



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

RAQUEL CAVALCANTE SOARES

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS
DO TRATO INTESTINAL DE CRUSTÁCEOS

FORTALEZA

2022

RAQUEL CAVALCANTE SOARES

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS DO
TRATO INTESTINAL DE CRUSTÁCEOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientadora: Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho.

FORTALEZA

2022

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

S656p Soares, Raquel Cavalcante.
Prospecção de moléculas bioativas sintetizadas por bactérias do trato intestinal de crustáceos / Raquel Cavalcante Soares. – 2022.
50 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho.

1. Bacillus. 2. Atividade antibacteriana. 3. Víbrio. 4. Antagonismo. 5. Bioatividade in vitro. I. Título.
CDD 639.2

RAQUEL CAVALCANTE SOARES

PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS DO
TRATO INTESTINAL DE CRUSTÁCEOS

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

Aprovada em: 19/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.
Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rafael dos Santos Rocha
Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)

Dr. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva
Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de aperfeiçoamento acadêmico.

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

A CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa auxílio.

A Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa, pela excelente orientação.

A Dra. Cristiane Teles pelo seu apoio como coorientadora.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Bartolomeu Warlene, Dr. Rafael dos Santos e Dr. Jéssica Lucinda pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado e do laboratório, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

RESUMO

As doenças infecciosas causadas por patógenos bacterianos se mostram como um dos principais problemas na saúde nos campos clínico e animal. Isso está atrelado a perda de eficácia dos antibióticos. Na aquicultura, uma alternativa a estes são os probióticos, eficientes no aumento da resistência dos animais cultivados aos patógenos. A seleção de estirpes probióticas se baseia na triagem de cepas que produzam compostos inibidores contra patógenos sendo o gênero *Bacillus* um destaque representando uma excelente fonte para estudos que buscam novos compostos terapêuticos. O presente trabalho teve como objetivo detectar atividade antibacteriana em metabólitos secundários lipopeptídicos de culturas bacterianas que fazem parte do acervo da coleção de culturas microbianas Profa. Regine Vieira e que foram isoladas a partir do trato gastrointestinal de crustáceos. As estirpes utilizadas na pesquisa foram selecionadas seguindo os critérios de: origem e atividade antagonista a *Vibrio harveyi*. Após verificação dos critérios de escolha, foram preparados extratos livres de células bacterianas (líquido metabólico), os quais foram avaliados quanto à atividade bacteriana por difusão em poços frente a *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. As cepas dos líquidos metabólicos que apresentaram resultado positivos foram usadas para obtenção de extratos lipopeptídicos, os quais foram submetidos a cromatografia em camada delgada utilizando placas de sílica gel para promover a separação dos compostos presentes nos extratos. Logo após, as placas foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana pela técnica de bioautografia. Os extratos lipopeptídicos com atividade antibacteriana detectada foram avaliados quanto à resistência a temperaturas de 45°C e 100°C e exposição à enzima proteinase K. A porção lipopeptídica da maioria das estirpes utilizadas foi eficiente frente aos patógenos avaliados na técnica de bioautografia e apresentaram estabilidade térmica e desempenho ótimo após exposição à proteinase K. Estas, podem ser adequadas para o uso na aquicultura, adicionadas na ração, após uma abordagem de caracterização e extração de substâncias bioativas. Os resultados são promissores como indicadores do potencial de descoberta de compostos antimicrobianos inéditos e com ampla aplicação tecnológica entre a microbiota do trato intestinal de animais aquáticos.

Palavras-chave: *Bacillus*; atividade antibacteriana; *Vibrio*; antagonismo; bioatividade *in vitro*.

ABSTRACT

Infectious diseases caused by bacterial pathogens are one of the main health problems in the clinical and animal fields. This is linked to the loss of effectiveness of antibiotics. In aquaculture, an alternative to these are probiotics, efficient in increasing the resistance of farmed animals to pathogens. The selection of probiotic strains is based on the screening of strains that produce inhibitory compounds against pathogens, with the genus *Bacillus* being a highlight, representing an excellent source for studies that seek new therapeutic compounds. The present work aimed to detect antibacterial activity in lipopeptide secondary metabolites of bacterial cultures that are part of the collection of microbial cultures Profa. Regine Vieira and which were isolated from the gastrointestinal tract of crustaceans. The strains used in the research were selected following the criteria of: origin and antagonistic activity to *Vibrio harveyi*. After checking the selection criteria, extracts free of bacterial cells (metabolic liquid) were prepared, which were evaluated for bacterial activity by diffusion in wells against *Vibrio harveyi* ATCC 14126 and *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. Positive results were used to obtain lipopeptide extracts, which were subjected to thin layer chromatography using silica gel plates to promote the separation of compounds present in the extracts. Soon after, the plates were evaluated for antibacterial activity using the bioautography technique. Lipopeptide extracts with detected antibacterial activity were evaluated for resistance to temperatures of 45°C and 100°C and exposure to the proteinase K enzyme. The lipopeptide portion of most of the strains used was efficient against the pathogens evaluated in the bioautography technique and showed stability thermal and optimal performance after exposure to proteinase K. These may be suitable for use in aquaculture, added to feed, after an approach to characterization and extraction of bioactive substances. The results are promising as indicators of the discovery potential of new antimicrobial compounds with wide technological application among the microbiota of the intestinal tract of aquatic animals.

Key words: *Bacillus*; antibacterial activity; *Vibrio*; antagonism; *in vitro* bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do teste de antagonismo pelo método estrias cruzada (<i>streak cross</i>).....	19
Figura 2 – Fluxograma do preparo do extrato bacteriano.....	20
Figura 3 – Fluxograma do antibiograma pelo método difusão em poços.....	21
Figura 4 – Fluxograma da extração da porção lipopeptídica dos líquidos metabólicos bacterianos.....	22
Figura 5 – Fluxograma da atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos pela técnica de Bioautografia.....	23
Figura 6 – Imagens dos resultados das CCD em luz UV realizadas com os extratos lipopeptídicos das bactérias e suas respectivas bioautografias frente <i>V. harveyi</i> ATCC 14126: (A) <i>Bacillus</i> sp. (12); (B) <i>Bacillus</i> sp. (13); (C) <i>Bacillus pumilus</i> (34); (D) <i>Bacillus pumilus</i> (38); (E) <i>Arthrobacter</i> sp. (44); (F) <i>Bacillus</i> sp. (56); (G) <i>Bacillus</i> sp. (87).....	32
Figura 7 – Imagens dos resultados das CCD na luz UV realizadas com os extratos lipopeptídicos das bactérias e suas respectivas bioautografias frente <i>V. parahaemolyticus</i> IOC 18950: (A) <i>Bacillus</i> sp. (8); (B) <i>Bacillus</i> sp. (9); (C) <i>Bacillus</i> sp. (47); (D) <i>Micrococcus aloeverae</i> (92); (E) <i>Bacillus</i> sp. (51); (F) <i>Bacillus</i> sp.(52); (G) <i>Vibrio olivae</i> (120); (H) <i>Vibrio</i> sp. (121); (I) <i>Vibrio</i> sp. (167) e (J) <i>Vibrio</i> sp. (168).....	33
Figura 8 – Resultado da exposição da enzima proteinase K nos extratos lipopeptídicos selecionados: (A) <i>Bacillus</i> sp. (12); (B) <i>Bacillus</i> sp. (13); (C) <i>Bacillus pumilus</i> (34); (D) <i>Bacillus pumilus</i> (38); (E) <i>Bacillus</i> sp. (51); (F) <i>Vibrio olivae</i> (120); (G)) <i>Bacillus</i> sp. e (H) controles (+) e (-), frente o <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126 utilizando a técnica de difusão em poços.....	37
Figura 9 – Resultado da exposição da enzima proteinase K nos extratos lipopeptídicos selecionados: (A) <i>Bacillus</i> sp. (12); (B) <i>Bacillus</i> sp. (13); (C) <i>Bacillus pumilus</i> (34); (D) <i>Bacillus pumilus</i> (38); (E) <i>Bacillus</i> sp. (51); (F) <i>Vibrio olivae</i> (120); (G) <i>Bacillus</i> sp. e (H) controles (+) e (-), frente o <i>V. parahaemolyticus</i> IOC 18950 utilizando a técnica de difusão em poços.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem, identificação e características morfológicas e enzimáticas das estirpes bacterianas selecionadas para prospecção de biomoléculas ativas...	18
Tabela 2 – Resultado do teste de antagonismo frente ao <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC 18950 pela técnica de estrias cruzadas (<i>streak cross</i>).....	25
Tabela 3 – Resultado da atividade antibacteriana pela técnica difusão em poços dos extratos bacterianos livres de células.....	28
Tabela 4 – Resultado da atividade antibacteriana pela técnica de bioautografia dos extratos lipopeptídicos frente ao <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC 18950 e <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126 das cepas que tiveram positividade quanto a atividade antibacteriana dos extratos bacterianos livres de células.....	30
Tabela 5 – Resultado do efeito da temperatura na produção de lipopeptídeos dos extratos lipopeptídicos frente ao <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126 e <i>Vibrio parahemolyticus</i> IOC 18950 selecionados utilizando a técnica de difusão em poços.....	34
Tabela 6 – Resultado da atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos pós exposição a proteinase K frente ao <i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126 e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC 18950 selecionados utilizando a técnica de difusão em poços.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Vibrioses em ambientes de Cultivo de Camarões.....	11
2.2	Consequências do uso de antibióticos em ambientes de Cultivo de Camarões.....	12
2.3	Uso de probióticos no Cultivo de Camarões.....	13
2.4	Atividade antagonista de bactérias.....	13
2.5	Bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas.....	14
2.6	Lipopeptídeos.....	15
2.7	Lipopeptídeos como potencial antimicrobiano para a indústria de aditivos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Informações da origem, identificação e características das estirpes selecionadas.....	17
3.2	Reativação das culturas bacterianas e verificação da pureza.....	19
3.3	Teste de antagonismo: técnica de estrias cruzadas (<i>streak cross</i>).....	19
3.4	Extrato bacteriano livre de células (líquido metabólico).....	20
3.5	Atividade antibacteriana por difusão em poços.....	21
3.6	Obtenção de extrato lipopeptídico.....	21
3.7	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	22
3.8	Atividade antibacteriana pela técnica de Bioautografia.....	22
3.9	Efeitos da temperatura sobre a atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos bacterianos (ELB).....	23
3.10	Efeitos da exposição à enzima proteinase K sobre a atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos bacterianos (ELB).....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	ANEXO A – Local de origem das cepas estudadas.....	50

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de doenças infecciosas causadas por patógenos bacterianos é um dos principais problemas no campo clínico e animal. Esse é um dos mais complexos desafios da saúde global, já que os antibióticos estão perdendo a eficácia após anos de uso excessivo na medicina humana, saúde animal e atividades agrárias (INOUE; MINGHUI, 2017; SANCHES *et al.*, 2020).

Os patógenos de camarão afetam a produção e resultam em perdas econômicas aos empreendimentos (MOSS *et al.*, 2012; THITAMADEE *et al.*, 2016; ROCHA, 2018). Diante desse problema, os antimicrobianos foram utilizados no controle de infecções bacterianas na carcinicultura inicialmente. Entretanto, o seu uso indiscriminado gerou consequências negativas, como a indução de resistência a antibióticos em microrganismos patogênicos e transferência de genes de resistência dentro da comunidade bacteriana, transformando esses tratamentos ineficazes para o combate de enfermidades (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2017).

Geralmente, uma alternativa ao uso de antibióticos na aquicultura são os probióticos, os quais usam os princípios de exclusão competitiva para aumentar a resistência dos animais cultivados aos patógenos. A seleção de estirpes probióticas se baseia em atividade antagônica frente a patógenos de animais cultivados. Portanto, é importante o entendimento desses mecanismos e descoberta de novos compostos e moléculas com potencial atividade antimicrobiana (KNIPE *et al.* 2021).

Nessa abordagem em busca de inovação tecnológica, a triagem de cepas de bactérias capazes de produzir substâncias inibidoras é o primeiro passo na descoberta de novos compostos (IMADA *et al.*, 2007). Aliado a isso, a existência de novas estratégias para pesquisa em produtos naturais microbianos, principalmente aquelas que direcionam a busca por substâncias em microrganismos e a utilização de ferramentas genômicas para o acesso a novos produtos naturais, juntamente com novos ensaios biológicos adotados nas triagens de tais substâncias, podem acelerar esse processo de descoberta de novos antimicrobianos (GUIMARÃES; MONESSO; PUPO, 2010).

Essas etapas são promissoras no cumprimento do objetivo de busca por novos compostos terapêuticos uma vez que, historicamente, os antibióticos foram descobertos em grande parte através da triagem da microbiota do solo em busca de metabólitos secundários que previniam o crescimento de bactérias patogênicas (CLARDY *et al.*, 2006; WRIGHT, 2017). Dentre esses, o gênero *Bacillus* pode ser destacado, por ser um exemplo de um grupo

de bactérias, abundante, e capazes de produzir dezenas de compostos antibióticos com várias propriedades químicas (STEIN, 2005), entre os quais os derivados de peptídeos são mais estudados (MANNANOV; SATTAROVA, 2001; STEIN, 2005).

Isto posto, o presente estudo teve como objetivo geral detectar atividade antibacteriana em metabólitos secundários lipopeptídicos de culturas bacterianas que fazem parte do acervo da coleção de culturas microbianas Profa. Regine Vieira e que foram isoladas a partir do trato gastrointestinal de crustáceos.

Para atingir o objetivo principal, foram considerados os objetivos específicos:

- a) selecionar no acervo bacteriológico cepas com atividade antagonista contra *V. harveyi*;
- b) testar o antagonismo dessas bactérias frente ao *V. parahaemolyticus*;
- c) testar a atividade antibacteriana dos líquidos metabólicos bacterianos brutos obtidos do crescimento das culturas em meios não seletivos;
- d) extrair a porção lipopeptídica do líquido metabólico das bactérias com resultados positivos no teste de atividade antibacteriana com líquido metabólico bruto;
- e) submeter os extratos lipopeptídicos a Cromatografia em Camada Delgada (CCD);
- f) avaliar o comportamento dos extratos lipopeptídicos metabólicos utilizando a técnica de bioautografia;
- g) testar o efeito da exposição dos extratos lipopeptídicos a temperaturas mais elevadas (45°C e 100°C) sobre os componentes antibacterianos ativos;
- h) testar o efeito da exposição dos extratos lipopeptídicos a ação enzimática da proteinase K.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vibrioses em ambientes de cultivo de camarões

O camarão *Penaeus vannamei* (anteriormente conhecido como *Litopenaeus vannamei*), pertence à família Penaeidae, conhecida por seu enorme valor na aquicultura. *P. vannamei* ocupa o primeiro lugar entre os camarões mais cultivados em nível global devido ao seu valor comercial e excelente capacidade de reprodução (CORNEJO-GRANADOS *et al.*, 2017).

Diversas espécies de bactérias reconhecidas por serem patogênicas aos camarões cultivados estão presentes nos mais diversos sistemas de aquicultura, entretanto, a maioria é oportunista e necessita que os animais fiquem vulneráveis para que a infecção possa acontecer (YU *et al.*, 2022). Os patógenos de camarão têm sido responsáveis por grandes perdas econômicas, 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). Infecções bacterianas são um grande desafio para a indústria da aquicultura de camarão tendo as espécies de *Vibrio* como os principais patógenos de camarão (CHU *et al.*, 2016). Essas infecções por bactérias do gênero *Vibrio* se tornaram um problema econômico na carcinicultura mundial, portanto, existe a necessidade de estudos sobre alternativas de controle e prevenção para o enfrentamento desses casos (REBOUÇAS, 2017). As espécies *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus* estão entre os patógenos mais críticos para camarões (ZHOU *et al.*, 2012).

Esse gênero de bactérias geralmente faz parte da microbiota natural dos camarões (ZHANG *et al.*, 2014). Entre os mais recentes surtos de doenças bacterianas conhecidas está a Síndrome de Mortalidade Precoce (EMS) ou Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) causada por *Vibrio parahaemolyticus*, que apresenta mortalidade de quase 100% dos juvenis de camarão que são afetados. Os animais com sintomas característicos da AHPND morrem dentro de 20 a 30 dias (TRAN *et al.*, 2013). O *Vibrio harveyi* é considerado também um patógeno para várias espécies de invertebrados marinhos (ZHANG; HE; AUSTIN, 2020), podendo causar a AHPND em *Penaeus vannamei* (MUTHUKRISHNAN *et al.* 2019).

As vibrioses causam taxas de mortalidade massivas e podem afetar 100% da produção (FLEGEL, 2006; FLEGEL, 2012). A ocorrência de taxas elevadas de bactérias do gênero *Vibrio* no sistema de cultivo além de acarretar altas taxas de mortalidade e lesões nos organismos cultivados, contribui para a entrada de outras enfermidades (FEIJÓ, 2009). Dentre

os principais problemas que essas bactérias podem acarretar aos organismos cultivados, destacam-se: as altas taxas de mortalidade, animais com lesões e/ou necrose muscular, baixa taxa de crescimento dos indivíduos cultivados, degradação dos tecidos, inatividade e alterações nas metamorfoses larvais (VIEIRA, 2009; LINDOSO, 2017).

2.2 Consequências do uso de antibióticos em ambientes de cultivo de camarões

Na aquicultura, o uso de antimicrobianos pode contaminar o meio ambiente é um risco com consequências aos ecossistemas aquáticos, pois promove a transmissão de genes de resistência no ambiente (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014). Devido ao aumento da demanda, as práticas modernas de aquicultura usam antibióticos, agroquímicos e várias outras estratégias para superar doenças infecciosas. Esses antimicrobianos provokem a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (SAPKOTA *et al.*, 2008).

A disseminação de espécies bacterianas multirresistentes tem como fonte o meio ambiente, como por exemplo, rios e sedimentos, que atuam como semeadores de genes de resistência a antibióticos em agentes oportunistas clinicamente relevantes (ROCHA, 2016).

Um cenário como este, demonstra a necessidade de programar ações para que ocorra a redução do uso de antimicrobianos, além de reduzir a geração e disseminação de resistência microbiana, como por exemplo, a aplicação de boas práticas sanitárias e uso consciente de antibióticos (EGUIGUREN; ROJAS, 2018). Com o passar dos anos, a preocupação pública com a possibilidade de transferência dos antibióticos ao consumidor final resultou a proibição do uso de antibióticos na aquicultura em muitos países. Essa ação visou o aprimoramento da produtividade e a garantia de alternativas para tratamento de doenças nos organismos de cultivo (NG; KOH, 2016).

Nos últimos anos, doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes representam uma ameaça grave à saúde pública (HULME, 2017). O surgimento contínuo dessas bactérias resistentes é uma preocupação crescente na população, por estar rapidamente superando o desenvolvimento de novos antibióticos e estar amplamente associada ao aumento de morbidade, mortalidade e custo dos cuidados (DA SILVA; AQUINO, 2018) desafiando o campo da ciência a desenvolver novas drogas mais eficazes ou estratégias alternativas para superar doenças infecciosas e aumentar a produção de camarão.

2.3 Uso de probióticos no cultivo de camarões

Probióticos para o uso na criação de camarão são selecionados para testes *in vivo* com base em sua capacidade de excluir patógenos competitivamente *in vitro*. Poucos estudos tentaram identificar os mecanismos subjacentes envolvidos na inibição do crescimento bacteriano, no entanto, eles ilustram coletivamente a importância de compreender as interações entre o patógeno e os agentes probióticos, determinando características específicas da cepa microbiana componente do probiótico (KNIPE *et al.*, 2021). Como no estudo de Sorieul *et al.* (2018) onde foi confirmado a segurança da administração de *Pseudomonas* sp. NC201 para subadultos de camarão e foi destacado o efeito protetor desta cepa bacteriana contra estresses bióticos e abióticos. No entanto, a base desse efeito benéfico ainda não foi explicado.

O impacto do tratamento com probióticos na microbiota intestinal do camarão e na resistência a doenças também deve ser cuidadosamente considerado para não reduzir a abundância de outras espécies ecologicamente importantes. Uma consideração especial deve ser dada à identificação e teste de probióticos que são capazes de prevenir o início da doença com efeitos limitados na estrutura e função da comunidade microbiana. Além disso, a eficiência do tratamento pode ser melhorada considerando a estratégia de vida competitiva das espécies probióticas. Estudos futuros devem investigar isso, validando as estratégias competitivas usadas *in vivo*, e projetando ensaios de desafio de patógenos que comparem os efeitos da administração de probióticos antes e no início da doença, avaliando o microbioma intestinal do camarão e resistência a doenças (KNIPE *et al.*, 2021).

2.4 Atividade antagonista de bactérias

No habitat natural a competição por espaço e alimento comumente acontece por vários grupos de bactérias que usam de propriedades de inibição ou atividade antagônica como uma arma contra seus concorrentes (EL-KHOLY *et al.*, 2014), eles possuem uma grande variedade de compostos antimicrobianos ou bacteriocinas (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Portanto, a atividade antagônica é feita pelo modo de ação tanto por competição direta quanto pela produção de enzimas inibitórias (BANERJEE; RAY, 2017). Essa competição por interferência normalmente envolvem a produção de antimicrobianos, que variam de cepas específicas (YANG *et al.*, 2014).

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 antagônica contra diferentes tipos de patógenos (BANERJEE; RAY, 2017).

Entretanto, a maioria dos pesquisadores concentram suas investigações sobre a avaliação do sobrenadante bruto de culturas de candidatos probióticos (metabólito secundário) contra patógenos de animais aquáticos. Apesar disso, os detalhes e informações sobre a caracterização da compostos como as bacteriocinas produzidas por candidatos probióticos são escassos nos últimos anos, poucos relatórios foram publicados. Para melhorar o tema da pesquisa probiótica no futuro, investigações detalhadas da atividade antimicrobiana de cepas probióticas contra patógenos potenciais de organismos aquáticos devem ser conduzidas (SORIEUL *et al.*, 2018), ampliando as pesquisas para outras perspectivas.

2.5 Bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas

A produção de compostos antimicrobianos parece ser um fenômeno geral para a maioria das bactérias. Elas possuem uma variedade de sistemas de defesa microbiano, produzindo antibióticos clássicos de amplo espectro a subprodutos metabólicos como ácidos orgânicos. Além disso, vários tipos de exotoxinas proteicas e bacteriocinas, que são porções peptídicas biologicamente ativas com modo de ação bactericida já foram descritas (RILEY; WERTZ, 2002; YEAMAN; YOUNT, 2003).

A diversidade de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas é maior em comparação as bactérias Gram positivas. Entre várias espécies bacterianas, as do gênero *Bacillus* são o grupo bem caracterizado por suas atividades antagônicas, diversidade de bacteriocinas e ampla distribuição (ABRIOUEL *et al.*, 2011). Este gênero produz uma gama diversificada de mais de 20 tipos diferentes de compostos antimicrobianos (incluindo antibióticos polipeptídicos, bacteriocinas e lipopeptídeos), com uma ampla variedade de atividades que vão desde antibacteriana e antifúngica a anticancerígena e antiviral (MARTIRANI *et al.*, 2002; STEIN, 2005). As bactérias ácidos lácticas (BALs) possuem as características gerais de serem: Gram-positivas, catalase negativas, geralmente não móveis, não formadores de esporos e cocos que produzem ácido láctico como o principal produto final da fermentação de carboidratos (STIEGLMEIR *et al.*, 2009). Várias espécies de *Vibrio* foram investigadas por seu potencial probiótico em camarões e mostraram produzir antimicrobianos extracelulares, capazes de inibir o crescimento de patógenos tanto de organismos aquáticos e

humanos (PHAM *et al.*, 2014). Sendo essas bactérias também candidatas a prospecção de compostos bioativos para a indústria.

2.6 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são moléculas bioativas de pequena massa molecular (incluindo surfactina, iturina, fengicina, micossutilina etc.) que exibem surfactante e fortes atividades antimicrobianas (LEE *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2010). Eles possuem diversas vantagens, como a sua natureza ecologicamente correta e não poluentes, e uma gama mais abrangente de produtos bacteriostáticos (MEENA, KANWAR, 2015).

Os lipopeptídeos também são conhecidos por terem toxicidade muito baixa (DERAVEL *et al.*, 2014; RONGSAYAMANONT *et al.*, 2017) alta biodegradabilidade (MULLIGAN, 2005, MEENA, KANWAR, 2015; MEENA, SHARMA, KANWAR, 2017), podendo assim serem usados como agentes antimicrobianos contra patógenos de camarão. O lipopeptídeo tem várias vantagens devido ao alto rendimento, estabilidade em pH e temperaturas extremas (ALJOWAIE *et al.*, 2021). Além disso, os microrganismos não se tornam facilmente resistentes aos peptídeos quando comparados aos antibióticos convencionais (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). A diversidade de fontes e estruturas-alvo dos antimicrobianos lipopeptídeos permite a utilização como alternativa aos antibióticos convencionais (PRATHIVIRAJ *et al.*, 2021).

2.7 Lipopeptídeos como potencial antimicrobiano para a indústria de aditivos

Um potencial substituto dos antibióticos são os aditivos, que podem atuar como promotor de melhor desempenho, como protetor dos animais contra patógenos atuando como o reforço do mecanismo de defesa inato de camarões (DAWOOD *et al.*, 2015). Esses aditivos funcionais são considerados uma alternativa eficiente para o melhoramento da produção e saúde dos animais cultiváveis para o incremento da produção aquícola (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2019).

Os aditivos possuem a definição de ingredientes não nutritivos, que são adicionados nas formulações de rações para influenciar as propriedades físicas ou químicas para que ocorra a melhoria no desempenho dos animais aquáticos que os consomem (COUTTEAU, 2016). No Brasil, os aditivos têm um futuro promissor na aquicultura. Esse incremento é de interesse para a aquicultura e implica em inovação para os sistemas de

cultivo, nutrição e prevenção de surtos de doença, representando uma oportunidade para o desenvolvimento de pesquisas para a produção de aditivos ecologicamente sustentáveis adaptados às condições brasileiras de cultivo (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2019).

Até o momento, são escassas as informações sobre aditivos utilizando lipopeptídeos como suplementação em dietas na aquicultura de camarões (PRATHIVIRAJ *et al.* 2021). Os componentes da dieta têm um impacto na composição do microbioma intestinal (DANIEL *et al.*, 2014). As alterações no hábitos alimentares do camarão podem levar a um microbioma intestinal mais saudável, aumentando a resistência à patógenos nocivos e garantindo um bom desempenho zootécnico. Portanto, a formulação de lipopeptídeo na dieta do camarão poderia ser benéfica no combate às infecções. Mas, até agora, o efeito de dieta formulada com lipopeptídeos no microbioma intestinal de camarão é incerta (PRATHIVIRAJ *et al.* 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Informações da origem, identificação e características das estirpes selecionadas

As cepas utilizadas nesse estudo fazem parte do acervo de culturas microbianas Prof. Regine Vieira do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP). O critério usado na seleção das estirpes foram a origem no trato gastro intestinal de crustáceos e a atividade antagônica positiva frente a *Vibrio harveyi* ATCC 14126.

Todas as estirpes foram identificadas por sequenciamento da região 16S rRNA e submetidas a testes para determinação de grupos bacterianos: *Bacillus* produtores de esporos (TRAVERS; MARTIN; REICHELDERFER, 1987), BALs - Bactérias Ácido Lácticas (HAJAR; HAMID, 2013); grupos enzimáticos: proteolíticas e amilolíticas (SIZEMORE; STEVENSON, 1970), lipolíticas (SIERRA, 1957) e celulolíticas (LUCKOVICH, STELLWAG, 1993).

Essas estirpes foram avaliadas quanto à produção de enzimas extracelulares bacterianas relacionadas à patogenicidade: Elastase (RUST; MESSING; IGLEWSKI, 1994); Gelatinase, Caseinase, Lipase e Fosfolipase (RODRIGUES *et al.*, 1993). E foram testadas quanto a aderência em microplacas utilizando 200µl de células em suspensão incubadas a 35°C por 48h, seguindo a descrição de Christensen *et al.* (1985).

As estirpes foram submetidas às condições extremas de temperatura e pH. Foi verificada a capacidade de crescimento em valores de pH 5 e 9 em caldo LB (*Luria Bertani*) a 35°C por até 48h, seguindo as recomendações de Cai *et al.* (1999). Já a tolerância à temperatura foi verificada com as estirpes sendo expostas ao crescimento a 4°C e 40°C, inoculadas em meio caldo LB (*Luria Bertani*) por 24h. As informações da origem, identificação e características das estirpes selecionadas seguem na Tabela 1.

Tabela 1 – Origem, identificação e características morfológicas e enzimáticas das estirpes bacterianas selecionadas para prospecção de biomoléculas ativas

Código das Cepas	Origem	Identificação	Grupo Origem	Gram	Aderência	Virulência	pH		T°C	
							4	9	4	40
8	Intestino de caranguejos	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	+	+	C e F	+		+	+
9		<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	+	+					
12		<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	+	-					
13		<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	+	+	C e F	+		+	+
25	Intestino de camarões cultivados em águas claras	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	+	-					
27		<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>	+	-					
44		<i>Arthrobacter</i> sp.	BAL	+	-					
47		<i>Bacillus</i> sp.	BAL	+	-					
48		<i>Arthrobacter</i> sp.	BAL	+	-					
51		<i>Bacillus</i> sp.	BAL	+	+	C e F	+	+	+	+
52		<i>Bacillus</i> sp.	BAL	+	+	C e F	+	+	+	+
56		<i>Bacillus</i> sp.	BAL	+	-					
91		<i>Staphylococcus</i> sp.	Proteolítica	+	-					
92		<i>Micrococcus aloeverae</i>	Proteolítica	+	-					
133	<i>Vibrio</i> sp.	Amilolítica	-	+	F	+	-	+	+	
34	Intestino de camarões cultivados em bioflocos	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i>	+	+					
38		<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus</i>	+	+					
87		<i>Bacillus</i> sp.	BAL	+	-					
117		<i>Vibrio</i> sp.	Proteolítica	-	+	G	+	+	+	+
120		<i>Vibrio olivae</i>	Proteolítica	-	+	-	+	+	+	+
121		<i>Vibrio</i> sp.	Proteolítica	-	+	-	+	+	+	+
167		<i>Vibrio</i> sp.	Celulolítica	-	+	L	+	-	+	+
168		<i>Vibrio</i> sp.	Celulolítica	-	+	F	+	+	+	+
171		<i>Vibrio</i> sp.	Celulolítica	-	+	F	+	+	+	+
186		<i>Vibrio</i> sp.	Lipolíticas	-	+	-	+	+	+	+
191	<i>Vibrio</i> sp.	Lipolíticas	-	+	G	+	-	+	+	

Fonte: elaborada pelo autora.

Legenda: BAL = Bactérias ácido lácticas C = Caseinase L = Lipase G = Gelatinase E = Elastase F = Fosfolipase, T°C: temperatura.

3.2 Reativação das culturas bacterianas e verificação da pureza

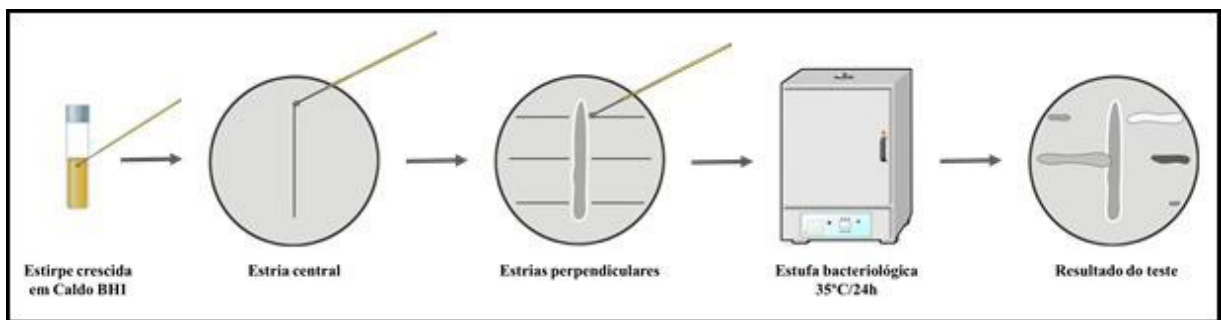
As cepas selecionadas foram reativadas para verificação de condições de culturabilidade e pureza. Inicialmente foram feitos repiques em meio de cultura caldo LB (*Luria Bertani*) 1% de NaCl e incubação em estufa a 35° C por 24 h. Depois desse período, alçadas do material crescido foram repicadas na superfície de meio não seletivo Agar TSA

(Tryptic Soy Agar) acrescido de 1% de NaCl. Em seguida, as cepas foram submetidas à coloração de Gram para confirmação da morfologia e agrupamento celular e verificação de pureza das mesmas. As cepas foram confirmadas em Gram-positivas e Gram-negativas conforme a sua identificação.

3.3 Teste de antagonismo: técnica de estrias cruzadas (*streak cross*).

O teste de antagonismo foi realizado pelo método de estrias cruzadas (*streak cross*), de Williston, Zia-Walrath e Youmans (1947) com adaptações, conforme Figura 1. As estirpes selecionadas que apresentaram antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* ATCC 14126 foram testadas também frente ao *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950.

Figura 1 – Fluxograma do teste de antagonismo pelo método estrias cruzada (*streak cross*)

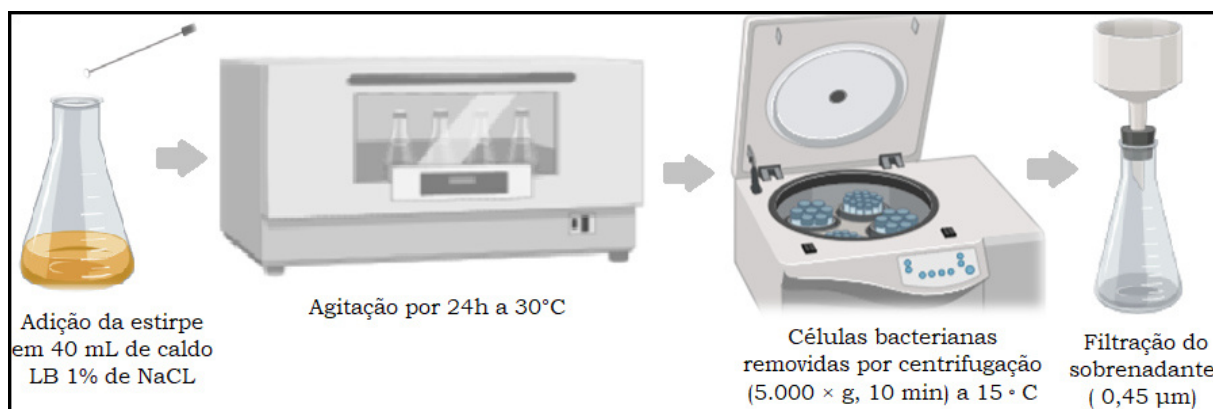


Fonte: Adaptado MAIA, 2021.

O teste consistiu no inóculo central (estria) sobre a superfície de Ágar TSA (acrescido com 1% de NaCl) usando a estirpe bacteriana indicadora, em placas de Petri. Em seguida foram feitas estrias perpendiculares e distantes 0,5 mm do inóculo central com as cepas a serem testadas. O resultado foi observado após incubação em estufa a 35°C por 24h. O antagonismo entre as cepas foi verificado pela formação de uma zona de inibição entre as estrias perpendiculares à estria central.

3.4 Extrato bacteriano livre de células (líquido metabólico)

As cepas selecionadas nesse estudo foram cultivadas em 40 mL de caldo LB acrescido de 1% de NaCl com agitação por 24 h a 30°C. As células bacterianas foram removidas por centrifugação (5.000 × g, 10 min) a 15°C e o sobrenadante livre de células das culturas foi filtrado com filtro Durapore™ de 0,45 µm (Milipore, Billerica, EUA) conforme esquematizado na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma do preparo do extrato bacteriano

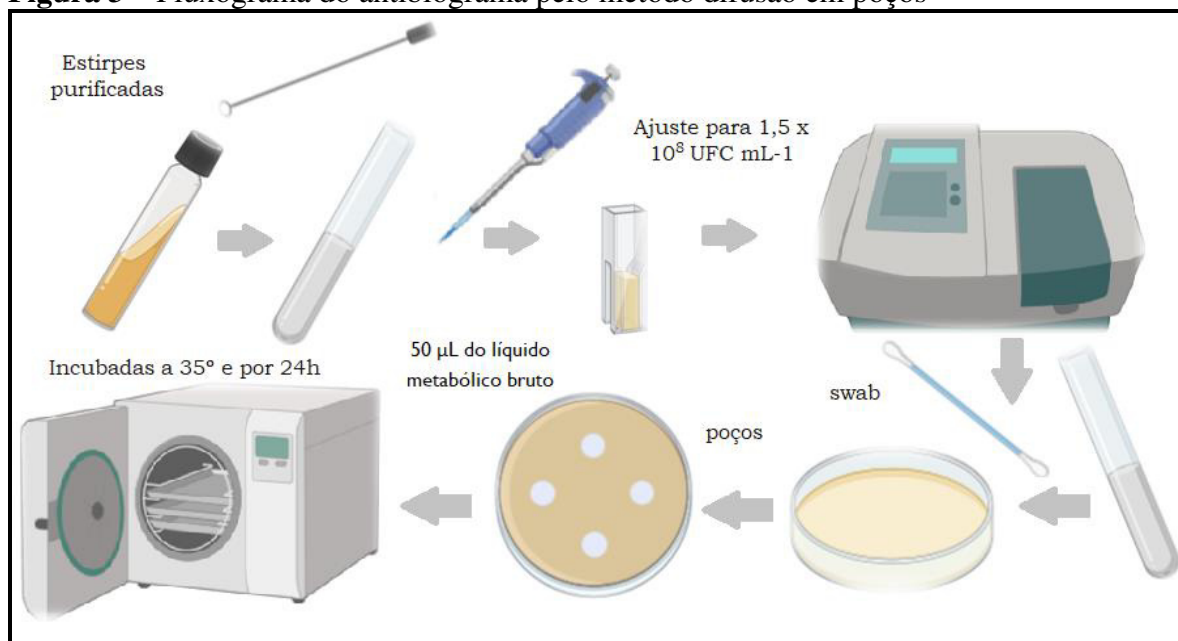
Fonte: elaborada pela autora.

3.5 Atividade antibacteriana por difusão em poços

Para verificar o potencial antimicrobiano dos líquidos metabólicos foram realizados testes de antibiograma segundo o método de difusão em poços seguindo a orientação ditada pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016).

Foram utilizadas para os testes cepas-padrão de *Vibrio harvey* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950. Os inóculos foram preparados em tubos de ensaio contendo solução salina 1%, tendo a turbidez ajustada de acordo com a escala de McFarland 0,5 e verificada em espectrofotômetro com leitura a 625 nm. O inóculo foi distribuído uniformemente na superfície do meio ágar *Muller-Hinton* (Difco) (1% NaCl) em placas de Petri com auxílio de *swabs* esterilizados, e em seguida foram perfurados poços na camada de Ágar. Alíquotas de 50 µL do líquido metabólico foram adicionados nos poços e em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas (CLSI, 2016). Os testes foram feitos em duplicata. No controle negativo foi adicionado água destilada esterilizada em um poço para demonstrar a ausência de halo e como controle positivo o antibiótico Canamicina 30 µM para evidenciar atividade antibacteriana com a presença de um halo (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma do antibiograma pelo método difusão em poços



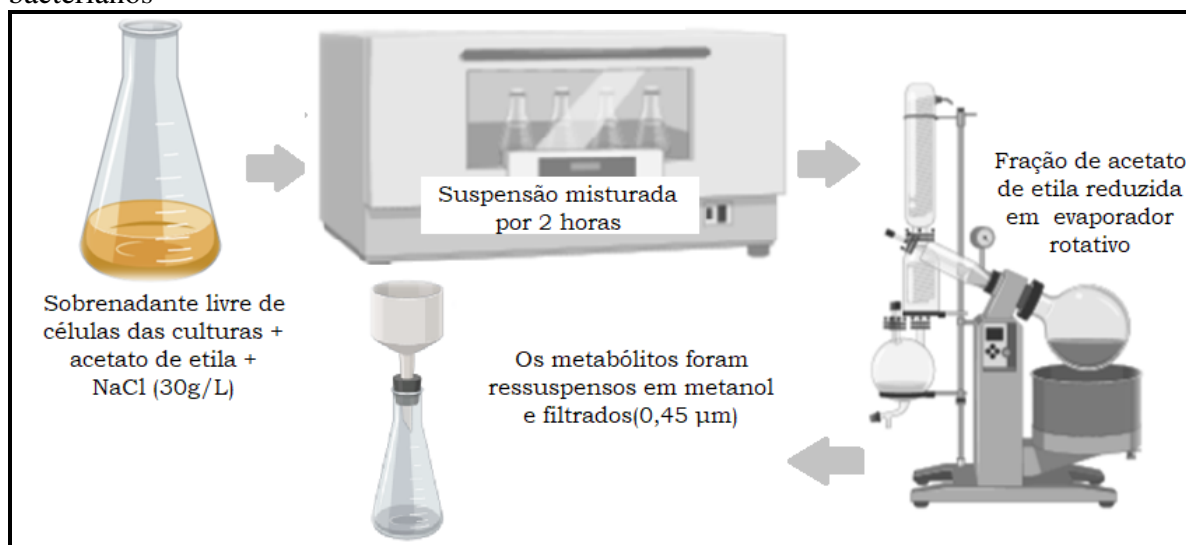
Fonte: elaborada pela autora.

3.6 Obtenção de extrato lipopeptídico

Isolamento de lipopeptídeos (LP) por extração foi feita nas cepas que apresentaram atividade antibacteriana frente a, pelo menos, uma bactéria indicadora (as cepas-padrões de *Vibrio harvey* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950). As cepas foram cultivadas em 40 mL de caldo LB, com agitação, por 24 h a 30°C. O volume obtido foi usado para a purificação de lipopeptídeos de cada cepa.

As células bacterianas foram removidas por centrifugação (5000 × g, 10 min) a 15°C, e o sobrenadante livre de células das culturas foi usado para a extração de lipopeptídeos com acetato de etila. O sobrenadante da cultura e o solvente acetato de etila foram misturados em uma proporção de volume de 1: 1,1 (v / v), com a adição de NaCl (30 g / L). A suspensão foi misturada por 2 h em um sistema magnético mixer. A fração de acetato de etila foi coletada e foi secada em um evaporador rotativo (Büchi Rotavapor R-215, Suíça). Os metabólitos foram ressuspensos em metanol e filtrada através de um filtro Durapore™ de 0,45 µm (Milipore, Billerica, EUA), seguindo as recomendações de Dimkic *et al.* (2017), conforme o ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma da extração da porção lipopeptídica dos líquidos metabólicos bacterianos



Fonte: elaborada pela autora.

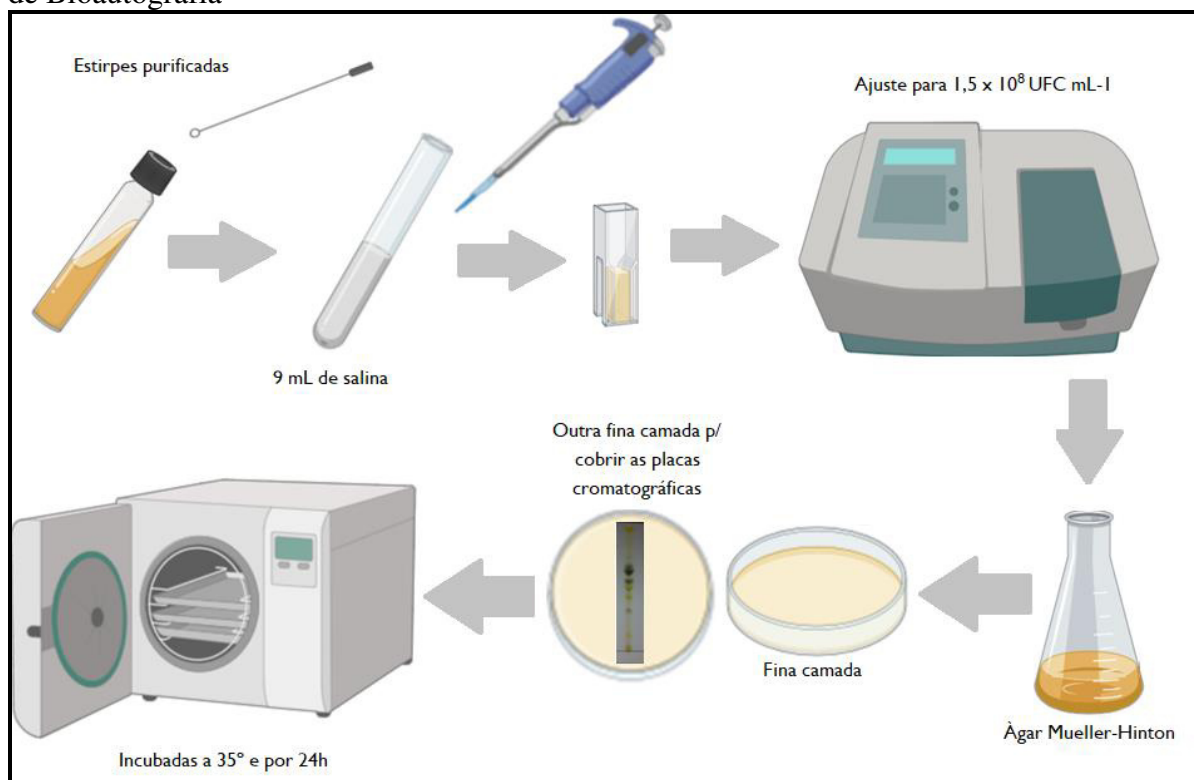
3.7 Cromatografia em camada delgada (CCD).

Os extratos lipopeptídicos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD). Os extratos foram aplicados em placas de sílica gel (ALUGRAM Xtra SIL G/UV254) e como fase móvel foram utilizados Metanol: ácido acético: benzeno (3:1:0,5). A migração pela fase fixa (sílica gel) promove a separação de compostos dos extratos e em seguida a placa de sílica foi aerada para eliminar a possível interferência dos solventes no teste antimicrobiano. Após a corrida, as substâncias foram reveladas por meio de exposição a luz UV (LONG WAVE ULTRAVIOLET 365 nm), com a finalidade de mostrar compostos que não apareceram em luz natural.

3.8 Atividade antibacteriana pela técnica de Bioautografia.

Para detectar a atividade antibacteriana através da aplicação da técnica de bioautografia (PESSINI *et al.*, 2003). As placas cromatográficas anteriormente utilizadas na separação dos compostos foram colocadas em placas de Petri e cobertas com uma camada do meio de cultivo ágar *Mueller-Hinton* fundido e inoculado com culturas bacterianas indicadoras em concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, ajustadas em solução salina 1% a turbidez de acordo com a escala de Mc.Farland 0,5 verificada em espectrofotômetro com leitura a 625 nm. Após a solidificação do ágar, as placas foram levadas à estufa a 35° C por 24 horas (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma da atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos pela técnica de Bioautografia



Fonte: elaborado pela autora.

Após incubação, a superfície do meio de cultivo foi borrifada com uma solução de cloreto de tetrazólio 5% e incubada novamente em estufa a 35°C por 2 horas. Esse revelador facilita a visualização de zonas claras ao redor da área de corrida nas cromatoplasmas indicando inibição do crescimento das estirpes bacterianas indicadoras.

3.9 Efeitos da temperatura sobre a atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos bacterianos (ELB)

Os extratos lipopeptídicos com atividade antibacteriana detectada foram submetidos a temperaturas de 45°C e 100°C por períodos de 30 e 60 minutos, cada temperatura seguindo as orientações de Choeisoongnern *et al.* (2020). Depois da exposição, a atividade antibacteriana foi novamente testada.

3.10 Efeitos da exposição à enzima proteinase K sobre a atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos bacterianos (ELB)

Os extratos lipopeptídicos com atividade antibacteriana detectada foram expostos a ação enzimática. Foi utilizado 50 µL do extrato lipopeptídico + 50 µL da solução enzimática proteinase K (foi incubada a 37°C por 4 h em tampão 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,0, posteriormente aquecida por 10 min a 100°C). Como controles positivo e negativo foram usados alíquotas da enzima ativada (solução enzimática de proteinase K) e inativada (solução enzimática de proteinase K aquecida por 10 min a 100°C), respectivamente. A enzima proteinase K foi utilizada a uma concentração final de 1 mg/ml, seguindo as orientações de Choeisoongnern *et al.* (2020) com adaptações. Após o resfriamento, a atividade antibacteriana foi testado novamente usando método de difusão em poços.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas selecionadas do acervo de bactérias isoladas do trato intestinal de crustáceos com perfil de antagonismo ao *Vibrio harveyi* ATCC 14126, também foram antagonicas ao *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950, conforme a Tabela 2. Essa capacidade vibriocida é um marcador importante na busca por bactérias produtoras de compostos bioativos para uso na carcinicultura.

Tabela 2 – Resultado do teste de antagonismo frente ao *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950 pela técnica de estrias cruzadas (*streak cross*)

Código das Cepas	Origem	Identificação	Antagonismo
8	Intestino de caranguejo	<i>Bacillus</i> sp.	+
9		<i>Bacillus</i> sp.	+
12		<i>Bacillus</i> sp.	+
13		<i>Bacillus</i> sp.	+
25	Intestino de camarão cultivado em águas claras	<i>Bacillus</i> sp.	+
27		<i>Bacillus</i> sp.	+
44		<i>Arthrobacter</i> sp.	+
47		<i>Bacillus</i> sp.	+
48		<i>Arthrobacter</i> sp.	+
51		<i>Bacillus</i> sp.	+
52		<i>Bacillus</i> sp.	+
56		<i>Bacillus</i> sp.	+
91		<i>Staphylococcus</i> sp.	+
92		<i>Micrococcus aloeverae</i>	+
133	<i>Vibrio</i> sp.	+	
34	Intestino de camarão cultivado em bioflocos	<i>Bacillus pumilus</i>	+
38		<i>Bacillus pumilus</i>	+
87		<i>Bacillus</i> sp.	+
117		<i>Vibrio</i> sp.	+
120		<i>Vibrio olivae</i>	+
121		<i>Vibrio</i> sp.	+
167		<i>Vibrio</i> sp.	+
168		<i>Vibrio</i> sp.	+
171		<i>Vibrio</i> sp.	+
186		<i>Vibrio</i> sp.	+
191	<i>Vibrio</i> sp.	+	

Fonte: elaborada pela autora.

Nesse contexto, Abreu (2019) ao prospectar estirpes potencialmente probióticas isoladas do trato intestinal de camarões cultivados detectou que os isolados apresentaram atividade antagonista positiva. Aproximadamente 32% das estirpes foram eficientes quando

testadas frente a estirpe patogêna *Vibrio harveyi*, dentre os isolados estão representantes dos grupos *Bacillus*, *Vibrios*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

O gênero *Bacillus* oferece uma infinidade de compostos antagonistas exibindo uma ampla gama de funções biológicas. Essa enorme versatilidade aumenta o interesse industrial e ambiental das cepas de *Bacillus*, especialmente quando se considera seu alcance de ação contra a bactérias de origem alimentar ou fitopatogênica, bem como seu histórico de uso seguro em alimentos (CAULIER *et al.*, 2019).

Entre os isolados selecionados o grupo da bactéria probiótica *Arthrobacter* tem demonstrado capacidade inibitória contra os vibrios patogênicos *V. parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio nereis* (Li *et al.*, 2006). Li *et al.* (2008) em um estudo mostraram que a alimentação com uma dose adequada da bactéria *Arthrobacter* pode modular a microflora do intestino fornecendo proteção contra os patógenos, presumindo o mecanismo de exclusão competitiva no intestino de camarões .

A bactéria *Micrococcus luteus* isolada do ambiente apresentou resultados promissores em testes de atividade antibacteriana, sendo capaz de produzir metabólitos antimicrobianos antagônicos a um grupo de patógenos de origem alimentar (AKBAR *et al.* 2014). Esse grupo de bactérias do gênero *Micrococcus* foi usado como suplemento na dieta de peixes e foi constatada sua capacidade de reduzir a microbiota patogênica (ABD EL-RHMAN *et al.*, 2009). Chabrillon *et al.* (2005) relataram características probióticas favoráveis em estirpes do gênero *Micrococcus* isoladas de dourada *Sparus aurata linnaeus* em termos de antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* com a exclusão competitiva. Sugita *et al.* (1998) relataram a atividade antibacteriana de *Micrococcus luteus* originário de intestino do peixe *Callionymus* sp. contra *Vibrio vulnificus*.

As bactérias do gênero *Vibrio* isolados do ambiente representam uma fonte de compostos que inibem os patogênicos *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*. Foi testado uma coleção de 3.456 isolados ambientais de *Vibrio* de diversos habitats. Em análises posteriores de sequenciamento dos genomas foram detectados, em todos os isolados, múltiplos agrupamentos de genes biossintéticos que codificam metabólitos secundários com potencial atividade antagônica (BURKS *et al.* 2017).

Restrepo *et al.* (2021) testaram a ação da bactéria *Vibrio* sp. como um probiótico com potencial de limitar os efeitos prejudiciais da necrose hepatopancreática aguda (AHPND) em camarões cultivados. Após os camarões serem desafiados com *V. parahaemolyticus* causador de AHPND foi verificada diferença na composição do microbioma gastrointestinal dos animais saudáveis e infectados. O experimento evidenciou o desafio de trabalhar com

estirpes de vibrios patogênicos, causadores de AHPND, e bactérias do mesmo gênero com ação probiótica uma vez que existe o risco potencial da cepa probiótica se tornar patogênica. Assim, os autores confirmaram que a cepa do gênero *Vibrio* pode adquirir o plasmídeo pV-AHPND via transferência horizontal e causar a doença em camarões.

Portanto, bactérias do gênero *Vibrio* podem se apresentar muitas vezes como patógenos oportunistas, fazendo com que este gênero não seja a primeira opção para formação de probióticos. Isso se baseia na necessidade de que os probióticos precisam de uma composição de espécies que não apresente risco aparente para o cultivo. No entanto, os vibrios não podem ser apenas descartados diante desse cenário, deve-se considerar a produção de substâncias bioativas que fazem deste gênero uma potencial fonte para prospecção de compostos.

Pesquisas anteriores têm demonstrado o efeito inibitório de extratos livres de células de *Bacillus* contra bactérias patogênicas do gênero *Vibrio*, sob condições *in vitro* e *in vivo*. Esses extratos e as substâncias isoladas a partir deles, poderiam ser uma alternativa ao uso de antibióticos em cultivos de camarão (SRINIVASAN; RAMASAMY, 2017; SRINIVASAN; RAMASAMY, 2009). Moshafi *et al.* (2011) após terem feito uma pesquisa sobre a curva de crescimento e a atividade inibitória de bactérias do gênero *Bacillus* evidenciaram que a maior atividade antimicrobiana foi obtida após a etapa estacionária na curva de crescimento.

Zokaeifar *et al.* (2012) também testaram o potencial de estirpes bacterianas probióticas para carcinicultura isoladas de picles fermentado frente as bactérias *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, patógenos de camarão. Esse tipo de bactérias que são produtoras de bacteriocinas obtidas a partir de produtos lácteos fermentados foram capazes de inibir o crescimento de espécies de *Vibrio* com resistência a múltiplos antibióticos, uma vez que se mostraram sensíveis às bacteriocinas produzidas *in vitro* e *in situ* (TEMITOPE *et al.*, 2020).

A detecção da produção de antibióticos por bactérias particulares é importante para determinar sua capacidade como agente de biocontrole contra doenças. A triagem de cepas candidatas à produção de antibióticos, seguida pela detecção direta de seus perfis de antibióticos, fornece uma abordagem rápida em comparação com o método tradicional de seleção (DE SOUZA; RAAIJAMAKERS, 2003).

Assim, nosso estudo focou na seleção de bactérias probióticas para prospecção de substâncias bioativas por serem eficientes contra representantes do gênero *Vibrio* elencadas entre os patógenos de camarão. O estudo foi direcionado para estratégias de extração de substâncias antibacterianas a partir de extratos bacterianos livres de células. Esses extratos

oriundos das cepas selecionadas foram testados frente a *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950 pelo método de difusão em poços, conforme o resultado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado da atividade antibacteriana pela técnica difusão em poços dos extratos bacterianos livres de células

Código das Cepas	Origem	Identificação	Antibiograma	
			<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	<i>V. parahaemolyticus</i> IOC 18950
8	Intestino de caranguejo (IC)	<i>Bacillus</i> sp.	+	+
9		<i>Bacillus</i> sp.	+	+
12		<i>Bacillus</i> sp.	+	-
13		<i>Bacillus</i> sp.	+	-
25	Intestino de camarões cultivados em águas claras (ICCAC)	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
27		<i>Bacillus</i> sp.	-	-
44		<i>Arthrobacter</i> sp.	+	-
47		<i>Bacillus</i> sp.	-	+
48		<i>Arthrobacter</i> sp.	+	-
51		<i>Bacillus</i> sp.	+	+
52		<i>Bacillus</i> sp.	-	+
56		<i>Bacillus</i> sp.	+	-
91		<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-
92		<i>Micrococcus aloeverae</i>	-	+
133		<i>Vibrio</i> sp.	-	-
34	Intestino de camarões cultivados em bioflocos (ICCB)	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+
38		<i>Bacillus pumilus</i>	+	+
87		<i>Bacillus</i> sp.	+	-
117		<i>Vibrio</i> sp.	-	-
120		<i>Vibrio olivae</i>	+	+
121		<i>Vibrio</i> sp.	-	+
167		<i>Vibrio</i> sp.	-	+
168		<i>Vibrio</i> sp.	-	+
171		<i>Vibrio</i> sp.	-	-
186		<i>Vibrio</i> sp.	+	+
191		<i>Vibrio</i> sp.	-	-

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: (+) = presença de halo de inibição nas placas testadas, (-) = ausência de halo. Presença de halo significa a existência de atividade antibacteriana dos extratos bacterianos.

As cepas 25, 27, 91, 117, 133, 171 e 191 não apresentaram atividade no teste do líquido metabólico (livre de células), entretanto no teste de antagonismo dependente de contato (célula contra célula) foram positivos.

Esse padrão pode ser explicado pela existência de diferentes vias antagônicas

interbacterianas. Já foram detectadas vias antagônicas em todos os principais filos bacterianos, incluindo mecanismos dependentes e independentes de contato, em muitos casos. O antagonismo dependente de contato é mediado por uma multiplicidade de sistemas de secreção, incluindo as vias tipo IV, V e VI em Organismos Gram-negativos e o sistema de secreção Esx de Bactérias Gram-positivas. Cada um desses sistemas fornece proteínas efetoras tóxicas para células vizinhas e emprega proteínas de imunidade cognata para prevenir a intoxicação por si mesmo e por células próximas. Esse antagonismo interbacteriano também pode ocorrer por outras vias, como troca de toxina mediada por fusão de membrana externa e produção de bacteriocinas associada à superfície. (PETERSON, BERTOLLI, MOUGOUS, 2020).

Outra possibilidade é a influencia da origem das cepas sobre os padrões de substâncias bioativas. As bactérias que foram isoladas do trato intestinal de caranguejos que são animais nativos foram quase todas eficientes contra as cepas indicadoras. Comparando com os isolados de animais cultivados foi verificado menor frequência de metabólitos com ação vibriocida.

Dentre as linhagens bacterianas, o gênero *Bacillus* vem sendo estudado devido à sua capacidade de produzir compostos inibitórios de estrutura diferentes (STEIN, 2005), sendo esse gênero considerado muito importante por isso. Além dos derivados peptídicos, antibióticos lipopeptídicos como a surfactina também foram isolados e caracterizados a partir deste gênero (MANNANOV; SATTAROVA, 2001). Uma ampla gama de substâncias antimicrobianas produzidas por *Bacillus* spp. isolados de artrópodes foram descritos, incluindo ácidos aromáticos, acetilaminoácidos (análogos de aminoácidos) (GEBHARDT *et al.*, 2002).

Caulier *et al.* (2019), em uma revisão sobre o grupo *Bacillus*, propuseram uma estrutura de classificação consistente com base em vias biossintéticas e natureza química. Essa classificação foi sugerida para estabelecer abordagens sistemáticas para descobertas e caracterizações de novas moléculas (biossíntese, natureza química e atividade). A maioria das publicações atuais relata atividade antimicrobiana de frações parcialmente purificadas que podem envolver misturas de compostos bioativos. E para avaliar a atividade de um composto único, são necessárias implementações de confirmação genética, para que novos compostos originários sejam identificados, caracterizados e devidamente classificados.

Isso posto, o fracionamento de extratos para melhor rateio da bioatividade é ideal para a melhor caracterização das substâncias bioativas. Com isso, foi feita a extração da porção lipopeptídica das cepas com atividade antibacteriana no teste anterior para a realização

da cromatografia em camada delgada dos extratos seguidos da bioautografia para confirmação da atividade antibacteriana dessa porção, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Resultado da atividade antibacteriana pela técnica de bioautografia dos extratos lipopeptídicos frente ao *V. parahaemolyticus* IOC 18950 e *Vibrio harveyi* ATCC 14126 das cepas que tiveram positividade quanto a atividade antibacteriana dos extratos bacterianos livres de células

Código das Cepas	Identificação das cepas dos Extratos Lipopeptídicos	Bioautografia
		<i>V. parahaemolyticus</i> IOC 18950
8	<i>Bacillus</i> sp.	+
9	<i>Bacillus</i> sp.	+
47	<i>Bacillus</i> sp.	+
51	<i>Bacillus</i> sp.	+
52	<i>Bacillus</i> sp.	+
92	<i>Micrococcus aloeverae</i>	+
120	<i>Vibrio olivae</i>	+
121	<i>Vibrio</i> sp.	+
167	<i>Vibrio</i> sp.	+
168	<i>Vibrio</i> sp.	+
		<i>V. harveyi</i> ATCC 14126
12	<i>Bacillus</i> sp.	+
13	<i>Bacillus</i> sp.	+
34	<i>Bacillus pumilus</i>	+
38	<i>Bacillus pumilus</i>	+
44	<i>Arthrobacter</i> sp.	+
48	<i>Arthrobacter</i> sp.	-
56	<i>Bacillus</i> sp.	+
87	<i>Bacillus</i> sp.	+

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: (+) = presença de halo de inibição nas placas testadas, (-) = ausência de halo. Presença de halo significa a existência de atividade antibacteriana dos extratos bacterianos.

O lipopeptídeo produzido pela bactéria *B. amyloliquefaciens* SU05 mostrou atividade potente frente a *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida*, *V. septicus*, *V. fischeri* e *V. Splendidus* (ALJOWAIE *et al.*, 2021). Chen *et al.* (2017) também revelaram que lipopeptídeos de *Bacillus licheniformis* MB01 inibiu fortemente *V. parahaemolyticus*.

Dimkic e *et al.* (2017), relataram que com base nos espectros de extratos lipopeptídicos, o rendimento global, ou seja, a intensidade relativa dos picos, foi maior para os extratos obtidos por extração com acetato de etila, evidenciando melhor rendimento com esse solvente. O processamento é uma etapa importante nos principais protocolos de produção de biomoléculas e a extração orgânica do sobrenadante da cultura constituindo uma prática frequente para a obtenção de produtos hidrofóbicos (CORONEL-LEÓN *et al.*, 2015).

Nesse estudo, a maioria dos líquidos metabólicos apresentou atividade antimicrobiana na porção lipopeptídica dos extratos selecionados frente as duas estirpes de *Vibrio* usadas como indicadores. Entretanto, alguns desses líquidos metabólicos testados foram efetivos apenas frente um dos patógenos testados. O metabolismo primário pode influenciar na produção de lipopeptídeos (WU *et al.*, 2019), por exemplo, acetato, lactato, acetoína e 2,3-butanodiol são metabólitos extracelulares primários produzidos por *Bacillus* spp. (DHALI *et al.*, 2017).

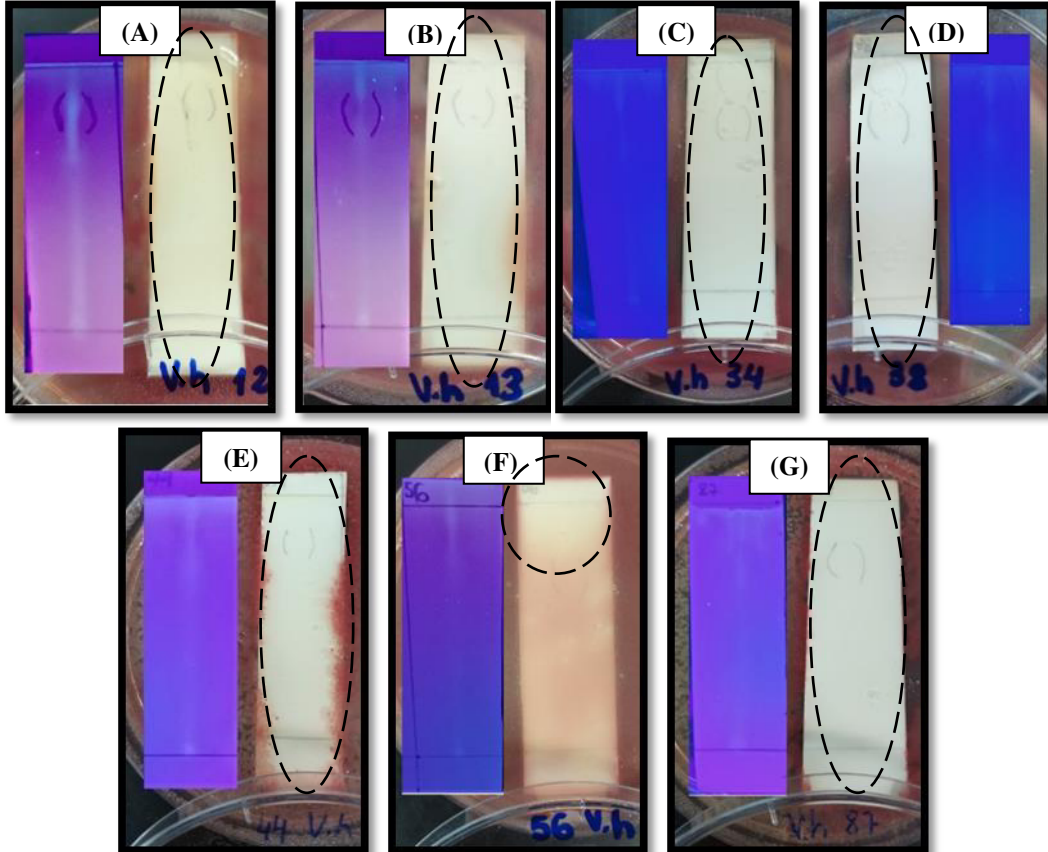
A bioautografia é um método sensível, qualitativo e, portanto, adequado nos estágios iniciais da pesquisa (MĀRGHITA *et al.*, 2013). Os ensaios bioautográficos, apesar de qualitativos, são uma ferramenta importante no auxílio para o isolamento e identificação dos compostos com atividade antimicrobiana (SILVEIRA, 2011). Entretanto, poucos estudos se concentraram nos supostos efeitos sinérgicos dessas misturas bioativas. Além disso, a concentração de compostos purificados ou semi-purificados muitas vezes permanece descaracterizada ou biologicamente irrelevante (CAULIER *et al.*, 2019).

Nesse estudo, a porção parcialmente purificada de lipopeptídeos quando testada a atividade antibacteriana pelo método de bioautografia mostrou-se eficiente contra os patógenos testados após a separação em CCD, entretanto é necessário uma caracterização química dos extratos para rastrear os compostos que foram responsáveis pela atividade antibacteriana.

A CCD juntamente com a bioautografia mostrou diferentes zonas inibição das bactérias vista pela formação de zonas claras no ágar (sem a coloração vermelha do corante indicador de crescimento bacteriano) e outras as zonas foi em toda a corrida e aquelas onde houve uma divisão ou separação de zonas ativas contra as bactérias. Os antibióticos de origem biológica muitas vezes vieram como misturas que parecem explorar o sinergismo como mecanismo de ação (PATEL *et al.*, 2014).

Portanto, os resultados dos testes de bioautografia para os extratos lipopeptídicos mostram que houve efeito sinérgico, pois, a ocorrência da atividade antibacteriana foi em maioria em torno de toda a corrida da CCD, conforme as figuras 6 e 7. Em contraste, Dimkic *et al.* (2017) obtiveram resultados diferentes, no teste de bioautografia a atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos individuais mostraram a presença de mais de uma zona de exibição, ou seja, não houve efeito sinérgico.

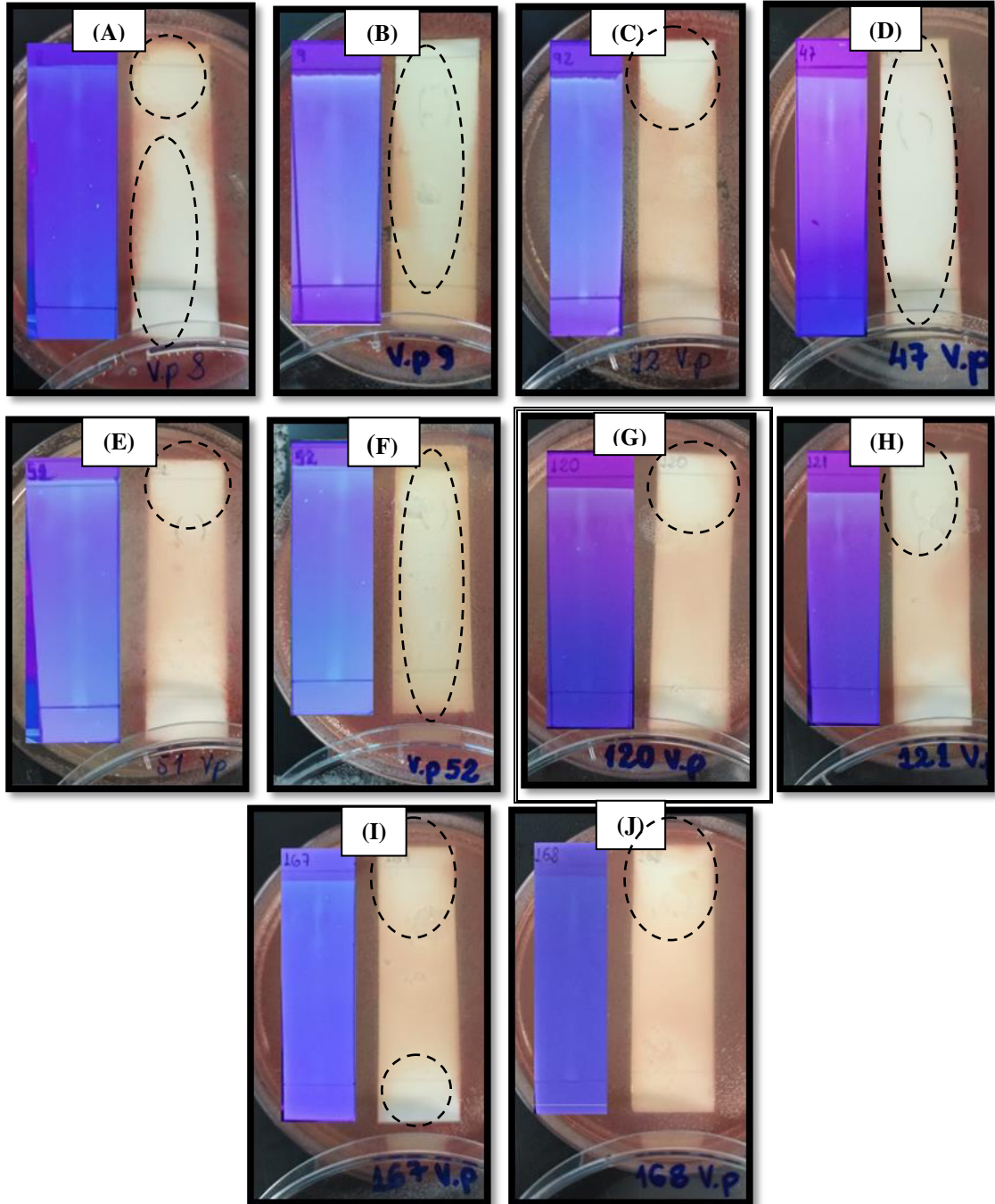
Figura 6 – Imagens dos resultados das CCD em luz UV realizadas com os extratos lipopeptídicos das bactérias e suas respectivas bioautografias frente *V. harveyi* ATCC 14126: **(A)** *Bacillus* sp. (12); **(B)** *Bacillus* sp. (13); **(C)** *Bacillus pumilus* (34); **(D)** *Bacillus pumilus* (38); **(E)** *Arthrobacter* sp (44); **(F)** *Bacillus* sp. (56); **(G)** *Bacillus* sp (87)



Fonte: autora.

Entretanto, nesse estudo, em apenas uma cepa houve uma divisão ou separação de zonas ativas contra as bactérias, podendo evidenciar a existência de mais de uma substância química que foi efetiva frente ao patógeno. Como o encontrado por Dimkic *et al.* (2017). Portanto, os extratos lipopeptídicos tiveram diferentes comportamentos quando a zonas de inibição.

Figura 7 – Imagens dos resultados das CCD na luz UV realizadas com os extratos lipopeptídicos das bactérias e suas respectivas bioautografias frente *V. parahaemolyticus* IOC 18950: (A) *Bacillus* sp. (8); (B) *Bacillus* sp. (9); (C) *Bacillus* sp. (47); (D) *Micrococcus aloeverae* (92); (E) *Bacillus* sp. (51); (F) *Bacillus* sp.(52); (G) *Vibrio olivae* (120); (H) *Vibrio* sp. (121); (I) *Vibrio* sp. (167) e (J) *Vibrio* sp. (168)



Fonte: autora.

Após a avaliação da atividade antibacteriana pela bioautografia, foram realizados os ensaios de estabilidade com exposição a temperatura e para confirmar a produção de um

composto protéico a exposição de enzima proteolítica para reunir informações sobre as substâncias e dados de referência para sua aplicação prática na indústria da aquicultura.

Os lipopeptídeos tem várias vantagens devido ao alto rendimento, estabilidade em pH e temperatura extremos (ALJOWAIE *et al.*, 2021). Nossos resultados mostraram as frações bioativas antibacterianas na maioria dos extratos lipopeptídicos foram desnaturadas pela exposição às temperaturas mais elevadas. Exceção foram os extratos das cepas 34, 38 e 120 que mantiveram seu efeito bactericida depois da exposição, conforme mostra Tabela 5.

Tabela 5 – Resultado do efeito da temperatura na produção de lipopeptídeos dos extratos lipopeptídicos frente ao *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950 selecionados utilizando a técnica de difusão em poços

Extratos lipopeptídicos	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126				<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IOC 18950			
	T 45°C		T 100°C		T 45°C		T 100°C	
	30min	60min	30min	60min	30min	60min	30min	60min
8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
34	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
38	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
51	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
120	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
186	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Fonte: autora.

Sendo esse resultado diferente do encontrado por Motta, Cladera-Oliveira e Brandelli (2004), onde a atividade antimicrobiana dos 19 filtrados selecionados foi resistente ao calor até 100°C por 15 min. Gao *et al.* (2017) em seus resultados indicaram que a substância anti-*Vibrio* existente no caldo livre de células de cepas probióticas de *Bacillus* era muito estável termicamente, havia 69,73% de atividade remanescente após ser tratada a 121 °C por 15 min, em comparação com o controle 20°C, 60 minutos.

Dentre as cepas que mantiveram sua bioatividade após a exposição a temperatura elevadas nesse estudo, a estirpe 120 de acordo com suas características (tabela 1) obteve resistência térmica a 4°C e 40°C, podendo isso ter relação com a resistência térmica das substâncias extraídas dessa cepa encontrada pós extração das substâncias.

Essas substâncias que apresentaram alta resistência térmica e baixo peso molecular são características de pequenos peptídeos hidrofóbicos que constituem as

bacteriocinas classe II (RILEY; WERTZ, 2002), isso pode indicar que essas cepas produziram substâncias que foram resistentes a temperaturas elevadas e podem ter as mesmas características dessa classe de substâncias.

Temitope *et al.* (2020) também testaram bactérias ácido lácticas contra espécies de *Vibrio* e as bacteriocinas produzidas por esses isolados foram estáveis a 60°C e 90°C por 20 minutos, mas não foram estáveis a 121°C por 15 minutos. A estabilidade térmica das bacteriocinas produzidas por esses isolados representa uma vantagem para uso potencial na indústria de aditivos para a aquicultura. Chalasani *et al.* (2015) purificaram um composto antibacteriano de *Bacillus* sp. que também foi estável em diferentes temperaturas, cerca de 80% de atividade foi mantida em 80°C por 1 h, 75% a 100°C por 30 min e 60% a 121°C por 20 min.

Nesse contexto, foi feita uma exposição de enzima proteolítica nas cepas para confirmação da sua capacidade de produzir compostos protéicos com atividade bioativa, confirmada no teste de difusão em poços, conforme Tabela 6.

Tabla 6– Resultado da atividade antibacteriana dos extratos lipopeptídicos pós exposição a proteínase K frente ao *Vibrio harveyi* ATCC 14126 e *Vibrio parahaemolyticus* IOC 18950 selecionados utilizando a técnica de difusão em poços

Extratos Lipopeptídicos	Atividade antimicrobiana pós tratamento com proteínase K	
	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 14126	<i>V. parahaemolyticus</i> IOC 18950
(8) <i>Bacillus</i> sp.	(+)	(-)
(9) <i>Bacillus</i> sp.	(+)	(-)
(34) <i>Bacillus pumilus</i>	(+)	(-)
(38) <i>Bacillus pumilus</i>	(+)	(-)
(51) <i>Bacillus</i> sp.	(+)	(-)
(120) <i>Vibrio olivae</i>	(+)	(-)
(186) <i>Vibrio</i> sp.	(+)	(-)

Fonte: autora.

Enzimas proteolíticas foram testadas em sobrenadante livre de células de 19 cepas isoladas da Bacia Amazônica. E as substâncias antimicrobianas foram parcialmente resistentes ao tratamento proteolítico, apenas duas cepas foram sensíveis tanto à tripsina quanto à pronase, sugerindo que uma porção proteica esteja envolvida na atividade. Isso pode indicar

que substâncias semelhantes a bacteriocinas estão implicadas na atividade antimicrobiana. (MOTTA; CLADERA-OLIVEIRA; BRANDELLI, 2004).

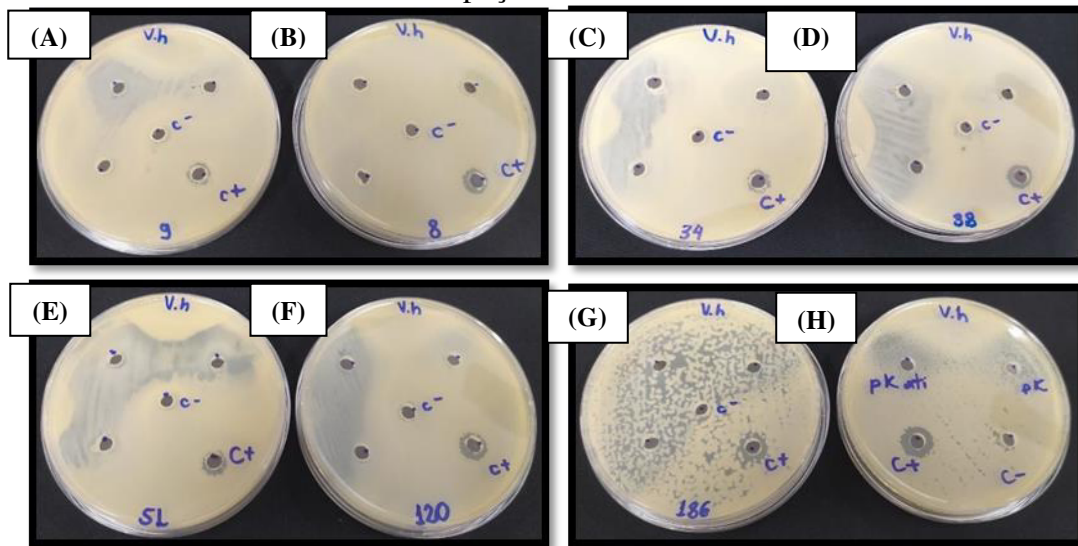
Em contraste, Moshafi *et al.* (2011) não registraram efeito de proteases sobre a atividade inibitória em caldo de cultura. Em nossa pesquisa, os extratos lipopeptídicos foram efetivos apenas contra uma das bactérias testadas (*V. harveyi*) após exposição a proteinase K, conforme mostra as figuras 8 e 9.

Temitope *et al.* (2020) testaram o sobrenadante livre de células de 12 cepas de bactérias ácido lácticas tratadas com enzimas proteolíticas (tripsina e pepsina) testadas pelo ensaio de difusão em poço de ágar contra o *Vibrio* spp. E a atividade antimicrobiana de todas as cepas foi completamente inativada pelo tratamento com tripsina e pepsina, confirmando que a inibição é resultado de um composto protéico. Esses sobrenadantes foram tratados com catalase e hidróxido de sódio (NaOH) e não teve efeito sobre a atividade inibitória, ou seja, a atividade antimicrobiana ainda foi mantida, indicando que o peróxido de hidrogênio e os ácidos orgânicos não foram responsáveis pela inibição observada.

Chalasanani *et al.* (2015) testaram a partir de um composto antimicrobiano purificado de *Bacillus* sp. a estabilidade contra enzimas proteolíticas, solventes orgânicos, surfactantes e sais metálicos. Esse composto antimicrobiano mostrou-se estável após tratamento com as enzimas proteolíticas tripsina (10 mg/mL) e proteinase K (5 mg/mL). A atividade antibacteriana foi mantida pelas amostras após o tratamento com tripsina e proteinase K. A atividade antimicrobiana não foi reduzida pelos solventes orgânicos (50% v/v) e pelos tensoativos na concentração final de 1%, indicando a natureza hidrofóbica do composto. A atividade biológica não foi afetada pela presença de sais metálicos.

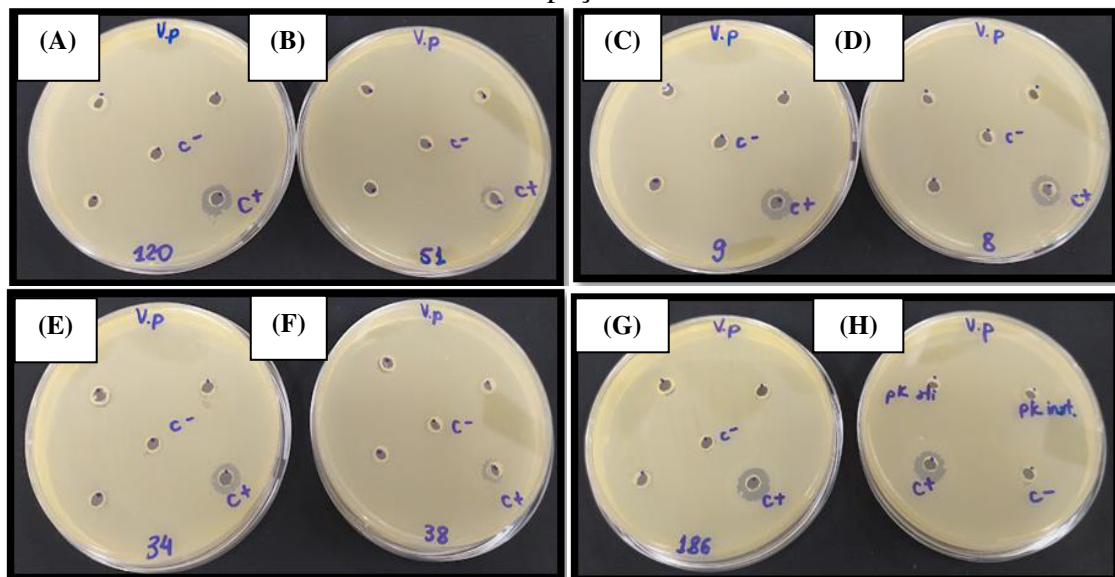
A figura 8 mostra a eficiência dos extratos após exposição a proteinase K, podendo indicar que as substâncias são de origem protéica, e foram eficientes para apenas uma espécie de bactéria patogênica. Já a figura 9 evidencia a não eficiência dos extratos frente a um dos patógenos testados. A substância anti-*Vibrio* existente no caldo livre de células de cepas probióticas de *Bacillus* teve um bom desempenho na resistência à digestão enzimática, uma vez que nenhuma das enzimas que foi testada (proteinase K, tripsina, quimotripsina, lisozima) causou o desaparecimento completo da atividade (GAO *et al.*, 2017).

Figura 8 – Resultado da exposição da enzima proteinase K nos extratos lipopeptídicos selecionados: (A) *Bacillus* sp. (12); (B) *Bacillus* sp. (13); (C) *Bacillus pumilus* (34); (D) *Bacillus pumilus* (38); (E) *Bacillus* sp. (51); (F) *Vibrio olivae* (120); (G) *Bacillus* sp. e (H) controles (+) e (-), frente o *Vibrio harveyi* ATCC 14126 utilizando a técnica de difusão em poços



Fonte: autora.

Figura 9 – Resultado da exposição da enzima proteinase K nos extratos lipopeptídicos selecionados: (A) *Bacillus* sp. (12); (B) *Bacillus* sp. (13); (C) *Bacillus pumilus* (34); (D) *Bacillus pumilus* (38); (E) *Bacillus* sp. (51); (F) *Vibrio olivae* (120); (G) *Bacillus* sp. e (H) controles (+) e (-), frente o *V. parahaemolyticus* IOC 18950 utilizando a técnica de difusão em poços



Fonte: autora.

Por outro lado, Prathiyiraj *et al.* (2021) em um estudo compararam a influência de uma dieta comercial e formulada de uma dieta lipopeptídica em vários aspectos da saúde do *Penaeus vannamei*. A dieta lipopeptídica obteve melhor desempenho de crescimento e taxa de crescimento específica do camarão, aumentando seu peso total. Essa alimentação lipopeptídica melhorou resistência a doença em camarão contra o patógeno *Vibrio*, também melhorou a imunidade e atividade de enzimas digestivas em camarões. O perfil do microbioma intestinal revelou a abundância de componentes bacterianos com interações ecológicas benéficas no camarão alimentado com dieta lipopeptídica, enquanto o grupo controle apresentou abundância de patógenos oportunistas. E os resultados concluíram que a dieta lipopeptídica influenciou positivamente o crescimento, imunidade e a saúde geral do camarão. Assim, a dieta suplementada com lipopeptídeos pode ser uma solução adequada para prevenir infecções prejudiciais por *Vibrio* e aumentar produção geral de camarão.

Isso posto, algumas das cepas selecionadas desse estudo podem ser consideradas potenciais biotecnologicamente para a indústria de aditivos na aquicultura, sendo necessário mais estudos incluindo caracterização química, purificação do(s) composto(s) antimicrobiano(s) ensaios ecotoxicológicos e produção dos compostos em larga escala.

CONCLUSÃO

A porção lipopeptídica da maioria das estirpes foi eficiente contra os patógenos de camarão quando testada utilizando a técnica de bioautografia. A estabilidade térmica e a resistência a ação da proteinase k são bons indicativos da robustez das substâncias e que devem ser submetidas a análises mais refinadas visando o uso na indústria da aquicultura, mais especificamente na maricultura, como alternativas no combate a patógenos bacterianos comuns em patologias de animais cultivados.

Os resultados deste estudo indicam o potencial dos microrganismos pertencentes a microbiota do trato intestinal de animais aquáticos como fonte de compostos antimicrobianos inéditos e com ampla aplicação tecnológica. No entanto, para um produto final aplicável e dentro dos níveis de biossegurança são necessários estudos mais aprofundados compreendendo prioritariamente o isolamento das substâncias ativas e sua caracterização.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-RHMAN, A.M.; KHATTAB, Y.A.; AND SHALABY, A.M.: *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 27, p.175-80, 2009. Doi: 10.1016/j.fsi.2009.03.020
- ABREU, J. O.: **Elaboração de consórcios probióticos bacterianos para uso em cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*)**. 2019, 90f. Dissertação (Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, 2019.
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A.; Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 35, p. 201-232, 2011. Doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
- AKBAR, A.; SITARA, U.; ALI, I.; MUHAMMAD, N.; KHAN, S. A.: Isolation and Characterization of Biotechnologically Potent *Micrococcus luteus* Strain From Environment **Pakistan Journal of Zoology**, [s.l.], v. 46, p. 967-973, 2014.
- ALJOWAIE, R. M.; GAWWAD, M. R. A.; FARRAJ, D. A. AL.; KINGSLEY, J.; RAJENDRAN, P.: In-vitro antimicrobial susceptibility pattern of lipopeptide against drug resistant *Vibrio* species. **Journal of Infection and Public Health**, [s.l.], v. 14, p. 1887-1892, 2021. Doi: 10.1016/j.jiph.2021.10.015
- BANERJEE, G.; RAY, A. K.: Review Article The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**, [s.l.], v. 115, p. 66-77, 2017. Doi: 10.1016/j.rvsc.2017.01.016
- BANAT, M. I.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.: MINI-REVIEW Potential commercial applications of microbial surfactants, **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 53, p. 495-508, 2000. Doi:10.1007/s002530051648
- BURKS, D. J.; NORRIS, S.; KAUFFMAN, K. M.; JOY, A.; AREVALO, P.; AZAD, R. K.; WILDSCHUTTE, H.: Environmental vibrios represent a source of antagonistic compounds that inhibit pathogenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains. **Microbiology Open**, [s.l.], v. 6, p. 1-11, 2017. Doi:10.1002/mbo3.504
- CAI, Y.; SUYANANDANA, P.; SAMAND, P.; BENNO, Y.: Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 45, p. 177-184, 1999. Doi: 10.2323/jgam.45.177
- CAULIER, S., NANNAN, C., GILLIS, A., LICCIARDI, F., BRAGARD, C., MAHILLON, J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 10, p. 1-19, 2019. Doi:10.3389/fmicb.2019.00302
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T.: New antibiotics from bacterial natural products, **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 24, p. 1541-1550, 2006. Doi: 10.1038/nbt1266

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Guideline. M100S, v. 26, 2016.

CHABRILLON, M.; RICO, R.M.; ARIJO, S.; DIAZ ROSALES, P.; BALEBONA, M.C.; MORINIGO, .M. A. : Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). **Journal of Fish Diseases**, [s.l.], v. 28, p. 531-537, 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00657.x

CHALASANI, A. G.; DHANARAJAN, G.; NEMA, S.; SEN, R.; ROY, U.: An Antimicrobial Metabolite from *Bacillus* sp.: Significant Activity Against Pathogenic Bacteria Including Multidrug-Resistant Clinical Strains. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v.6, p. 1-10, 2015. Doi:10.3389/fmicb.2015.01335

CHEN, Y.; LIU, S.A.; MOU, H.; MA, Y.; LI, M.; HU, X.: Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments, **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 1-11, 871, 2017. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00871

CHOEISOONGNERN, T.; SIVAMARUTHI, B. S.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; HAERTLÉ, T.; CHAIYASUT, C.: Screening and identification of bacteriocin-like inhibitory substances producing lactic acid bacteria from fermented products. **Food Science and Technology**, [s.l.], v. 40, p. 571-579, 2020. Doi: 10.1590/fst.13219

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E. H.: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 318-326, 1985. Doi: 10.1128/iai.37.1.318-326.1982

CHU, K. B.; AHMAD, I.; ZAHRAH, A.; IRENE, J.; NORAZILA, J.; NIK HAIHA, N.; FADZILAH, Y.; MOHAMMED, M.; ROKHAIWA, B.; OMAR, M.; TEOH, T. P.: Current status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of farmed shrimp in Malaysia. **Addressing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other transboundary diseases for improved aquatic animal health in Southeast Asia**, p. 55-59, 2016.

CORNEJO-GRANADOS, F.; LOPEZ-ZAVALA, A. A.; GALLARDO-BECERRA, L.; MENDOZA-VARGAS, A.; SÁNCHEZ, F.; VICHIDO, R.; BRIEBA, L. G.; VIANA, M. T.; SOTELO-MUNDO, R. R.; OCHOA-LEYVA, A.: Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, p. 1 - 5, 2017. Doi:10.1038/s41598-017-11805-w

COUTTEAU, P.: Functional feed additives to prevent disease in farmed shrimp. **Aquafeed Advances in Processing and Formulation**, [s.l.], v. 7, p. 24-27, 2016.

CORONEL-LEÓN, J.; DE GRAU, G.; GRAU-CAMPISTANY, A.; FARFAN, M.; RABANAL, F.; MANRESA, A.: Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. **Annals of Microbiology**, [s.l.], v. 65, p. 2065-2078, 2015. Doi: 10.1007/s13213-015-1045-x

DA SILVA, M. O.; AQUINO, S.: Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, [s.l.], v. 8, p. 472-482, 2018. Doi: 10.17058/reci.v8i4.11580

DANIEL, H.; GHOLAMI, A.M.; BERRY, D.; DESMARCHELIER, C.; HAHNE, H.; LOH, G.; MONDOT, S.; LEPAGE, P.; ROTHBALLER, M.; WALKER, A.; BOHM, C.; WENNING, M.; WAGNER, M.; BLAUT, M.; SCHMITT-KOPPLIN, KUSTER, B.; HALLER, D.; CLAVEL, T.: High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice, **The ISME Journal**, [s.l.], v. 8, p. 295-308, 2014. Doi:10.1038/ismej.2013.155

DAWOOD, M.A.O.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOHAMA, S.: Interaction effects of dietary supplementation of heat killed *Lactobacillus plantarum* and β -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 45, p. 33-42, 2015. Doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.033

DE SOUZA, J. T.; RAAIJMAKERS, J. M.: Polymorphisms within the prnD and pltC genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 43, p. 21-34, 2003. Doi: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01042.x

DERAVEL, J.; LEMIÈRE, S.; COUTTE, F.; KRIER, F.; VAN HESE, N.; BÈCHET, M.; SOURDEAU, N.; HOFTE, M.; LEPRÊTRE, A.; JACQUES, P.: Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 98, p. 6255-6264, 2014. Doi:10.1007/s00253-014-5663-1

DIMKIĆ, I.; STANKOVIĆ, S.; NIŠAVIĆ, M.; PETKOVIĆ, M.; RISTIVOJEVIĆ, P.; FIRA, D.; BERIĆ, T.: The Profile and Antimicrobial Activity of Bacillus Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, 925, 2017. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00925

DHALI, D.; COUTTE, F.; ARIAS, A.A.; AUGER, S.; BIDNENKO, V.; CHATAIGNE, G.; LALK, M.; NIEHREN, J.; DE SOUSA, J.; VERSARI, C.; JACQUES, P.: Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C 14 isoform. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 2, p. 1-23, 2017. Doi: 10.1002/biot.201600574

EGUIGUREN, M. A. G.; ROJAS, H.: Gestión sanitaria y resistencia a los antimicrobianos em animales de producción. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, [s.l.], v. 35, p. 118-25, 2018. Doi: 10.17843/rpmesp.2018.351.3571

EL-KHOLY, A.; EL-SHINAWY, S.; MESHREF, A.; KORNAY, A.: Screening of antagonistic activity of probiotic bacteria against some food-borne pathogens. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, [s.l.], v. 2, p. 53-60, 2014. Doi: 10.12691/jaem-2-2-4

FEIJÓ, R. G. **Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus vnamei* (Boone, 1931) sob condições de cultivo**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

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

FLEGEL, T. W.: Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 110, p. 166-173, 2012. Doi:10.1016/j.jip.2012.03.004

GAO, X.-Y.; LIU, Y., MIAO, L.-L.; Li, E.-W., HOU, T.-T.; LIU, Z.-P.: Mechanism of anti-Vibrio activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. **AMB Express**, [s.l.], v. 7, p. 1-10, 2017. Doi:10.1186/s13568-017-0323-3

GASTALHO. S.; SILVA. G. J.; RAMOS. F.: Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance:Health care impact - **Acta Farmacêutica Portuguesa**, [s.l.], v. 3, p. 29-45, 2014.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; MULLER, J.; FIEDLER, H.P.; KALLENBORN, H.G.; HOLZENKAMPFER, M.; KRASTEL, P.; ZEECK, A.; VATER, J.; HOLTZEL, A.; SCHIMID, D.G.; RHEINHEIMER, J.; DETTNER, K.: Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 217, p. 199-205, 2002. Doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11475.x

GUIMARÃES, D.; MONESSO, L.; PUPO, M.; Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, p. 667-679, 2010. Doi: 10.1590/S0100-40422010000300035

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**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 125, 2013.

HAMLEY, I. W.: Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 51, p. 8574-8583, 2015. Doi:10.1039/c5cc01535a

HULME, J. Recent advances in the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **BioChip Journal**, [s.l.], v.11, p. 89-100, 2017. Doi: 10.1007/s13206-016-1201-9

IMADA, C.; KOSEKI, N.; KAMATA, M.; KOBAYASHI, T.; HAMADA-SATO, N.: Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. **Actinomycetologica**, [s.l.], v. 21, p. 27-31, 2007. Doi:10.3209/saj.SAJ210104

INOUE. H.; MINGHUI. R.: Antimicrobial resistance translating political commitment into national action. **Bull World Health**, [s.l.], v.95, p. 242, 2017. Doi: 10.2471/BLT.17.191890

KIM, P.I.; RYU, J.; KIM, Y.H.; CHI, Y.T.; Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 20, p. 138-145, 2010. Doi: 10.4014/jmb.0905.05007

KNIPE, H.; TEMPERTON, B.; LANGE, A.; BASS, D.; TYLER, C. R.: Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [s.l.], v. 13, p. 324-352, 2021. Doi: 10.1111/raq.12477

LEE, S.C.; YOO, J.S.; KIM, S.H.; CHOI, Y.L.: Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* A8-8. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 16, p. 716-723, 2006.

LINDOSO, A. L. P. **Eficácia do probiótico comercial no cultivo do camarão-branco-dopacífico (*Litopenaeus vannamei*) em sistema intensivo**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

LI, J.; TAN, B.; MAI, K.; AI, Q.; ZHANG, W.; XU, W.; LIUFU, Z.; MA, H.: Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. **Aquaculture**, [s.l.], v. 253, p. 140-147, 2006.

LI, J.Q.; TAN, B.P.; MAI, K.S.; AI, Q.H., ZHANG, W.B.; LIUFU, Z.G.; XU, W.: Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, [s.l.], v. 39, p. 477- 489, 2008. Doi: 10.1111/j.1749-7345.2008.00188.x

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**, [s.l.], v. 116, n. 3, p. 381-388, 1993.

MĂRGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; BOBIS, O.: Important Developments in Romanian Propolis Research. [s.l.], v. 1, p. 1-9, 2013. Doi:10.1155/2013/159392

MANNANOV, L.; SATTAROVA, R. K.: Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria, **Chemistry of Natural Compounds**, [s.l.], v. 37, p. 117-123, 2001. Doi:10.1023/A:1012314516354

MARTIRANI, L.; VARCAMONTI, M.; NACLERIO, G.; DE FELICE, M.: Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 91, p. 1-5, 2002. Doi: 10.1186/1475-2859-1-1

MEENA, K.R.; SHARMA, A.; KANWAR, S. S.: Lipopeptides: A distinct class of antibiotics with diverse applications. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, [s.l.], v. 7, p. 1-7, 2017. Doi: 10.19080/AIBM.2017.07.555706

MEENA, K.R.; KANWAR, S.S.: Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics, **BioMed Research International**, [s.l.], v. 1, p. 1-9, 2015. Doi:10.1155/2015/473050

MOSS, S. M.; MOSS, D R.; ARCE, S. M.; LIGHTNER, D. V.; LOTZ, J. M.: The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture.

Journal of Invertebrate Pathology, [s.l.], v. 110, n. 2, p. 247-250, 2012. Doi: 10.1016/j.jip.2012.01.013

MOTTA, A.; CLADERA-OLIVEIRA, F.; BRANDELLI, A.: Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin, **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 35, p. 307-310, 2004. Doi:10.1590/s1517-83822004000300007

MOSHAFI, M. H.; FOROOTANFAR, H.; AMERI, A.; SHAKIBAIE, M.; DEHGHAN-NOUDEH, G.; RAZAVI, M.: Antimicrobial activity of bacillus sp. strain FAS1 isolated soil. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 24, p. 269-275, 2011.

MULLIGAN, C.N.: Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 133, p. 183-198, 2005. Doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009

MUTHUKRISHNAN, S., DEFOIRDT, T.; INA-SALWANY, M. Y.; YUSOFF, F. M., SHARIFF, M.; ISMAIL, S. I.; NATRAH, I.: *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. **Aquaculture**, [s.l.], v. 511, p. 1873-5622, 2019. Doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734227

NG, W.K.; KOH, C.B.: The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, [s.l.], v. 9, p. 342-368, 2016. Doi: 10.1111/raq.12141.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F.: Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s.l.], v. 18, p. 267-276, 2015. doi:10.1590/1981-6723.2215

PATEL, H.; HUYNH, Q.; BARLEHNER, D.; HEERKLOTZ, H.: Additive and synergistic membrane permeabilization by antimicrobial (lipo)peptides and detergents. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 106, p. 2115-2125, 2014. Doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.006

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.: Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 13, p. 21-24, 2003. Doi:10.1590/s0102-695x2003000300009

PETERSON, S.B., BERTOLLI, S.K., MOUGOUS, J.D.: The central role of interbacterial antagonism in bacterial life. **Current Biology**, [s.l.], v. 30, n. 19, p. 1203-1214, 2020. Doi: 10.1016/j.cub.2020.06.103

PHAM, D.; ANSQUER, D.; CHEVALIER, A.; DAUGA, C.; PEYRAMALE, A.; WABETE, N.; LABREUCHE, Y.: Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. **Aquaculture**, [s.l.], v. 432, p. 475-482, 2014. Doi:10.1016/j.aquaculture.2014.04.031

PRATHIVIRAJ, R.; RAJEEY, R.; FERNANDES, H.; RATHNA, K.; LIPTON, A. N.; SELVIN, J.; KIRAN, G. S.: A gelatinized lipopeptide diet effectively modulates immune response, disease resistance and gut microbiome in *Penaeus vannamei* challenged with

Vibrio parahaemolyticus. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 112, p. 92-107, 2021. Doi: 10.1016/j.fsi.2021.02.018

RANZANI-PAIVA, M.; TAKEMOTO, R.; LIZAMA, M.; PERAZZOLO, L.; ROSA, R.: Biotecnologia e sanidade de organismos aquáticos, Editora: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos, **Editora Abrapoa**, [s.l.], v. 1 p. 1-114, 2019.

REBOUÇAS, R. H.: **Colonização de tecidos e líquido corpóreo do camarão *Litopenaeus vannamei* por *Vibrio parahaemolyticus* autóctone do ambiente de cultivo**. 2017. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RESTREPO, L.; DOMINGUEZ-BORBOR, C.; BAJAÑA, L.; BETANCOURT, I.; RODRÍGUEZ, J.; BAYOT, B.; REYES, A.: Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolicus*). **Microbiome**, [s.l.], v. 9, p. 1-20, 2021. Doi:10.1186/s40168-021-01043-8

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E.: Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Review of Microbiology**, [s.l.], v. 56, p. 117-137, 2002. Doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024

ROCHA, N. C.; MANAIA, C. M.: Multidrug resistance phenotypes are wide spread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 563-564, p. 1-9, 2016. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.062

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**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 6-16, 2018.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. M.; HOFER, E.: Evaluayion of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, [s.l.], n. 4, p. 589-592, 1993. Doi: 10.1590/S0074-02761993000400016

RONGSAYAMANONT, W.; SOONGLERDSONGPHA, S.; KHONDEE, N.; PINYAKONG, O.; TONGCUMPOU, C.; SABATINI, D. A.; LUEPROMCHAI, E.: Formulation of crude oil spill dispersants based on the HLD concept and using a lipopeptide biosurfactant, **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 334, p. 168-177, 2017. Doi:10.1016/j.jhazmat.2017.04.005

RUST, L.; MESSING, C. R.; IGLEWSKI, B. H.: Elastase assays. **Methods in Enzymology**, [s.l.], v. 235, p. 554-562, 1994.

SANCHES, B.; GUERREIRO, R.; DIOGO, J.; CABRAL, M.; GOMES, A.: A era da multirresistência: incidência em dez anos numa unidade de cuidados intensivos neonatais. **Acta Medica Portuguesa**, [s.l.], v. 33, n. 3, 2020. Doi:10.20344/amp.12504

SORIEUL, L.; WABETE, N.; ANSQUER, D.; MAILLIEZ, J-R.; PALLUD, M.; ZHANG, C.; LINDVALT, M.; BOULO, V.; PHAM, D.: Survival improvement conferred by the *Pseudoalteromonas* sp. NC201 probiotic in *Litopenaeus stylirostris* exposed to *Vibrio nigripulchritudo* infection and salinity stress. **Aquaculture**, [s.l.], v. 495, p. 888-898, 2018.

Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.058

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R.: Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities, **Environment International**, [s.l.], v. 34, p. 1215-1226, 2008. Doi:10.1016/j.envint.2008.04.009

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**, [s.l.], v. 23, p. 15-22, 1957.

SIZEMORE, R. K.; STEVENSON, L. H.: Method for the isolation of proteolytic marine bacteria. **Applied Microbiology**, [s.l.], v. 20, p. 991, 1970.

SUGITA, H., HIROSE, Y., MATSUO, N. AND DEGUCHI, Y.: Production of the antibacterial substance by bacillus species strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**, [s.l.], v. 165, p. 269-80, 1998.

SILVEIRA, A. C. O. **Análise da atividade antibacteriana e toxicidade de *Drimys brasiliensis***. 2011. 66f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011.

SRINIVASAN, P.; RAMASAMY, P.; Morphological characterization and biocontrol effects of *Vibrio vulnificus* phages against Vibriosis in the shrimp aquaculture environment. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 111, p. 472-480, 2017. Doi:10.1016/j.micpath.2017.09.024

SRINIVASAN, P.; RAMASAMY, P.: Occurrence, distribution and antibiotic resistance patterns of *Vibrio* species associated with viral diseased shrimp of south Indian aquaculture environment, **International Journal of Agriculture Sciences**, [s.l.], v. 1, p. 1-10, 2009. Doi:10.9735/0975-3710.1.2.1-10

STEIN, T.: *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 56, p. 845-857, 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x

STIEGLMEIR, M.; WIRTH, R.; KMINEK, G.; MOISSL-EICHINGER, C.: Cultivation of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria from spacecraft-associated clean rooms. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 11, p. 3484-3491, 2009. Doi: 10.1128/AEM.02565-08

TRAN, L.; NUNAN, L.; REDMAN, R.; MOHNEY, L.; PANTOJA, C.; FITZSIMMONS, K.; LIGHTNER, D.: Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 105, p. 45-55, 2013. Doi:10.3354/dao02621

TRAVERS, R. S.; MARTIN, P. A. W.; REICHELDERFER, C. F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 53, n.6, p. 1263-1266, 1987.

THITAMADEE, S.; PRACHUMWAT, A.; SRISALA, J.; JAROENLAK, P.; SALACHAN,

- P. V.; STRITUNYALUCKSANA, K.; ITSATHITPHAISAM, O.: Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, [s.l.], v. 452, p. 69-87, 2016. Doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.028
- TEMIPOPE, O. S. T.; RASHIDAT, O. R.; OLADELE, A. C.; CHIGOZIE, O.: Bio-control of *Vibrio* species in cultured milk by in situ bacteriocin production from lactic acid bacteria, **World Journal of Advanced Research and Reviews**, [s.l.], v. 06, p. 50-58, 2020. Doi: 10.30574/wjarr.2020.6.3.0073
- VARGAS-ALBORES, F.; PORCHAS-CORNEJO, M. A.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; VILLALPANDO-CANCHOLA, E.; GOLLAS-GALVÁN, T.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.: Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. **Helgoland Marine Research**, [s.l.], v. 71, p. 1-10, 2017. Doi:10.1186/s10152-017-0485-z
- VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, A. S.; MENEZES, F. G.R.; COSTA, R. A.; SOUSA, O. V.; BARRETO, N. S.: VIBRIOSES EM CAMARÃO CULTIVADO: vibrioses on farmed shrimps. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 42, p. 112-120, 2009. Disponível em: <http://www.periodicos.ufc.br/arquivosdecienciadomar/article/view/6051>. Acesso em: 01/02/2022.
- 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**, [s.l.], v. 54, p. 563, 1947. Doi: 10.1128/jb.54.5.563-568.1947
- WRIGHT, G. D.: Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 34, p. 694-701, 2017. Doi:10.1039/c7np00019g
- WU, Q.; ZHI, Y.; XU, Y.: Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. **Metabolic Engineering**, [s.l.], v. 52, p. 87-97, 2019. Doi:10.1016/j.ymben.2018.11.004
- YANG, S.C.; LIN, C.H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], p. 5, v.1-10, 2014.
- YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y.: Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 55, p. 27-55, 2003.
- YU, Y-B.; CHOI, J-H.; KANG, J-C.; KIM, H. J.; KIM, J-H.: Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: A review, **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 166, p. 1-23, 2022.
- ZHANG, X. J.; YAN, B-L.; BAI, X-S.; BI, K-R.; GAO, H.; QIN, G-M.: Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* Associated with Mass Mortality of Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Journal of Shellfish Research**, [s.l.], v. 33, p. 61-68, 2014. Doi:10.2983/035.033.0108.
- ZHANG, X-H; HE, X.; AUSTIN, B.: *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. **Marine Life Science & Technology**, [s.l.], v. 2, p. 231-245, 2020. Doi:10.1007/s42995-020-00037-z

ZHOU, J.; FANG, W.; YANG, X.; ZHOU, S.; HU, L.; LI, X.; QI, X.; SU, H.; XIE, L.; A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with 'bacterial white tail disease' of *Litopenaeus vannamei* shrimp. **PLoS One**, [s.l.], v. 7, p. 19-22, 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0029961

ZOKAEIFAR, H.; BALCAZAR, J.; KAMARUDIN, M.; SIJAM, K.; ARSHAD, A.; SAAD, C.; Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. **The Journal of Antibiotics**, [s.l.], v. 65, n. 6, p. 289, 2012. Doi:10.1038/ja.2012.17

ANEXO A – Local de origem das cepas estudadas.

Código da cepa	Identificação	Espécie de Crustáceos que foram utilizados para a coleta das cepas	Local de origem
8	<i>Bacillus</i> sp.	Caranguejo nativo	Rio Pacoti (Fortaleza-CE e Eusébio-CE)
9	<i>Bacillus</i> sp.	Caranguejo nativo	Rio Pacoti (Fortaleza-CE e Eusébio-CE)
12	<i>Bacillus</i> sp.	Caranguejo nativo	Rio Pacoti (Fortaleza-CE e Eusébio-CE)
13	<i>Bacillus</i> sp.	Caranguejo nativo	Rio Pacoti (Fortaleza-CE e Eusébio-CE)
25	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
27	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
44	<i>Arthrobacter</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
47	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
48	<i>Arthrobacter</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
51	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
52	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
56	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
91	<i>Staphylococcus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
92	<i>Micrococcus aloeverae</i>	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
133	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
34	<i>Bacillus pumilus</i>	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
38	<i>Bacillus pumilus</i>	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
87	<i>Bacillus</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
117	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
120	<i>Vibrio olivae</i>	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
121	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
167	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
168	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
171	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
186	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC
191	<i>Vibrio</i> sp.	Camarão - <i>Penaeus vannamei</i>	Florianópolis- SC