meio de cultura seletivo para bactérias do gênero *Vibrio* – com auxílio de alças de *Drigalski*, as placas foram incubadas a 28°C por 24 horas.

4.15 Quantificação viral (WSSV e IMNV)

A verificação da carga viral foi realizada a partir de camarões coletados em momento anterior ao início do povoamento dos aquários (amostra inicial) e dos animais pertencentes aos cinco grupos experimentais após o término do teste *in vivo*.

Para a extração de DNA e RNA os pleópodos dos crustáceos foram coletados assepticamente, lavados com água destilada e macerados em gral com auxílio de pistilo, estéreis.

Alíquotas desse material macerado foram transferidas para microtubos de 1,5mL, um microtubo para extração de DNA (WSSV) e um para extração de RNA (IMNV).

4.15.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico total foi utilizado o reagente DNazol (Invitrogen®), seguindo metodologia do fabricante. As amostras foram colocadas em microtubos de 1,5mL contendo 500µL do reagente DNazol, agitadas em vortex por 20 segundos e deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 RPM/10min à temperatura ambiente. O sobrenadante (aproximadamente 500µL) foi recuperado em outro microtubo de 1,5mL, no qual foi sobreposto 500µL de álcool etílico absoluto.

Os microtubos foram cuidadosamente invertidos de 3 a 6 vezes e deixados em repouso por 3 minutos e centrifugados a 13.000 RPM/5 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. As amostras foram então lavadas com 500µL de álcool etílico 95%, invertendo-se algumas vezes para posteriormente serem centrifugadas a 13.000 RPM/5min. O álcool etílico foi descartado cuidadosamente e os microtubos invertidos sobre um papel toalha afim de maximizar o processo de secagem à temperatura ambiente (15 a 25°C) por 10 minutos.

O DNA das amostras foi ressuspendido em 200µL de NaOH 8 mM e 20µL de HEPES. O DNA total foi quantificado por espectrometria, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific).

4.15.2 Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído com a utilização do reagente Trizol (Invitrogen®), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante.

Inicialmente, o material biológico foi lavado com uma solução de Tris-HCl (10 mM, pH 7) e colocado em microtubos de 1,5mL contendo 500µL de Trizol. As amostras foram maceradas e depois incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio às amostras, agitando-as vigorosamente durante 15 segundos.

Em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 min. Para

a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM/15 min a 4°C. Cuidadosamente, 450µL da fase superior (RNA total) foi transferida para um tubo de 1,5mL, no qual foi adicionado 500µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a 30°C, e centrifugadas a 12.000 RPM/10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por inversão, tomando-se os devidos cuidados para não se perder o *pellet*. As amostras foram lavadas com 1mL de álcool etílico 75%, agitadas em vórtex e centrifugadas a 7.500 RPM/5 min a 4°C. O álcool etílico foi descartado cuidadosamente e os tubos invertidos sobre um papel toalha para secagem à temperatura ambiente durante 10 minutos. O RNA total foi dissolvido em 50µL de água ultrapura (Invitrogen®).

O RNA total foi quantificado por espectrometria, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific). Antes da síntese do cDNA, o RNA foi incubado a 100°C por 5min para a desnaturar as dsRNAs e posteriormente resfriado em gelo.

O cDNA foi sintetizado com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies®) em um volume de 20µL de reação final contendo 2µL de *RT Buffer* (10×), 0,8µL de *dNTPs mix* (25×), 2µL de *RT random primers* (10×), 1µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U) e 1µg de RNA total diluído em água ultrapura (Invitrogen®). As amostras foram incubadas em termociclador a 25°C/10 min, seguidos de 37°C/120min e 85°C/5min.

4.15.3 PCR em Tempo Real (TaqMan®)

Para a quantificação do número de cópias virais por qPCR ou qRT-PCR (TaqMan®) foi utilizada a metodologia, *primers* e sondas de hidrólise descritas nos manuais da OIE, para WSSV e IMNV (QUADRO 4) (OIE, 2019a; OIE, 2019b; ANDRADE *et al.*, 2007; POULOS; LIGHTNER, 2006).

As reações foram realizadas em um volume final de 10µL contendo 5µL do *Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen®), 0,3µL (10 µM) de cada primer; 0,15µL (10 µM) da sonda de hidrólise, 0,2µL (50×) do corante de referência Rox, 1µL (10-25 ng) de DNA ou cDNA e 3,05µL de água ultrapura (Invitrogen®).

Um controle negativo (reação contendo todos os reagentes, exceto cDNA ou DNA) e uma série de diluição do controle positivo (plasmídeos do banco de controle positivo do CEDECAM) equivalente a 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ cópias virais foram incluídas em cada termociclagem para a construção das curvas padrão de quantificação.

Para a detecção e quantificação dos patógenos foi utilizada a plataforma *ABI 7500 Real-time PCR systems* (Applied Biosystems®). As amplificações foram obtidas a partir das

seguintes condições de termociclagem: 50°C/2min; 95°C/2min; seguidos de 40 ciclos de 95°C/15s e 60°C/30s.

O número de cópias virais de cada amostra foi determinado com o software *7500 systems SDS 1.3.1* (Applied Biosystems®). As amostras foram testadas em duplicata e o resultado somente considerado positivo quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

Quadro 2 - Primers e Sondas utilizados para Detecção e Quantificação de WSSV e IMNV.

	ID Primer	Sequência 5'-3'	Amplicon	Acesso GenBank
WSSV	WSS1011F	TGGTCCCGTCCTCATCTCAG	69 pb	AF332093
	WSS1079R	GCTGCCTTGCCGGAATTA		
	Sonda TaqMan® WSSV	FAM-AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA-TAMRA		
IMNV	IMNV412F	GGACCTATCATACATAGCGTTTGCA	133 pb	AY570982
	IMNV545R	AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT		
	Sonda TaqMan® IMNV	FAM-CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG-TAMRA		

Fonte: ANDRADE *et al.*, 2007; POULOS; LIGHTNER, 2006.

4.16 Análise estatística

As diferenças entre os pesos, biomassa e sobrevivência foram testadas estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados, adotando 5% como nível de significância. Para diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, as médias foram comparadas duas a duas, utilizando o teste de Tukey. A análise estatística foi realizada por meio dos softwares BioEstat 5.0® e Excel 2010 (Microsoft).

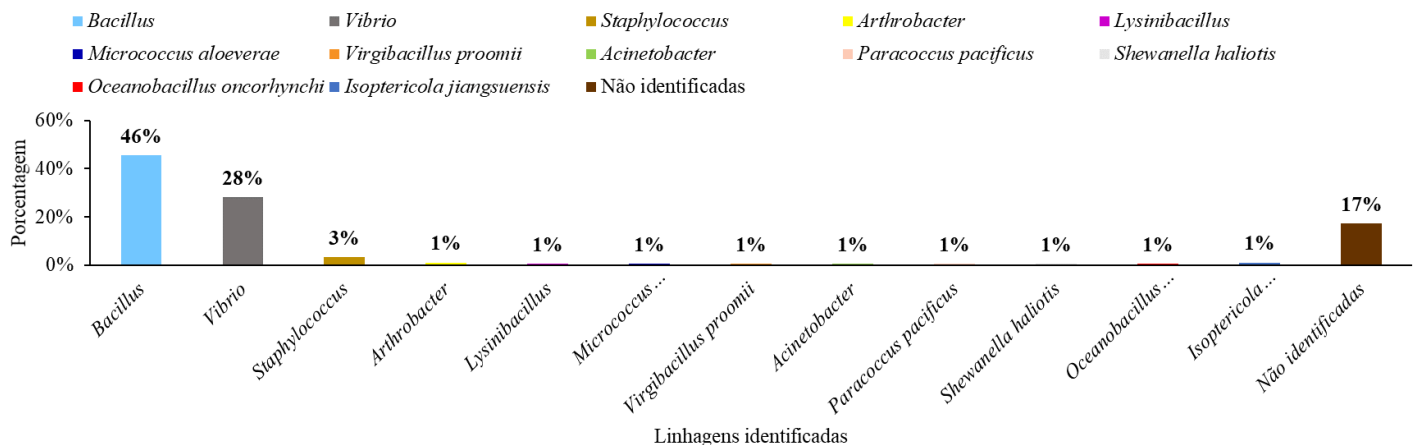
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das Estirpes Bacterianas

Foram reativadas e testadas 191 estirpes bacterianas para formação dos consórcios probióticos. A maioria delas, aproximadamente 86%, foi identificada como pertencente a 12 grupos bacterianos. Os gêneros *Bacillus* e *Vibrio* foram os mais frequentes, representando 46% e 28%, respectivamente, das estirpes identificadas (GRÁFICO 1).

A identificação de cada estirpe está descrita no (ANEXO A).

Gráfico 1 – Frequência de gêneros e estirpes bacterianas isolados do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: Próprio autor.

Dentre esses, gêneros como *Bacillus*, *Vibrio*, *Paracoccus*, *Acinetobacter* e *Shewanella* já foram encontradas no conteúdo intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (ZHANG *et al.*, 2014; VARGAS-ALBORES *et al.*, 2017).

Comparada aos percentuais das estirpes identificadas, as não identificadas apresentaram um valor percentual relativamente alto, possivelmente a região dos *primers* utilizados na reação de PCR não tenha sido adequada para amplificação de determinados grupos bacterianos, como ocorreu com Kim *et al.* (2018).

O diferencial da formação de consórcios probióticos para a carcinicultura com bactérias pertencentes aos ambientes de cultivo está na eficácia de ação das mesmas (NINAWA; SELVIN, 2009; VIEIRA *et al.*, 2013).

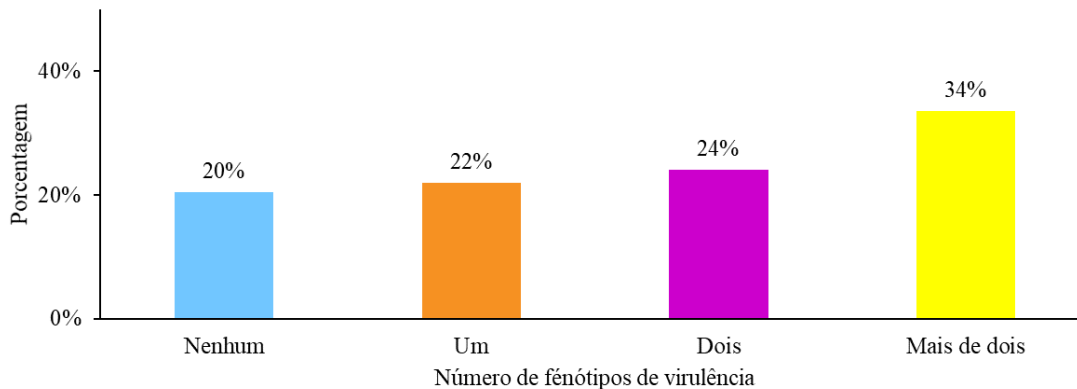
O uso de probióticos que modificam a microbiota aderida ao intestino do hospedeiro com bactérias de origens externas ao ambiente de cultivo sem análises específicas, pode ter seu efeito probiótico no organismo alvo comprometido, além de o uso destes microrganismos poder representar um risco de causar desequilíbrios ambientais, particularmente se as fazendas que os utilizam despejam seus efluentes diretamente no corpo hídrico sem tratamento prévio (VARGAS-ALBORES, *et al.*, 2017).

5.2 Detecção de fenótipos de virulência nas estirpes bacterianas selecionadas

Com base nos resultados dos testes para verificação de potenciais fenótipos de virulência, foi possível dividir as estirpes bacterianas em 4 grandes grupos: aquelas que não apresentaram fenótipos de virulência, as que apresentaram apenas um, as que apresentaram dois e, as que apresentaram três ou mais fenótipos de virulência.

No Gráfico 2 estão demonstrados os percentuais que cada grupo representa.

Gráfico 2 – Distribuição relativa de estirpes por número de fenótipos de virulência expressos.



Fonte: Próprio autor.

São denominados como fatores de virulência as funções necessárias que um patógeno precisa ter para infectar o hospedeiro e, sua expressão depende de múltiplos fatores, como a densidade (*quorum sensing*), rota de infecção, tempo de exposição e condição do hospedeiro (DEFOIRDT; SORGELOOS; BOSSIER, 2011; SOTO-RODRIGUEZ, *et al.*, 2015).

Como a produção de enzimas extracelulares por bactérias é considerada um dos principais fatores de virulência, para a seleção de uma estirpe para compor um probiótico deve-se confirmar a produção dessas enzimas para garantir que a bactéria não tenha efeito patogênico

sobre o hospedeiro, em condições normais ou de estresse (VERSCHUERE, *et al.*, 2000; BATHAEI, 2017).

Uma situação que agrava o potencial patogênico de uma bactéria é a produção de duas ou mais enzimas, pois sua interação pode acarretar um efeito sinérgico entre elas causando danos mais graves ao hospedeiro (SOTO-RODRIGUEZ, *et al.*, 2012).

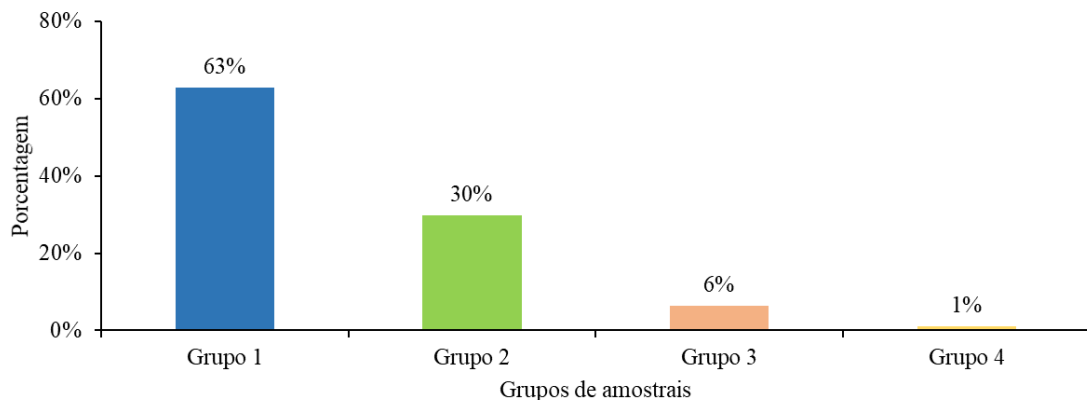
Considerando minimizar os riscos para o camarão, para as fases seguintes deste trabalho foram selecionadas apenas as estirpes que apresentaram a produção de até duas exoenzimas, o que representa 66% do total testado. A utilização das demais estirpes aumentaria o risco do efeito sinérgico entre as enzimas, aumentando assim o risco do probiótico causar danos ao hospedeiro.

5.3 Testes de estabilidade a estresses

5.3.1 Termorressistência

Do total de estirpes, 120 (63%) apresentaram capacidade de crescimento a 40°C, mas não a 4°C, 57 (30%) apresentaram crescimento nas duas temperaturas, 12 estirpes (6%) não apresentaram crescimento em nenhuma das duas temperaturas e, 2 (1%) apresentaram resultado positivo a 4°C e negativo a 40°C (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 – Percentual de estirpes dos quatro grupos formados com base nos resultados do teste de termorressistência a temperaturas extremas.



Fonte: Próprio autor.

Grupo 1 – 40°C + / 4°C - ; Grupo 2 – 40°C + / 4°C + ; Grupo 3 – 40°C - / 4°C - ; Grupo 4 – 40°C - / 4°C +.

Zokaeifar *et al.* (2012a) encontraram resultados similares ao testar estirpes bacterianas isoladas de picles fermentados para aplicação como probióticos para camarões, as bactérias tiveram melhor crescimento numa faixa de temperatura mais estreita que a feita neste trabalho (20 - 50°C), não apresentando um bom crescimento a 4°C.

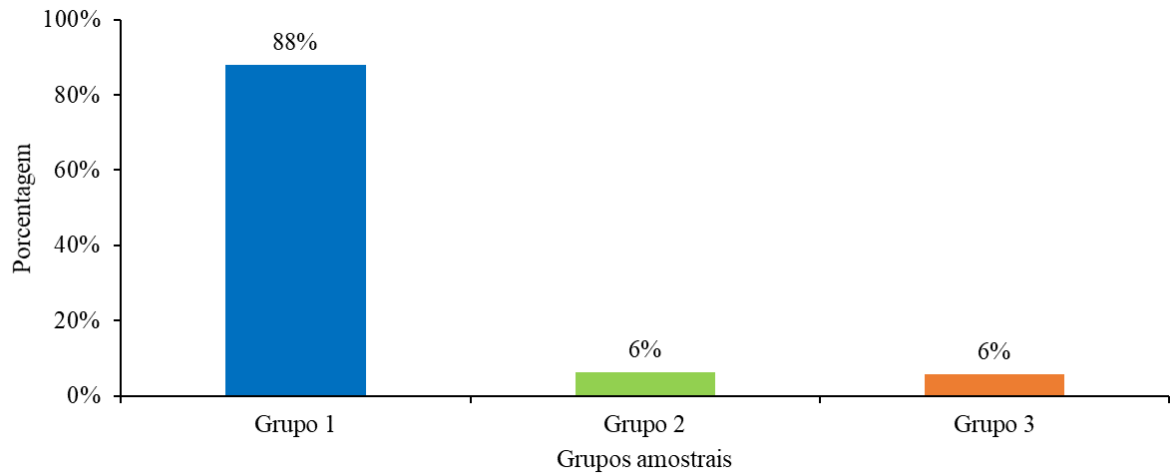
Diferente de trabalhos como de Imane e Amel (2018) que costumam submeter estirpes potencialmente probióticas a temperaturas mais elevadas, em faixas que vão de aproximadamente 30°C a 70°C, o presente estudo também verificou o crescimento das estirpes em uma temperatura mais baixa (4°C). A tolerância ao frio é uma importante característica para bactérias probióticas, pois em sua produção, armazenamento e preservação elas devem ser expostas a temperaturas baixas (centrifugação, congelamento, liofilização e armazenamento a frio) e elas precisam manter sua viabilidade e suas propriedades probióticas a essas temperaturas mais baixas (NGUYEN *et al.*, 2016).

Vinnikova, Kishenya e Strashnova (2016), testando bactérias para uso industrial, demonstraram que o crescimento das bactérias é reduzido em temperaturas mais baixas, no entanto combinações de duas ou mais estirpes bacterianas aumentam sua resistência térmica.

5.3.2 Teste de tolerância a variação de pH

Das 191 estirpes, 88% apresentaram resultado de crescimento positivo a pH 9,0 e 5,0; 6% apresentaram capacidade de sobrevivência a pH 9,0, mas não a pH 5,0; e outro grupo de estirpes (6%) cresceram quando expostas a condição de pH 5,0, mas não em pH 9,0 (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 – Agrupamento das estirpes bacterianas isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, de acordo com as respostas a diferentes condições de pH (9,0 e 5,0) no meio de cultura.



Fonte: Próprio autor.

Grupo 1 – pH 9,0 + / pH 5,0 + ; Grupo 2 – pH 9,0 + / pH 5,0 - ; Grupo 3 – pH 9,0 - / pH 5,0 +.

Em nossa pesquisa foram obtidos resultados semelhantes aos de Zokaeifar *et al.* (2012a) e Vieira *et al.* (2013) em que as estirpes bacterianas isoladas de picles fermentado e do trato intestinal de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), respectivamente, para uso como probióticos na carcinicultura apresentaram ampla faixa de tolerância a pH, em média.

A estabilidade das estirpes bacterianas é um fator essencial para sua sobrevivência no ambiente de cultivo e sua eficácia na colonização do trato intestinal do hospedeiro. Mais de 80% das estirpes testadas estão aptas a colonizar o trato intestinal de camarões, uma vez que apresentam uma ampla faixa de tolerância a variação de pH, o que aumenta a eficiência do probiótico já que a bactéria é capaz de se manter funcional mesmo em condições de estresses.

Para compor um probiótico efetivo no trato intestinal de camarões é necessário que a bactéria tolere condições ácidas, ocasionadas pelos sais biliares, para sobreviver e permanecer funcional no ambiente colonizado (ZOKAEIFAR, *et al.*, 2012a; VIEIRA, *et al.*, 2013; BANERJEE; RAY, 2017).

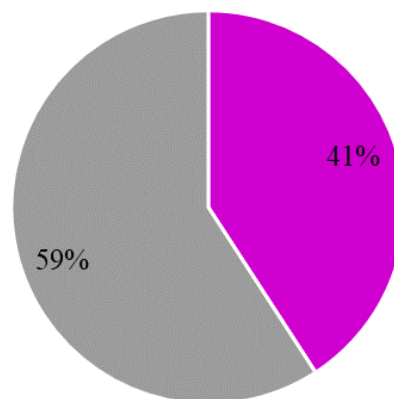
5.4 Teste de aderência em microplaca de poliestireno (TMC)

Em se tratando da competência das estirpes bacterianas probióticas foi também testada a capacidade de aderência das estirpes isoladas. Um total de 41% (~78/191) das estirpes

bacterianas testadas, apresentou aderência positiva em microplaca de poliestireno (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 – Porcentagem das estirpes bacterianas isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, de acordo com as respostas ao teste de aderência em microplaca de poliestireno.

■ Aderência Positiva ■ Aderência Negativa



Fonte: Próprio autor.

A capacidade de aderência apresentada por algumas bactérias potencialmente probióticas lhes confere a habilidade de adesão no trato intestinal do hospedeiro, a partir disso, sua ação probiótica pode ser desempenhada das seguintes maneiras: criando uma barreira protetora que bloqueia os locais de fixação de patógenos, reduzindo seu efeito nocivo e, uma vez aderidas a mucosa intestinal, elas serão responsáveis por estimular o sistema imune inato do hospedeiro (BANERJEE; RAY, 2017). A exemplo disso, tem-se a linhagem patogênica de *V. parahaemolyticus* causadora da EMS, que é encontrada mais facilmente no intestino do que no hepatopâncreas de camarões contaminados, que poderia não encontrar sítios para sua fixação uma vez que bactérias probióticas já tivessem colonizado o intestino do organismo (KONGRUENG, *et al.*, 2015). Essa afinidade do *V. parahaemolyticus* pelos tecidos do intestino em camarões também foi verificado por Rebouças (2017).

Com base nos testes anteriores, principalmente no de verificação de fenótipos de virulência e no de aderência em microplacas, foram selecionadas 62 estirpes (das 191 iniciais) para serem prosseguimento aos testes para formação de consórcios probióticos.

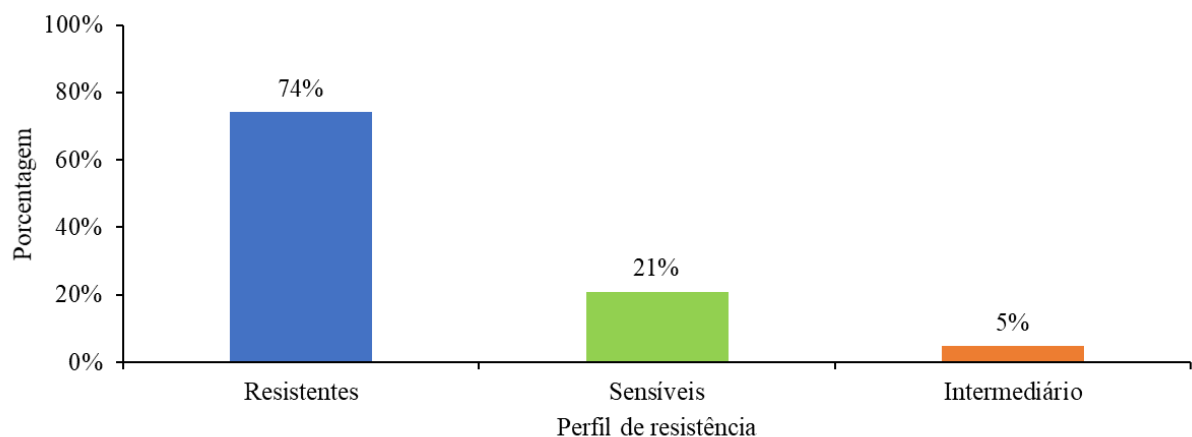
Essas 62 estirpes foram divididas em 3 grupos, seguindo os seguintes critérios: Grupo 1 – Aderência positiva e nenhum fenótipo de virulência; Grupo 2 – Aderência positiva e um fenótipo de virulência e, Grupo 3 – Aderência positiva e dois fenótipos de virulência.

Os testes seguintes foram realizados apenas para as estirpes pertencentes a estes três grupos acima.

5.5 Antibiograma

Das 62 estirpes testadas, 100% apresentou susceptibilidade aos antimicrobianos Cloranfenicol e Florfenicol, no entanto, quando testadas frente a Oxitetraciclina, a maioria das estirpes (74%) apresentou resistência ao antimicrobiano, 21% apresentaram susceptibilidade ao mesmo e, 5% apresentaram resistência intermediária (GRÁFICO 6).

Gráfico 6 – Percentual de resistência das estirpes bacterianas isoladas do intestino e conteúdo intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* quando testadas frente a Oxitetraciclina.



Fonte: Próprio autor.

O elevado índice de resistência encontrada em nosso trabalho (74%) era esperado devido ao fato de que a resistência a oxitetraciclina tem sido reportada e recorrente por muitos anos nos camarões cultivados e ambientes de carcinicultura. (TENDENCIA; PEÑA, 2001; AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006; ROCHA, SOUSA; VIEIRA, 2016).

A Oxitetraciclina é um dos três antibióticos liberados pela U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) frequentemente usada na aquicultura durante o ciclo de produção, tanto nas fases larvais quanto de crescimento para controlar doenças bacterianas, como as vibrioses (RAKESH, *et al.*, 2018).

Estirpes bacterianas resistentes a Oxitetraciclina têm sido encontradas em viveiros de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* e esse padrão de resistência foi relacionado a um

plasmídeo, fato que potencializa a disseminação e transferência horizontal desse gene (ROCHA, SOUSA; VIEIRA, 2016).

As bactérias presentes no ambiente de criação de camarão, podem apresentar características de resistência a múltiplos antibióticos. (TENDENCIA; PEÑA, 2001; AKINBOWALE; PENG; BARTON, 2006; ROCHA, SOUSA; VIEIRA, 2016).

Esses estudos confirmam que o teste de antibiograma para estirpes com potencial probiótico é de grande relevância, uma vez que a multirresistência a antibióticos causa risco a saúde pública e aos cultivos de camarões, podendo ser transferida não só entre espécie (transferência vertical) como de uma espécie para outra (transferência horizontal) (UDDIN, *et al.*, 2015; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016; BANERJEE; RAY, 2017).

A múltipla resistência em estirpes probióticas foi relatada por UDDIN *et al.* (2015) ao analisarem sete probióticos comerciais utilizados na carcinicultura, encontrando nessas bactérias genes de resistência a até quatro antibióticos pertencentes as famílias dos macrolídeos, tetraciclina, fenicois e trimetoprima.

Esses fatos favorecem a relevância dos achados nessa pesquisa em que a maior parte das cepas testadas não apresentaram característica de múltipla resistência, sendo neste quesito aptas a compor o consórcio probiótico.

5.6 Testes de Antagonismo

5.6.1 Teste de antagonismo frente a patógenos

No teste de antagonismo feito frente a estirpe patogêna de *Vibrio parahaemolyticus* nenhuma das estirpes selecionadas apresentou atividade antagônica positiva. No entanto, quando testadas frente a estirpe patogêna de *Vibrio harveyi*, 17 estirpes, aproximadamente 32% das estirpes selecionadas, apresentaram atividade positiva (ANEXO A).

O modo de ação da atividade antagônica pode ser tanto por competição quanto pela produção de enzimas inibitórias (bacteriocinas) (UDDIN *et al.*, 2015; BANERJEE; RAY, 2017). Zokaifar *et al.* (2012a), ao prospectar potenciais estirpes bacterianas probióticas para carcinicultura isoladas de picles fermentado, também as testaram frente as bactérias *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, estirpes reconhecidas como patógenos para camarão.

A atividade antagonista é considerada uma das características mais importantes quando se busca um probiótico efetivo, sendo considerada uma estirpe potencial probiótica de

sucesso aquela que apresenta atividade antagonica contra diferentes tipos de patógenos (BANERJEE; RAY, 2017).

A ausência de ação antagonica entre as cepas testadas frente ao *V. parahaemolyticus*, que tem sido reportada como um importante patógeno para a carcinicultura, não inviabiliza seu uso como probiótico, uma vez que as características metabólicas e enzimáticas das estirpes probióticas se somam. Exemplo disso é a presença de atividade de aderência que pode fazer com que o patógeno não consiga competir por espaço devido a colonização previa do consórcio probiótico.

5.6.2 Teste de antagonismo entre estirpes

Dentre as 62 estirpes selecionadas, 21 estirpes (34%) apresentaram antagonismo positivo frente a outras cepas pertencentes ao grupo (ANEXO A).

Trabalhos como de Banerjee e Ray, (2017), Zokaeifar *et al.* (2012a), Zokaeifar *et al.* (2012b), Verschuer *et al.* (2000) sugerem a realização de teste de antagonismo apenas das estirpes probióticas frente a patógenos, mas não citam o mesmo teste para ser realizado entre as estirpes que compõe os probióticos

Apesar de negligenciado, o teste de atividade antagonista entre cepas para a formação de consórcios probióticos é de extrema importância, uma vez que desconhecida a relação entre as mesmas corre-se o risco de perder a eficácia do probiótico ao unir estirpes antagonicas em um mesmo produto.

5.7 Seleção dos consórcios

Partindo da seleção de estirpes feita após o teste de aderência e tomando como base os testes anteriores, foi realizada uma triagem que tornou possível a formação de 3 consórcios probióticos.

Também foi levado em consideração que algumas espécies bacterianas do gênero *Vibrio* são reconhecidas como patógenos oportunistas para camarões marinhos cultivados (KITAOKA *et al.*, 2011; PARVATHI; MENDEZ; ANTO, 2011; ROCHA; SOUSA; VIEIRA, 2016), então todas as estirpes identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* foram eliminadas no momento da triagem para a formação dos consórcios.

Na Tabela 1 seguem as estirpes selecionadas para a formação dos consórcios e suas respectivas características.

Tabela 1 – Características e identificação taxonômica das estirpes selecionadas para formação dos consórcios.

Consórcio	Estirpes	Grupo	Fatores Virulência	Agregação	pH (9/5)	Temperatura (40°C)	Identificação
1	16	<i>Bacillus</i>	C-F	+	+	+	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	51*	Ácido Lática	C-F	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
	108	Proteolítica	G	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
	164	Celulolítica	F	+	+	+	<i>Staphylococcus cohnii</i>
2	8	<i>Bacillus</i>	C-F	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
	14	<i>Bacillus</i>	C-F	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
	52*	Ácido Lática	C-F	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
	169	Celulolítica	F	+	+	+	<i>Isoptricola jiangsuensis</i>
3	13	<i>Bacillus</i>	C-F	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
	18	<i>Bacillus</i>	C-F	+	+	+	<i>Bacillus cereus</i>
	49	Ácido Lática	C-F	+	+	+	<i>Bacillus sp.</i>
	131	Proteolítica	C-L	+	+	+	<i>Shewanella haliotis</i>
	161	Celulolítica	F	+	+	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Fonte: Próprio autor.

C – Caseinase; F – Fosfolipase; G – Gelatinase; L – Lipase.

* – Apresentaram antagonismo positivo frente ao patógeno *V. harveyi*.

O grupo ao qual pertence as estirpes também é de grande relevância para a formação do consórcio probiótico (ácido láticas, proteolíticas ou celulolíticas). Tendo em vista a produção natural de enzimas que auxiliam na digestão do hospedeiro, disponibilizando nutrientes antes não absorvidos e com efeito antimicrobiano eficaz e inerte para animais e humanos (ZOKAEIFAR, *et al.*, 2012a; ZOKAEIFAR, *et al.*, 2012b; BANERJEE; RAY, 2017).

5.8 Reativação das estirpes

Todas as treze estirpes probióticas apresentaram crescimento ótimo em meios sem a adição de NaCl. Essa modificação da composição dos meios de cultura foi feita para otimizar o protocolo de liofilização das estirpes, uma vez que o NaCl forma cristais e age como um

plastificante aumentando a quantidade de água não congelada, sendo necessário temperaturas mais baixas para a liofilização, o que dificulta todo o processo (PASSOT *et al.*, 2010).

O teste de protocolo de liofilização feito com as estirpes separadamente apresentou resultado insatisfatório, pois as bactérias não cresceram após a reativação, demonstrando que o protocolo não preservou a viabilidade das células.

A escolha da técnica de imobilização em pérolas de alginato de cálcio foi devido à sua alta capacidade de preservar a viabilidade das células durante o armazenamento e oferta, no caso de probióticos, como demonstrado por Amarante (2016), que testando diferentes técnicas de oferta de probióticos em ração comprovou a maior eficiência do probiótico bioencapsulado.

5.9 Formação e imobilização dos consórcios probióticos

5.9.1 *Quantificação da suspensão bacteriana, das micropérolas e Rendimento de Encapsulamento (RE)*

A quantificação das soluções dos concentrados bacterianos ressuspensos, das micropérolas reativadas e dos valores de rendimento de encapsulamento (RE) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da quantificação de células viáveis da suspensão bacteriana, das micropérolas e o rendimento de encapsulamento de cada consórcio.

Consórcios	Quantificação Suspensão (UFC/mL)	Quantificação Micropérolas (UFC/g)	Rendimento de Encapsulamento (RE)
1	2,195 x 10 ⁸	6,25 x 10 ⁷	28,5 %
2	2,812 x 10 ⁹	2,89 x 10 ⁸	10,3 %
3	3,8 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁹	84,2 %

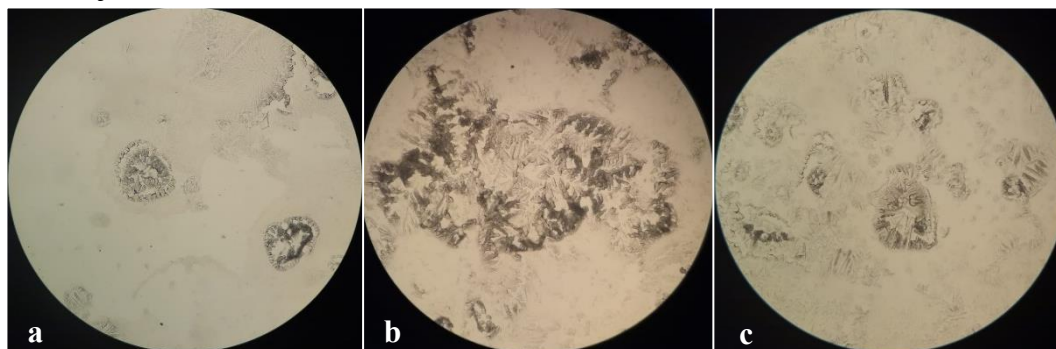
Fonte: Próprio autor.

Mesmo mantendo um valor elevado de células viáveis após a encapsulamento, o rendimento dos consórcios 1 e 2 foram relativamente baixos quando comparados ao rendimento do consórcio 3. No entanto, essa redução nas contagens não significa necessariamente um baixo rendimento de encapsulamento, esse fato pode ser decorrente da perda de viabilidade das células durante o processo de imobilização e liofilização (AMINE *et al.*, 2014). Podendo

também ser resultado da não solubilização completa das micropérolas de alginato de cálcio pela falta de utilização do tampão fosfato como descrito por Sheu, Marshall e Heymann (1993), desse modo as células viáveis encapsuladas podem não ter sido totalmente liberadas.

A morfologia das micropérolas pode ser observada na Figura 7.

Figura 7 – Fotografias das micropérolas dos consórcios reidratadas feitas em microscópio óptico em objetiva 10x.



Fonte: Próprio autor.

a – Micropérolas Consórcio 1; b – Micropérolas Consórcio 2 e c – Micropérolas Consórcio 3.

5.10 Teste *in vivo*

Ao longo do período de experimento os camarões não apresentaram sinais de necrose, anorexia ou crescimento retardado, sintomas comuns de vibrioses (FÉLIX *et al.*, 2017).

O experimento foi iniciado com camarões de aproximadamente 8g, a biomassa total (BM_T) média de cada grupo foi verificada a cada biometria, os resultados estão plotados na Tabela 3 assim como o ganho de biomassa.

Tabela 3 – Média da BM_T de cada tratamento em cada biometria realizada e ganho de biomassa final.

Grupo	Inicial	10° dia	20° dia	30° dia	30 – Inicial
C1	48,17 g	57,83 g	67,83 g	78,67 g	30,5
C2	49,00 g	56,33 g	68,33 g	79,33 g	30,33
T1	48,83 g	56,67 g	67,33 g	76,67 g	27,84
T2	49,17 g	56,83 g	66,00 g	75,33 g	26,16
T3	47,50 g	56,17 g	67,33 g	74,67 g	27,17

Fonte: Próprio autor.

C1 – Grupo Controle 1 (sem infecção); C2 – Grupo Controle 2 (com infecção); T1 – Grupo Tratamento 1 (consórcio probiótico 1 / com infecção); T2 – Grupo Tratamento 2 (consórcio probiótico 2 / com infecção); T3 – Grupo Tratamento 3 (consórcio probiótico 3 / com infecção).

A BM_T dos grupos do experimento apresentou valores semelhantes ao longo das biometrias realizadas, não apresentando diferenças significativas assim como os dados obtidos por Llario *et al.* (2019) ao testar duas concentrações diferentes de um probiótico comercial em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.

Quanto ao cálculo de sobrevivência, o menor valor encontrado foi 98,3%, sendo que os tratamentos T1 e T3 apresentaram 100% de sobrevivência.

Aplicando análise estatística sobre os valores de sobrevivência, peso médio (inicial e final) e biomassa (inicial e final) foi constatado que esses fatores não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (TABELA 4).

Tabela 4 – Análise estatística das taxas de sobrevivência, peso médio e biomassa.

Variável	C1	C2	T1	T2	T3	<i>p</i> valor
Sobrevivência (%)	98,3 ± 4,1	99,5 ± 1,3	100,0 ± 0,0	99,5 ± 1,3	100,0 ± 0,0	0,612
Peso médio inicial (g)	8,03 ± 0,37	8,17 ± 0,21	8,14 ± 0,27	8,19 ± 0,16	7,92 ± 0,31	0,400
Biomassa inicial (g)	48,2 ± 2,23	49,00 ± 1,26	48,83 ± 1,60	49,17 ± 0,98	47,50 ± 1,87	0,400
Peso médio final (g)	13,11 ± 0,63	13,22 ± 0,98	12,78 ± 1,08	12,93 ± 0,51	12,44 ± 0,62	0,508
Biomassa final (g)	78,67 ± 3,78	79,33 ± 5,89	76,67 ± 6,50	75,33 ± 4,27	74,67 ± 3,72	0,424

Fonte: Próprio autor.

C1 – Grupo Controle 1 (sem infecção); C2 – Grupo Controle 2 (com infecção); T1 – Grupo Tratamento 1 (consórcio probiótico 1 / com infecção); T2 – Grupo Tratamento 2 (consórcio probiótico 2 / com infecção); T3 – Grupo Tratamento 3 (consórcio probiótico 3 / com infecção).

Susianingsih, Kurniawan e Atmomarsono (2017) encontraram resultados semelhantes ao testar probióticos comerciais no cultivo de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), mas apesar dos valores não apresentarem diferença estatisticamente significativa, os tratamentos com uso de probióticos apresentaram sobrevivência relativamente melhor que o controle.

A falta de diferença significativa entre os pesos médios e a biomassa dos tratamentos e dos controles pode ter ocorrido em função da quantidade de probiótico administrada na ração (10^7 UFC/g), considerada relativamente baixa, uma vez que estudos indicam que melhores resultados foram obtidos com concentrações de 10^8 UFC/g (MADANI *et al.*, 2018).

5.11 Contagens Bacterianas

Após o período de cultivo (30 dias) foi realizado o teste desafio dos camarões cultivados frente a estirpe patogênica *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e os resultados foram acompanhados por meio das contagens de BHC e *Vibrio* no tecido e conteúdo intestinal dos animais.

5.11.1 Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC)

Os resultados das contagens realizadas para BHC estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Contagens de BHC no intestino e conteúdo intestinal dos camarões *Litopenaeus vannamei* expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas após exposição a bactéria *V. harveyi*.

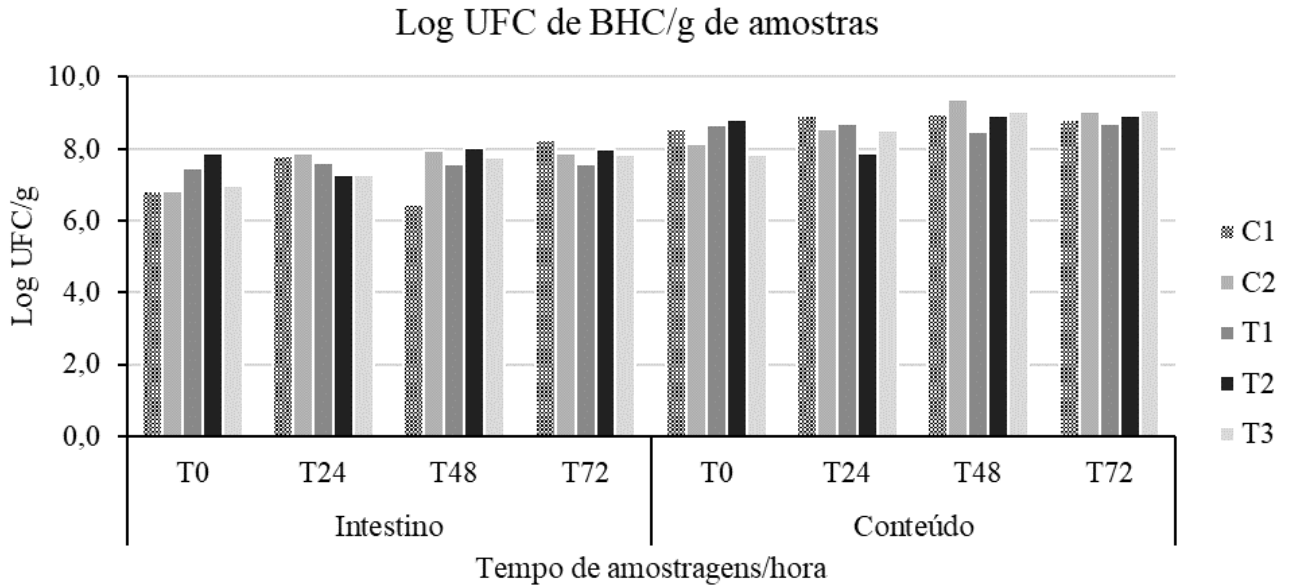
Grupos	Intestino (UFC/g)				Conteúdo (UFC/g)			
	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂
C1	6,75 x10 ⁶	6,3 x10 ⁷	2,85 x10 ⁶	1,84 x10 ⁸	3,7 x10 ⁸	8,88 x10 ⁸	8,9 x10 ⁸	6,66 x10 ⁸
C2	7 x 10 ⁶	7,38 x10 ⁷	8,76 x10 ⁷	7,84 x10 ⁷	1,41 x10 ⁸	3,68 x 10 ⁸	2,46 x10 ⁹	1,14 x10 ⁹
T1	3,04 x10 ⁷	4,24 x10 ⁷	3,76 x10 ⁷	3,73 x10 ⁷	4,77 x10 ⁸	5,26 x 10 ⁸	2,92 x10 ⁸	4,98 x10 ⁸
T2	7,68 x10 ⁷	1,92 x10 ⁷	1,11 x10 ⁸	1 x10 ⁸	6,55 x10 ⁸	7,36 x 10 ⁷	8,4 x10 ⁸	8,74 x10 ⁸
T3	9,8 x10 ⁶	1,88 x10 ⁷	5,94 x10 ⁷	7,18 x10 ⁷	7,15 x10 ⁷	3,24 x10 ⁸	1,08 x10 ⁹	1,16 x10 ⁹

Fonte: Próprio autor.

C1 – Grupo Controle 1 (sem infecção); C2 – Grupo Controle 2 (com infecção); T1 – Grupo Tratamento 1 (consórcio probiótico 1 / com infecção); T2 – Grupo Tratamento 2 (consórcio probiótico 2 / com infecção); T3 – Grupo Tratamento 3 (consórcio probiótico 3 / com infecção).

Uma melhor visualização da carga bacteriana de BHC no tecido e conteúdo intestinal dos camarões no decorrer do tempo de amostragem é possível pelo Gráfico 7.

Gráfico 7 – Contagens de BHC no tecido e conteúdo intestinal dos camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas.



Fonte: Próprio autor.

A microbiota de BHC residente do intestino apresentou, em geral, contagens inferiores àquela microbiota transitória do trato intestinal dos camarões ao longo das amostragens após a exposição ao patógeno. Forte *et al.* (2019) também encontraram resultados semelhantes ao analisar a microbiota residente e transitória de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistema de águas claras, as contagens da microbiota transitória foi quarenta vezes maior que as da residente. Esse resultado pode ser em função da microbiota intestinal dos camarões ser um nicho aberto (sem competição) para espécies bacterianas transitórias que estão dispersas na água, devido a estresses ambientais que afetam a composição da microbiota intestinal dos camarões (ZHU *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2018). As contagens mais elevadas na microbiota transitória que na residente também sugerem que um pequeno número de bactérias está aderindo ao tecido intestinal (DEMPSEY; KITTING; ROSSOM, 1989).

Utilizando o C1 como parâmetro para comparação dos demais tratamentos, uma vez que não foi infectado e apresenta camarões saudáveis, é esperado que as demais contagens bacterianas apresentem comportamento semelhante às suas contagens. Os tratamentos T1 e T3 se destacam ao apresentarem variações mais suaves no decorrer dos tempos amostrais comparado aos demais grupos.

É possível observar que a tendência das contagens do conteúdo intestinal é

aumentar a partir do T₄₈. Esse fato pode ser decorrente da falta de sifonamento e de renovação da água dos aquários desde o momento da infecção, o que ocasiona o acúmulo de resíduos de alimentos e matéria fecal, degradando a qualidade da água deixando o ambiente de cultivo com condições inadequadas para o crescimento dos camarões (CHUMPOL *et al.*, 2017).

Chen e He (2019) explicam que diferentes fatores ambientais podem ter efeito sobre o sistema imune inato do camarão, a exemplo da parede celular intestinal, que é a primeira linha de defesa no *L. vannamei* e a eficácia da defesa depende da integridade da estrutura da parede celular, da composição dos microrganismos e dos componentes imunológicos do muco intestinal. Entretanto, a exposição à amônia/nitrogênio destrói a mucosa intestinal e afeta a composição da microbiota intestinal, reduzindo a função imune do animal.

5.11.2 *Vibrio*

Os resultados das contagens de *Vibrio* na microbiota residente e transitória dos camarões estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Contagens de *Vibrio* spp. no tecido e conteúdo intestinal dos camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas.

Grupos	Intestino (UFC/g)				Conteúdo (UFC/g)			
	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂
C1	7,58 x10 ⁴	8,38 x10 ⁴	–	8,75 x10 ⁵	6,23 x10 ⁶	6,03 x10 ⁵	1,28 x10 ⁶	9,25 x10 ⁷
C2	6,25 x 10 ³	3,45 x10 ⁶	2,08 x10 ⁵	1,63 x10 ⁵	4,98 x10 ⁵	2,63 x 10 ⁶	3,9 x10 ⁷	1,33 x10 ⁸
T1	1,8 x10 ⁴	3,83 x10 ⁴	2,73 x10 ⁴	1,2 x10 ⁴	4,25 x10 ⁶	2,88 x 10 ⁵	2,33 x10 ⁶	3,25 x10 ⁷
T2	1,73 x10 ⁶	3,12 x10 ⁵	5,8 x10 ⁴	6,28 x10 ⁴	1,38 x10 ⁷	6,65 x 10 ⁵	4,05 x10 ⁶	4,83 x10 ⁷
T3	3 x10 ³	1,65 x10 ⁴	1,13 x10 ⁴	5,83 x10 ⁴	8,25 x10 ⁴	9,5 x10 ⁴	6,4 x10 ⁶	7,03 x10 ⁷

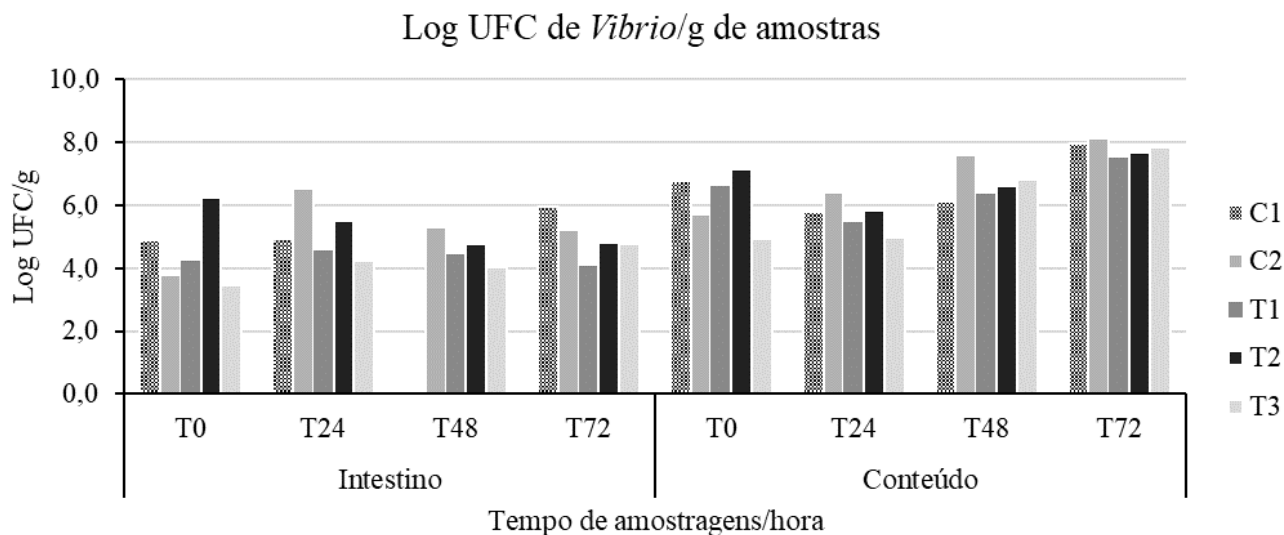
Fonte: Próprio autor.

–Não houve contagem para amostra neste período.

C1 – Grupo Controle 1 (sem infecção); C2 – Grupo Controle 2 (com infecção); T1 – Grupo Tratamento 1 (consórcio probiótico 1 / com infecção); T2 – Grupo Tratamento 2 (consórcio probiótico 2 / com infecção); T3 – Grupo Tratamento 3 (consórcio probiótico 3 / com infecção).

Uma melhor visualização da curva de crescimento de *Vibrio* no intestino e conteúdo intestinal dos camarões no decorrer do tempo de amostragem é possível pelo Gráfico 8.

Gráfico 8 – Contagens de *Vibrio* spp. no tecido e conteúdo intestinal dos camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados expostos a diferentes tratamentos com (T1, T2 e T3) e sem (C1 e C2) a presença de bactérias probióticas.



Fonte: Próprio autor.

As contagens de *Vibrio* spp. no controle negativo (C1) tende a manter uma tendência a aumentar no decorrer dos tempos de amostragem. As cargas bacterianas dos tratamentos com probióticos foram mais estáveis no decorrer das amostragens, com destaque para T1 e T3, principalmente quanto as contagens de *Vibrio*, em que se mantiveram baixas e, mesmo quando todas contagens aumentam, as dos tratamentos se mantem abaixo dos controles.

Ao analisar separadamente os tratamentos, o T1 foi o que apresentou maior equilíbrio na quantidade de bactérias encontradas na microbiota residente, o que pode ser um indicativo de que as bactérias probióticas conseguiram colonizar efetivamente a parede do trato intestinal dos crustáceos, essa característica permite o combate a patógenos por exclusão competitiva. Roomiani, Ahmadi e Ghaeni (2018) também concluíram que provavelmente a bactéria *Lactobacillus bulgaricus* gerou exclusão competitiva contra o patógeno *V. parahaemolyticus* no trato digestivo quando utilizada como probiótico para o camarão branco.

O T2 apresenta inicialmente uma alta contagem de *Vibrio* na microbiota residente, no entanto esse valor vai decaindo nos tempos seguintes, o que pode ser em decorrência da inibição do patógeno, uma vez que dentre as estirpes que formam o consórcio 2 encontra-se uma com atividade antagônica positiva frente ao *V. harveyi*, o que oferece grande vantagem no cultivo de camarões marinhos (FERREIRA *et al.*, 2015).

O C2, grupo a qual não foi ofertado probiótico, foi o que se mostrou mais instável

e se destacou das demais com picos mais elevados. É importante ressaltar que foi o C2 que apresentou um grande pico na contagem de *Vibrio* da microbiota residente (intestino) no T₂₄, o que pode indicar que após a infecção o patógeno conseguiu aderir ao trato intestinal dos camarões. O que não aconteceu com os camarões dos tratamentos, que quando analisados quanto a presença de *Vibrio* na microbiota residente apresentaram valores mais baixos. Dados obtidos Yao *et al.* (2018) demonstram que a disbiose da comunidade bacteriana intestinal do camarão pode torná-los mais sensíveis a patógenos oportunistas, o que indica que a emergência de doenças está diretamente associada a estabilidade da microbiota intestinal do camarão.

Dentre os tratamentos, o T3 foi o que apresentou maior estabilidade nas contagens ao longo do tempo de monitoramento.

5.12 Contagem Total de Hemócitos (CTH)

A Contagem Total de Hemócitos (CTH) é um importante indicador do estado imunológico dos camarões, já que os hemócitos estão envolvidos na maioria dos mecanismos imunológicos dos camarões (MUGNIER *et al.*, 2013).

Os valores das CTH estão descritos na Tabela 7 e Gráfico 9.

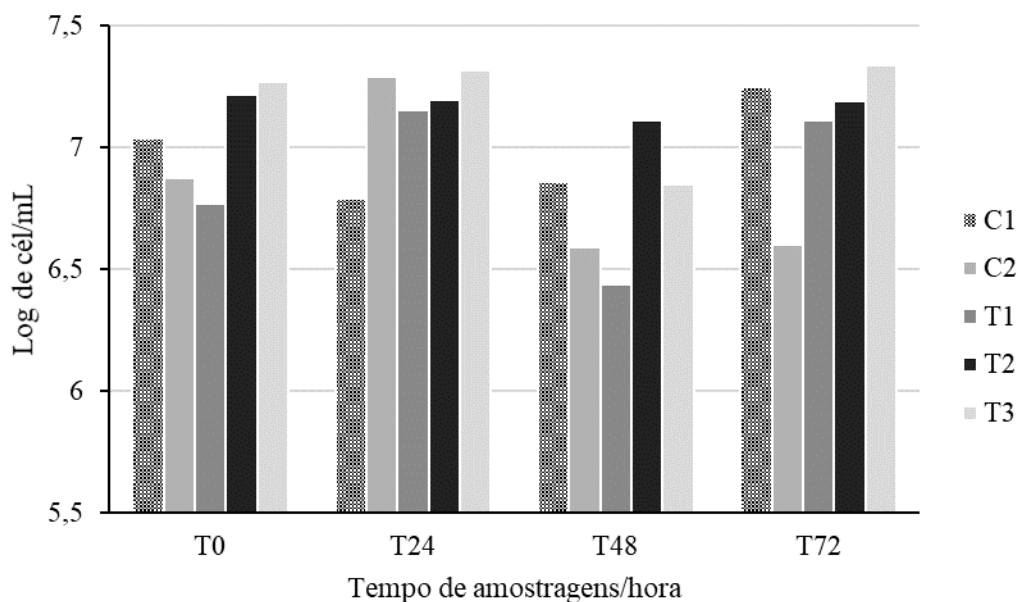
Tabela 7 – Contagem Total de Hemócitos (CTH) de todos os grupos do experimento ao longo das amostragens.

Tratamento	Contagem Total de Hemócitos (cél/mL)			
	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂
C1	1,09 x10 ⁷	6,15 x10 ⁶	7,2 x10 ⁶	1,76 x10 ⁷
C2	7,43 x10 ⁶	1,95 x10 ⁷	3,88 x10 ⁶	3,95 x10 ⁶
T1	5,88 x10 ⁶	1,41 x10 ⁷	2,73 x10 ⁶	1,28 x10 ⁷
T2	1,65 x10 ⁷	1,57 x10 ⁷	1,29 x10 ⁷	1,54 x10 ⁷
T3	1,85 x10 ⁷	2,06 x10 ⁷	7,03 x10 ⁶	2,18 x10 ⁷

Fonte: Próprio autor.

C1 – Grupo Controle 1 (sem infecção); C2 – Grupo Controle 2 (com infecção); T1 – Grupo Tratamento 1 (consórcio probiótico 1 / com infecção); T2 – Grupo Tratamento 2 (consórcio probiótico 2 / com infecção); T3 – Grupo Tratamento 3 (consórcio probiótico 3 / com infecção).

Gráfico 9 – Gráfico da Contagem Total de Hemócitos (CTH) de todos os grupos do experimento ao longo das amostragens.



Fonte: Próprio autor.

A resposta imune dos camarões dos tratamentos com os probióticos foi melhor que a dos controles, verificado por meio da reação hemocitária, ou seja, o aumento do número de hemócitos na hemolinfa. Esse aumento do número de hemócitos indica uma maior eficiência imunológica dos camarões, demonstrando uma melhor reação e resistência diante da presença de agentes infecciosos no ambiente (COSTA; MARTINS, 2009).

A CTH dos camarões dos tratamentos T2 e T3 foram as maiores dentre os tratamentos, superando inclusive o C1, controle que não foi infectado. A alta reação hemocitária após a infecção, a posterior estabilização e novamente reação a estresse ambiental indica que o uso dos probióticos elevou a eficiência imunológica dos camarões cultivados, visto que as doenças de camarões tendem a ocorrer quando há o acúmulo de matéria orgânica na água de cultivo (SUSIANINGSIH; KURNIAWAN; ATMOMARSONO, 2017).

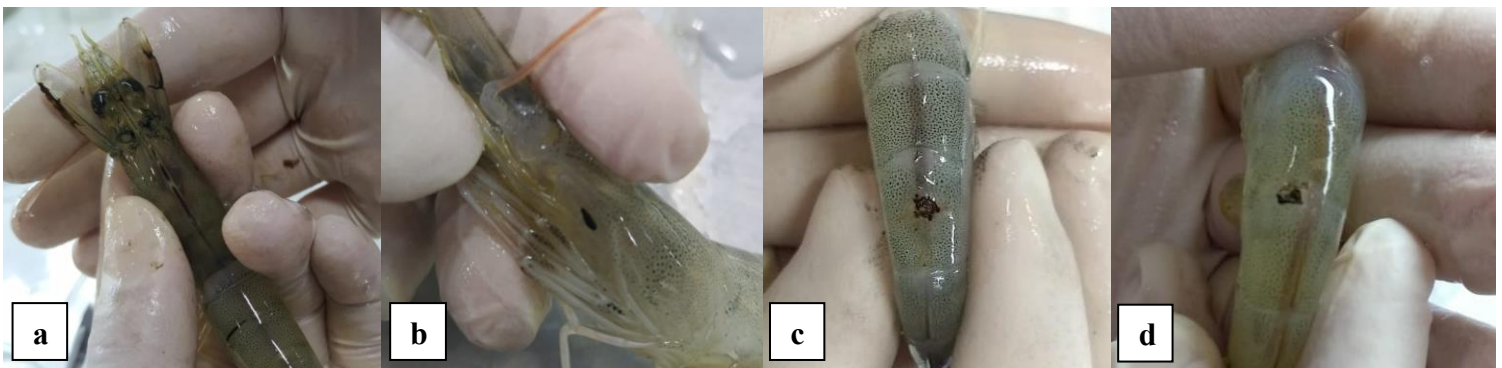
A CTH do T2 apresentou um pico no T₂₄, mesmo período em que iniciou o decaimento das contagens de *Vibrio* na microbiota residente no mesmo tratamento, e então a partir do T₄₈ a CTH estabiliza. No T3, a CTH se mantém sempre elevada enquanto o tratamento apresenta valores relativamente estáveis em todas as contagens bacterianas (BHC e *Vibrio*). Uma vez que as estirpes probióticas colonizaram o intestino dos camarões e então estimularam seu sistema imune os tornando menos susceptíveis a exposição ao patógeno fica evidenciado

que a estabilidade da microbiota intestinal dos camarões tem relação direta com a resposta imune dos mesmos (YAO *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a partir do T₂₄, quando os animais de todos os grupos apresentam uma reação hemocitária alta, o C2 se eleva, mas logo decai e estabiliza, que pode ter sido em função da migração dos hemócitos do sistema circulatório para tecidos onde haviam muitas células infectadas, uma vez que essas células de defesa se depositam em torno de patógenos, em um processo que leva ao escurecimento e endurecimento para melhoria da cicatrização e aumento da proteção imunológica (YOU *et al.*, 2010; CHEN; HE, 2019). Animais de outros grupos também apresentaram esse mecanismo de defesa (melanomas) (FIGURA 8), no entanto continuaram apresentando altas taxas de hemócitos no sistema circulatório, o que demonstra que após a exposição ao patógeno o sistema imune dos camarões do C2 foi fragilizado.

Huang *et al.* (2013) ao analisarem a resposta imune de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* de dois grupos diferentes, normais e resistentes a *V. harveyi*, demonstraram que dentre os fatores analisados os melhores resultados foram encontrados no grupo resistente ao *V. harveyi*, entre eles: a eficiência em eliminar o patógeno e a CTH, resultados semelhantes aos encontrados nos tratamentos (T1, T2 e T3) o que indica que a resposta imune foi mais eficiente.

Figura 8 – Fotografias da carapaça dos camarões do experimento que apresentaram melanomas.



Fonte: Próprio autor.

a – Camarão do C1 1; b – Camarão do C2; c – Camarão do T1 e d – Camarão do T3.

5.13 Quantificação Viral

Esse teste foi feito para determinar se os camarões selecionados para o experimento apresentavam alguma carga viral que pudesse influenciar os resultados obtidos. Também foi realizado com os camarões após a infecção para determinar se o tratamento e/ou o estresse ao

qual eles foram submetidos influenciou a carga viral. No entanto, nenhum dos camarões do experimento apresentou cópias virais de WSSV nem de IMNV.

Vale ressaltar que camarões infectados por patógenos virais são mais susceptíveis a contaminações por patógenos oportunistas, a exemplo do WSSV que paralisa o sistema imune do animal permitindo patógenos como *Vibrio* se proliferarem, de modo que o efeito sinérgico dos dois patógenos acelere a morte do hospedeiro (ZHANG; SONG; HUANG, 2016).

6 CONCLUSÕES

Por meio dos testes propostos neste trabalho foi possível fazer a seleção de três consórcios probióticos para camarões que se mostraram eficientes durante a aplicação no cultivo dos animais.

A bactérias que compõem os probióticos conseguiram colonizar efetivamente o trato intestinal dos camarões do experimento e a partir disso melhoraram resposta imune dos hospedeiros frente ao patógeno e aos estresses ambientais, demonstrando que os tratamentos foram eficazes, com destaque para o Tratamentos 1 e 3 que apresentaram melhor estabilidade.

Os consórcios probióticos 1, 2 e 3 apresentaram mecanismos de ação diferentes, enquanto o consórcio 1 colonizou os sítios de adesão do intestino dos animais e inibiu o patógeno por exclusão competitiva, o consórcio 2 apresentou potencial de inibição do patógeno e, como o consórcio 3 também estimulou o sistema inune inato dos camarões. Essas características demonstram a aplicabilidade desses probióticos na atividade de carcinicultura, melhorando a sanidade dos animais cultivados e reduzindo a necessidade do uso de antimicrobianos para o controle de enfermidades.

Os testes realizados para a seleção das estirpes probióticas foram eficientes para obtenção de probióticos eficazes para carcinicultura.

A origem das estirpes e a técnica utilizada para oferta dos consórcios probióticos foram fatores diferenciais para otimização da eficiência na ação dos probióticos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos futuros devem ser realizados para verificar se o aumento na concentração de probiótico ofertado aos camarões proporciona diferenças significativas no crescimento e ganho de biomassa.

Outro ponto relevante a ser trabalhado é testar os consórcios probióticos em diferentes fases de crescimento do camarões, para indicar a melhor fase para a introdução das bactérias no ciclo de cultivo dos animais.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y. S. *et al.* Complete genome sequence of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio campbellii* LA16-V1, isolated from *Penaeus vannamei* cultured in a Latin American country. **Genome Announcements**, v. 5, n. 37, p. e 01011-17, 2017.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D.. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 5, p. 1103-1113, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMARANTE, D. O. **Viabilidade de agentes bacterianos como probiótico no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei***, 2016. 53f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.
- AMINE, K. M. *et al.* Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 111-117, 2014.
- ANDRADE, T. P. D. *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 9-15, 2007.
- ANTUNES, C. R. N. *et al.* Avaliação das taxas de arraçoamento na produção do camarão *Litopenaeus vannamei* utilizando substratos artificiais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1-11, 2018.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 66-77, 2017.
- BATHAEI, S. S. Composition for prevention and/or treatment of chronic inflammation and concomitant biofilms in the gastrointestinal tract. **U.S. Patent Application** n. 15/301,840, 26 jan. 2017.
- BAUTISTA-TERUEL, M. N.; EUSEBIO, P. S.; WELSH, T. P. Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 225, n. 1-4, p. 121-131, 2003.
- BIDHAN C. *et al.* Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 921-971, 2014.
- BOLEM, M. *et al.* Study on the use of Probiotic Products in Indian Shrimp Aquaculture. **International Journal of Economic Research**, v. 14; n.5; p.159-172, 2017.

BOOPATHY, R. Waste Treatment in Recirculating Shrimp Culture Systems. In: **Sustainable Aquaculture**. Springer, Cham, cap. 10, p. 301-322, 2018.

BRUMMETT, R. E. Reducing Disease Risk in Aquaculture - **Agriculture and Environmental Services Discussion Paper 09** - World Bank Report Number 88257-GLB, Chapter 1, p. xiv-xv. Street NW, Washington, DC 20433, USA, 2014.

CAI, Y. *et al.* Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 177-184, 1999.

CARRIAS, A. *et al.* Bacteria and bacteriophages as biological agents for disease control in aquaculture. In: **Infectious Disease in Aquaculture**. p. 353-393, 2012.

CHEN, Y. H.; HE, J. G. Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 744-755, 2019.

CHEN, Y. Y. *et al.* Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 192-199, 2015.

CHENG, S. *et al.* Evaluation of the vaccine potential of a cytotoxic protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. **Vaccine**, v. 28, n. 4, p. 1041-1047, 2010.

CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, p. 996-1006, 1985.

CHUMPOL, S. *et al.* The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation. **Aquaculture**, v. 473, p. 327-336, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement**. M100-S19. CLSI: Wayne, v. 29, n. 3, 149 p, 2010.

COSTA, A. M.; MARTINS, P. C. C. Análise da contagem total de hemócitos e capacidade coagulante da hemolinfa do camarão *litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em cultivos com ocorrência de necrose muscular. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 4, p. 545-551, 2009.

COZER, N. *et al.* Challenges and potentialities of the integrated production regime implementation in the Brazilian marine shrimp farming: a systematic review. **Aquaculture International**, v. 27, n. 2, p. 539-553, 2019.

DEFOIRD, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 251-258, 2011.

- DEMPSEY, A. C.; KITTING, C. L.; ROSSON, R. A. Bacterial variability among individual penaeid shrimp digestive tracts. **Crustaceana**, p. 267-278, 1989.
- ELMAHDI, S.; DASILVA, L. V.; PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. **Food Microbiology**, v. 57, p. 128-134, 2016.
- FÉLIX, D. M. *et al.* Survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed on diets supplemented with *Dunaliella* sp. is improved after challenges by *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 148, p. 118-123, 2017.
- FERREIRA, G. S. *et al.* Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 448, p. 273-279, 2015.
- FORTE, J. M. *et al.* Multienzymatic capacity of cultivable intestinal bacteria from captive *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) shrimp reared in green water. **Aquaculture International**, p. 1-12, 2019.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of Applied Bacteriology.**, v. 68, n. 5, p. 365-378, 1989.
- GRACIA-VALENZUELA, M. H. *et al.* Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1367-1370, 2014.
- HAJAR, S.; HAMID, T. H. T. A. Isolation of lactic acid bacteria strain *Staphylococcus piscifermentans* from Malaysian traditional fermented shrimp cinaluk. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 125, 2013.
- HOLMSTRÖM, K. *et al.* Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 38, n. 3, p. 255-266, 2003.
- HOSSAIN, M. S.; UDDIN, M. J.; FAKHRUDDIN, A. N. M. Impacts of shrimp farming on the coastal environment of Bangladesh and approach for management. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 3, p. 313-332, 2013.
- HUANG, H. H. *et al.* Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 406, p. 115-120, 2013.
- IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 6, p. 765-791, 2015.
- IMANE, H. A.; AMEL, D. Characterization and screening of the potential probiotic lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* strains isolated of different biotopes. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 11, n. 2, p. 145-173, 2018.

KIM, F. J. P. *et al.* Detecção de *Aeromonas* spp. e do gene de virulência aerolisina em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de mPCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1731-1735, 2018.

KITAOKA, M. *et al.* Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 397-407, 2011.

KONDO, H. *et al.* Draft genome sequence of non-*Vibrio* parahaemolyticus acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. e00978-15, 2015.

KONGRUENG, J. *et al.* Characterization of *Vibrio* parahaemolyticus causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, n. 11, p. 957-966, 2015.

KUMAR, V. *et al.* Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 24, n.4, p. 342-368, 2016.

KUMAR, G.; ENGLE, C. R. Technological advances that led to growth of shrimp, salmon, and tilapia farming. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 24, n. 2, p. 136-152, 2016.

KUO, M. J.; HARTMAN, P. A. Isolation of amylolytic strains of *Thermoactinomyces vulgaris* and production of thermophilic actinomycete amylases. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 3, p. 723-726, 1966.

LIGHTNER, D. V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge: World **Aquaculture Society**, 305 p. 1996.

LIGHTNER, D. V. *et al.* Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. In: **Shellfish Safety and Quality**. p. 384-424, 2009.

LIU, L. *et al.* A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 153, p. 156-164, 2018.

LLARIO, F. *et al.* The Role of *Bacillus amyloliquefaciens* on *Litopenaeus vannamei* During the Maturation of a Biofloc System. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 7, n. 7, p. 228, 2019.

LOTZ, J. M. Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. **Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila**, p. 243-254, 1997.

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, n. 3, p. 381-388, 1993.

MADANI, N. S. H. *et al.* The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 5, p. 1926-1933, 2018.

MOSS, S. M. *et al.* 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.

MUGNIER, C. *et al.* Evaluación de los parámetros biológicos, fisiológicos, inmunológicos y nutricionales en camarones *Litopenaeus stylirostris* afectados por vibriosis. **Revista Aquaculture**, v. 388-391, p. 26-31, 2013.

MURATORI, M. C. S. *et al.* " *Vibrio parahaemolyticus*" em carcinicultura marinha. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 2, 2014.

NEVES, S. R. A. **O programa de saúde nas fazendas de camarão (PSF_CAMARÃO) e os seus impactos sobre os desempenhos Produtivos e econômicos na carcinicultura familiar do baixo rio Pirangi, Ceará, Brasil**, 2018. 101f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2018.

NGUYEN, H. T. *et al.* Biochemical engineering approaches for increasing viability and functionality of probiotic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 867, 2016.

NINAWA, A. S.; SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 43-66, 2009.

NÜBEL, U. *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da ABBC**, v. XVIII, n. 2, p. 10-36, 2016.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Infection with Infectious Myonecrosis Virus. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. cap. 2.2.5. p. 6-8, 2019a. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_infectious_myonecrosis.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Infection with White Spot Syndrome Virus. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. cap. 2.2.8. p. 9-11, 2019b. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_wsd.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2019.

PÁEZ-OSUNA, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. **Environmental Management**, v. 28, n. 1, p. 131-140, 2001.

PARVATHI, A.; MENDEZ, D.; ANTO, C. Distribution of putative virulence genes and antimicrobial drug resistance in *Vibrio harveyi*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 332-337, 2011.

PAUL, B. G.; VOGL, C. R. Impacts of shrimp farming in Bangladesh: challenges and alternatives. **Ocean & Coastal Management**, v. 54, n. 3, p. 201-211, 2011.

PASSOT, S. *et al.* The relevance of thermal properties for improving formulation and cycle development: application to freeze-drying of proteins. **Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products**. Informa Healthcare, v. 208, p. 153-154, 2010.

PEREIRA, C. *et al.* Bacteriophages with Potential for Inactivation of Fish Pathogenic Bacteria: Survival, Host Specificity and Effect on Bacterial Community Structure. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2236-2255, 2011.

PINCINATO, R. B. M.; ASCHE, F. Market integration in Brazilian shrimp markets. **Aquaculture Economics & Management**, v. 20, n. 4, p. 357-367, 2016.

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, n. 1, p. 69-72, 2006.

RAKESH, K. *et al.* A Review on Drugs Used in Shrimp Aquaculture. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 6, n. 4, p. 77-86, 2018.

RANDRIANARIVELO, R. *et al.* Novel alternative to antibiotics in shrimp hatchery: effects of the essential oil of *Cinnamomum fragrans* on survival and bacterial concentration of *Penaeus monodon* larvae. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 642-650, 2010.

REBOUÇAS, R. H. **Colonização de tecidos e líquido corpóreo do camarão *Litopenaeus vannamei* por *Vibrio parahaemolyticus* autóctone do ambiente de cultivo**, 2017. 80f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2017.

ROCHA, I. P. Setor Carcinícola, Aquícola e Pesqueiro: Potencialidades, Desafios e Oportunidades para uma Efetiva Contribuição com o Fortalecimento da Sócia Economia Pesqueira do Brasil. **Revista da ABBC**, v. XX, n. 2, p. 6-16, 2018.

ROCHA, R. S.; 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, n. 1, p. 337-340, 2016.

RODRIGUES, D. P. *et al.* E. Evaluayion of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 589-592, Oct-dec 1993.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C. G.; NAVARRETE, P. Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In: **Health and Environment in Aquaculture**. InTech, 2012.

ROOMIANI, L.; AHMADI, S.; GHAENI, M. Immune response and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* induced by potential probiotic *Lactobacillus*. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 65, n. 3, p. 323-329, 2018.

RUST, L.; MESSING, C. R.; IGLEWSKI, B. H. Elastase assays. **Methods in Enzymology**, Washington, v. 235, n. 1, p. 554-562, 1994.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, D. R. **Bioprospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias degradadoras de agrotóxicos isoladas do rio Pacotí- Ce**, 2013. 57f. Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

SAULNIER, D. *et al.* Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 133-144, 2000.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 3, p. 557-561, 1993.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 7, p. 1902-1907, 1993.

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, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVEIRA, D. R. *et al.* *Vibrio* spp. pathogenicity factors of importance in foodborne diseases. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.

SIZEMORE, R. K.; STEVENSON, L. H. Method for the isolation of proteolytic marine bacteria. **Applied Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 991, 1970.

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

SOTO-RODRIGUEZ, S. A. *et al.* Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 307-317, 2012.

SUSIANINGSIH, E.; KURNIAWAN, K.; ATMOMARSONO, M. PERFORMANCE OF CULTURED White-leg Shrimp IN RICA Probiotic Application METHOD in PONDS AERATED WITH SUPERCHARGE BLOWER. **Indonesian Aquaculture Journal**, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2017.

- SWAPNA, B.; VENKATRAYULU, C; SWATHI, A. V. Effect of probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus rhamnosus* on growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, n. 11, p. 31-36, 2015.
- TAHIM, E. F.; JÚNIOR, I. F. A. A carcinicultura do nordeste brasileiro e sua inserção em cadeias globais de produção: foco nos APLs do Ceará. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 3, p. 567-586, 2014.
- TAMURA, K. *et al.* MEGA 6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis**; version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.*, Chicago, v.30, p. 2725-2729, 2013.
- TENDENCIA, E. A.; PEÑA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**, v. 195, n. 3-4, p. 193-204, 2001.
- THITAMADEE, S. *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, v. 452, p. 69-87, 2016.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Artmed, 2012. cap. 3, p. 69-70, cap 14, 400-403.
- TÓTH, E. M. *et al.* **Practical Microbiology**: based on the Hungarian practical notes entitled "Mikrobiológiai Laboratóriumi Gyakorlatok". Eötvös Loránd University. Project E-learning scientific content development in ELTE TTK, 2013. n. TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073. cap. 7. p. 84. Fig. 36.
- TRAN, L. *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45-55, 2013.
- TRAVERS, R. S.; MARTIN, P. A. W.; REICHELDERFER, C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1263-1266, 1987.
- TUAN, T. N.; DUC, P. M.; HATAI, K. Overview of the use of probiotics in aquaculture. **International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture**, v. 3, n. 3, p. 89-97, 2013.
- UDDIN, G. M. N. *et al.* Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0132338, 2015.
- VARELA, A. Transmission of bacterial virulence factors, a real and current threat to aquaculture production, a diagnostic challenge. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 6, n. 6, p. 234-236, 2018.
- VARGAS-ALBORES, F. *et al.* 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, n. 1, p. 5, 2017.
- VARGAS-ALBORES, F. *et al.* Immunophysiological response of Pacific white shrimp exposed to a probiotic mixture of Proteobacteria and Firmicutes in farm conditions. **North American Journal of Aquaculture**, v. 78, n. 3, p. 193-202, 2016.

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

VIEIRA, F. N. *et al.* Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 203-207, 2016.

VIEIRA, F. N. *et al.* In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 998-1004, 2013.

VIEIRA, F. N. *et al.* Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 631-638, 2010.

VINNIKOVA, L.; KISHENYA, A.; STRASHNOVA, I. Lactic acid bacteria compositions for application in the meat industry. **Ukrainian Food Journal**, n. 5, Issue 2, p. 262-271, 2016.

WANG, Y. C. *et al.* Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 1050-1058, 2019.

WILLISTON, E. H.; ZIA-WALRATH, P.; YOUMANS, G. P. Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type tubercle bacilli. **Journal of Bacteriology**, v. 54, n. 5, p. 563, 1947.

XIA, Q. *et al.* A new method to evaluate the effects of bacterial dosage, infection route and *Vibrio* strain in experimental challenges of *Litopenaeus vannamei*, based on the Cox proportional hazard model. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 686-692, 2015.

YAO, Z. *et al.* Disease outbreak accompanies the dispersive structure of shrimp gut bacterial community with a simple core microbiota. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 120, 2018.

YOU, X. X. *et al.* Effect of high water temperature on mortality, immune response and viral replication of WSSV-infected *Marsupenaeus japonicus* juveniles and adults. **Aquaculture**, v. 305, n. 1-4, p. 133-137, 2010.

ZHANG, M. *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.

ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 437-440, 2001.

ZHANG, X.; SONG, X.; HUANG, J. Impact of *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) co-infection on survival of penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 34, n. 6, p. 1278-1286, 2016.

ZHU, J. *et al.* Contrasting ecological processes and functional compositions between intestinal bacterial community in healthy and diseased shrimp. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 975-985, 2016.

ZOKAEIFAR, H. *et al.* Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 6, p. 289, 2012a.

ZOKAEIFAR, H. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 683-689, 2012b.

ZORRIEHZAHRA, M. J. *et al.* Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016.

**ANEXO A - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES
BACTERIANAS UTILIZADAS PARA SELEÇÃO E FORMAÇÃO DOS
CONSÓRCIOS PROBIÓTICOS. CONTINUA**

Cepa	Grupo Origem	Agregação	Resistência Oxitetraciclina	Similaridade	Identificação
1	<i>Bacillus</i>	-	*	98%	<i>Bacillus sp.</i>
2	<i>Bacillus</i>	-	S	99%	<i>Bacillus sp.</i>
3	<i>Bacillus</i>	-	S	94,1%	<i>Bacillus sp.</i>
4	<i>Bacillus</i>	-	S	98,5%	<i>Bacillus sp.</i>
5	<i>Bacillus</i>	-	S	99%	<i>Bacillus sp.</i>
6	<i>Bacillus</i>	-	S	92,6%	<i>Bacillus sp.</i>
7	<i>Bacillus</i>	-	S	97,7%	<i>Bacillus sp.</i>
8	<i>Bacillus</i>	+	S	99,9%	<i>Bacillus sp.</i>
9	<i>Bacillus</i>	+	S	95,8%	<i>Bacillus sp.</i>
10	<i>Bacillus</i>	-	S	99%	<i>Bacillus sp.</i>
11	<i>Bacillus</i>	+	S	98,9%	<i>Bacillus sp.</i>
12	<i>Bacillus</i>	-	S	99,2%	<i>Bacillus sp.</i>
13	<i>Bacillus</i>	+	S	98,3%	<i>Bacillus sp.</i>
14	<i>Bacillus</i>	+	S	99%	<i>Bacillus sp.</i>
15	<i>Bacillus</i>	-	S	99,6%	<i>Bacillus sp.</i>
16	<i>Bacillus</i>	+	S	97,9%	<i>Bacillus sp.</i>
17	<i>Bacillus</i>	-	S	94,1%	<i>Bacillus sp.</i>
18	<i>Bacillus</i>	+	S	99,3%	<i>Bacillus sp.</i>
19	<i>Bacillus</i>	-	S	97,5%	<i>Bacillus sp.</i>
20	<i>Bacillus</i>	-	*	100%	<i>Bacillus sp.</i>
21	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
22	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
23	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
24	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
25	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
26	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
27	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
28	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
29	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
30	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
31	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus pumilus</i>
32	<i>Bacillus</i>	+	S	100%	<i>Bacillus pumilus</i>
33	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>
34	<i>Bacillus</i>	+	S	100%	<i>Bacillus pumilus</i>
35	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus sp.</i>

CONTINUAÇÃO

Cepa	Grupo Origem	Agregação	Resistência Oxitetraciclina	Similaridade	Identificação
36	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
37	<i>Bacillus</i>	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
38	<i>Bacillus</i>	+	S	100%	<i>Bacillus pumilus</i>
39	<i>Bacillus</i>	+	S	100%	<i>Virgibacillus proomii</i>
40	<i>Bacillus</i>	-	I	100%	<i>Lysinibacillus</i> sp.
41	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
42	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
43	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
44	BAL	-	R	100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
45	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
46	BAL	-	S	100%	<i>Bacillus</i> sp.
47	BAL	-	R	99%	<i>Bacillus</i> sp.
48	BAL	-	R	100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
49	BAL	+	S	99%	<i>Bacillus</i> sp.
50	BAL	+	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
51	BAL	+	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
52	BAL	+	R	99%	<i>Bacillus</i> sp.
53	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
54	BAL	-	I	99%	<i>Bacillus</i> sp.
55	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
56	BAL	-	S	100%	<i>Bacillus</i> sp.
57	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus sonorensis</i>
58	BAL	+	R		Não identificada
59	BAL	+	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
60	BAL	+	I		Não identificada
61	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
62	BAL	-	R		Não identificada
63	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
64	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
65	BAL	-	R	99%	<i>Bacillus</i> sp.
66	BAL	+	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
67	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
68	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
69	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
70	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
71	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
72	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
73	BAL	-	S	100%	<i>Bacillus</i> sp.
74	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
75	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.

CONTINUAÇÃO

Cepa	Grupo Origem	Agregação	Resistência Oxitetraciclina	Similaridade	Identificação
76	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
77	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
78	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
79	BAL	+	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
80	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
81	BAL	-	S		Não identificada
82	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
83	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
84	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
85	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
86	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
87	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
88	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
89	BAL	-	S	99%	<i>Bacillus</i> sp.
90	BAL	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
91	PT	-	S	100%	<i>Staphylococcus</i> sp.
92	PT	-	S	99%	<i>Micrococcus aloe verae</i>
93	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
94	PT	-	S	100%	<i>Staphylococcus aureus</i>
95	PT	-	S		Não identificada
96	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
97	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
98	PT	-	R	100%	<i>Staphylococcus</i> sp.
99	PT	+	R	99%	<i>Vibrio</i> sp.
100	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
101	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
102	PT	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp
103	PT	-	R		Não identificada
104	PT	-	I	100%	<i>Acinetobacter</i> sp.
105	PT	+	R		Não identificada
106	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
107	PT	+	R	99%	<i>Vibrio</i> sp.
108	PT	+	R	99%	<i>Bacillus</i> sp.
109	PT	-	R	100%	<i>Bacillus</i> sp.
110	PT	+	S	99%	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. <i>incaldanensis</i>
111	PT	-	I	100%	<i>Bacillus pumilus</i>
112	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.
113	PT	+	R	100%	<i>Vibrio</i> sp.

CONTINUAÇÃO

Cepa	Grupo Origem	Agregação	Resistência Oxitetraciclina	Similaridade	Identificação
114	PT	-	R		Não identificada
115	PT	-	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
116	PT	-	R		Não identificada
117	PT	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
118	PT	-	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
119	PT	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
120	PT	+	S	99%	<i>Vibrio olivae</i>
121	PT	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
122	PT	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
123	PT	-	S	100%	<i>Bacillus sp.</i>
124	PT	*	R		Não identificada
125	PT	*	R	99%	<i>Paracoccus pacificus</i>
126	PT	-	R		Não identificada
127	PT	-	R		Não identificada
128	PT	-	R		Não identificada
129	PT	-	R		Não identificada
130	PT	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
131	PT	+	I	100%	<i>Shewanella haliotis</i>
132	AMI	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
133	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
134	AMI	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
135	AMI	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
136	AMI	-	S		Não identificada
137	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
138	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
139	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
140	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
141	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
142	AMI	+	S		Não identificada
143	AMI	-	S		Não identificada
144	AMI	+	R		Não identificada
145	AMI	+	R		Não identificada
146	AMI	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
147	AMI	-	S		Não identificada
148	AMI	-	S		Não identificada
149	AMI	-	S		Não identificada
150	AMI	+	S	99%	<i>Vibrio sinaloensis</i>
151	AMI	-	I	100%	<i>Staphylococcus cohnii</i>
152	CEL	+	S	99%	<i>Vibrio sp</i>

CONTINUAÇÃO

Cepa	Grupo Origem	Agregação	Resistência Oxitetraciclina	Similaridade	Identificação
153	CEL	+	R		Não identificada
154	CEL	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
155	CEL	+	S	100%	<i>Vibrio sp.</i>
156	CEL	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
157	CEL	+	R		Não identificada
158	CEL	+	S	100%	<i>Vibrio sp.</i>
159	CEL	+	I	100%	<i>Vibrio sp.</i>
160	CEL	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
161	CEL	+	R	100%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
162	CEL	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
163	CEL	+	R		Não identificada
164	CEL	+	R	100%	<i>Staphylococcus cohnii</i>
165	CEL	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
166	CEL	+	S	100%	<i>Vibrio sp.</i>
167	CEL	+	I	100%	<i>Vibrio sp.</i>
168	CEL	+	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
169	CEL	+	R	100%	<i>Isoptricola jiangsuensis</i>
170	CEL	-	R	100%	<i>Isoptricola jiangsuensis</i>
171	CEL	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
172	LIP	-	S		Não identificada
173	LIP	-	S		Não identificada
174	LIP	-	S	99%	<i>Vibrio sp.</i>
175	LIP	-	S	99%	<i>V. olivae ou V. xuii</i>
176	LIP	-	I	98%	<i>Vibrio olivae</i>
177	LIP	-	S	99%	<i>Vibrio sp.</i>
178	LIP	-	I		Não identificada
179	LIP	-	R	99%	<i>Vibrio sp.</i>
180	LIP	-	S	99%	<i>Vibrio tubiashii</i>
181	LIP	-	S	99%	<i>Vibrio sp.</i>
182	LIP	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
183	LIP	-	S		Não identificada
184	LIP	-	S	99%	<i>Vibrio xuii</i>
185	LIP	-	S		Não identificada
186	LIP	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
187	LIP	-	R		Não identificada
188	LIP	-	I		Não identificada
189	LIP	-	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>
190	LIP	-	R		Não identificada

CONCLUSÃO.

Cepa	Grupo Origem	Agregação	Resistência Oxitetraciclina	Similaridade	Identificação
191	LIP	+	R	100%	<i>Vibrio sp.</i>

Fonte: Próprio autor.

BAL – Bactérias Ácido Lácticas; PT – Bactérias Proteolíticas; AMI – Bactérias Amilolíticas; CEL – Bactérias Celulolíticas; LIP – Bactérias Lipolíticas.

* – Teste não realizado.