



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

ANA VLÁDILA DA SILVA OLIVEIRA

**MICROBIOTA BACTERIANA EM LAGOSTAS ESPINHOSAS DE OCORRÊNCIA
NO LITORAL CEARENSE**

FORTALEZA

2023

ANA VLÁDILA DA SILVA OLIVEIRA

MICROBIOTA BACTERIANA EM LAGOSTAS ESPINHOSAS DE OCORRÊNCIA NO
LITORAL CEARENSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Tecnologia e Microbiologia do Pescado.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes.

Coorientadora: Dra. Juliana de Carvalho Gaeta.

FORTALEZA

2023

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)

- O45m Oliveira, Ana Vládila da Silva.
Microbiota bacteriana em lagostas espinhosasa de ocorrência no litoral cearense / Ana Vládila da Silva Oliveira. – 2023.
101 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes..
Coorientação: Profa. Dra. Juliana de Carvalho Gaeta..
1. Microbioma intestinal. 2. Identificação bacteriana. 3. Crustáceos. 4. Atividade enzimática. 5. Hemolinfa. I. Título.

CDD 639.2

ANA VLÁDILA DA SILVA OLIVEIRA

MICROBIOTA BACTERIANA EM LAGOSTAS ESPINHOSAS DE OCORRÊNCIA NO
LITORAL CEARENSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Tecnologia e Microbiologia do Pescado.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ELE nada seria possível.

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

A minha orientadora, Francisca Gleire Rodrigues de Menezes por todos os ensinamentos, considerações, conselhos, dedicação, paciência e principalmente por acreditar no meu potencial.

A minha coorientadora, Juliana de Carvalho Gaeta, por todo apoio, dedicação, ensinamentos, conselhos e acolhimento.

A banca examinadora, Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho, Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa, Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva, Prof. Dra. Bartolomeu Warlene Silva de Souza e Prof. Dr. Esaú Aguiar de Carvalho por terem enobrecido o presente trabalho com suas recomendações e considerações.

Aos meus pais Erivanda da Silva Oliveira e José Valmir de Oliveira Filho (*in memoriam*), por toda educação recebida, pelo apoio, admiração e acima de tudo por todo amor dedicado a mim.

A minha única irmã, Diana Mary da Silva Oliveira Albuquerque Gadelha, por todo apoio, admiração e incentivo.

Aos meus amigos do laboratório, Alexandra, Raquel, Tereza, Robério, Jhones, Daniel, Anna, Sara, Rebeca e Mariana por toda ajuda, companheirismo e pelos dias mais leves e divertidos.

A todos os componentes do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP). Aprendi muito com cada um de vocês.

E a todos que de alguma forma torceram e ajudaram para a concretização dessa etapa da minha vida.

“Deus nunca disse que a jornada seria fácil,
mas Ele disse que a chegada valeria à pena”.
(Max Lucado).

RESUMO

No Brasil, a captura comercial de lagostas iniciou na década 1950 e, atualmente, esse setor da pesca marinha ainda apresenta relevância socioeconômica, principalmente em cidades costeiras. Esse crustáceo tem um mercado externo alcançando valores significativos o que explica seu papel na balança comercial brasileira. A literatura a respeito das populações de lagostas espinhosas brasileiras costuma se concentrar apenas em parâmetros ligados à captura e ao ciclo de vida, porém, aspectos relevantes da biologia das lagostas, como as enfermidades a que estão expostas e sua microbiota têm sido menos estudados. Não há informações sobre o microbioma natural das lagostas de ocorrência na costa brasileira e a diminuição dos estoques de lagostas sempre esteve associada à sobre-exploração desse recurso. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi quantificar, avaliar, identificar e caracterizar a microbiota bacteriana (do intestino, do hepatopâncreas e da hemolinfa) de lagostas espinhosas exploradas pela indústria pesqueira cearense, a fim de verificar a ocorrência de variações na microbiota bacteriana nos diferentes estratos anatômicos das lagostas e entre duas espécies desse crustáceo. Para o desenvolvimento do presente estudo, foram realizadas coletas na comunidade da praia de Redonda, situada no município de Icapuí - Fortaleza/CE. Foram coletados vinte indivíduos, dez deles pertencentes à espécie *Panulirus argus* e o restante a espécie *Panulirus laevicauda*. Os animais foram sacrificados e dissecados para acesso a microbiota por meio de técnicas de cultivo bacteriano convencionais. Os isolados bacterianos foram submetidos a testes de caracterização morfológica, bioquímica e enzimática e posterior identificação por técnicas de biologia molecular. Os resultados demonstraram diferença quantitativa nos grupos bacterianos cultiváveis da microbiota das lagostas havendo abundância com números maiores registrados nas lagostas verdes. A hemolinfa estava entre os estratos com menor abundância de bactérias. Ao comparar a contagem total de microrganismos nas lagostas estudadas constatou-se não haver diferença significativa na abundância de *Vibrio*, mostrando que esse gênero possuía abundância relativa semelhante em lagostas vermelhas e verdes. Do total de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs), 96,5% eram bastonetes, Gram negativos. Ao investigar a produção de biofilme nas BHCs, foi perceptível a dominância de microrganismos com capacidade de produzir exopolissacarídeos (81%). Apesar da microbiota das duas espécies de lagosta demonstrarem capacidade de hidrolisar proteases, observou-se que a microbiota das lagostas *P. laevicauda* possui uma maior prevalência de bactérias produtoras de caseinase em relação à *P. argus*. O gênero *Vibrio* foi onipresente nas duas espécies. Quinze amostras foram identificadas

genotipicamente a nível de gênero, evidenciando a presença dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio*. A microbiota bacteriana cultivável das lagostas espinhosas de ocorrência no litoral cearense, *Panulirus argus* (lagosta vermelha) e *Panulirus laevicauda* (lagosta verde), podem divergir em abundância e diversidade. Os gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Bacillus* demonstram potencial biotecnológico para uso probiótico ao expressarem uma diversidade de atividades de enzimas digestivas e produção de exopolissacarídeos. Essa pesquisa apresenta pela primeira vez resultados a respeito do microbioma de diferentes estratos das espécies *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*, duas espécies de lagostas de extrema importância ecológica e econômica para o litoral cearense.

Palavras-chave: microbioma intestinal; identificação bacteriana; crustáceos; atividade enzimática; hemolinfa.

ABSTRACT

In Brazil, the commercial capture of lobsters began in the 1950s and, currently, this marine fishing sector still has socioeconomic relevance, especially in coastal cities. This crustacean has an external market reaching significant values, which explains its role in the Brazilian trade balance. The literature regarding Brazilian spiny lobster populations tends to focus only on parameters linked to capture and life cycle, however, relevant aspects of lobster biology, such as the diseases to which they are exposed and their microbiota, have been less studied. There is no information about the natural microbiome of lobsters found on the Brazilian coast and the decline in lobster stocks has always been associated with the overexploitation of this resource. Therefore, the objective of this research was to quantify, evaluate, identify and characterize the bacterial microbiota (in the intestine, hepatopancreas and hemolymph) of spiny lobsters exploited by the Ceará fishing industry, in order to verify the occurrence of variations in the bacterial microbiota in the different anatomical strata of lobsters and between two species of this crustacean. For the development of the present study, collections were carried out in the community of Redonda beach, located in the municipality of Icapuí - Fortaleza/CE. Twenty individuals were collected, ten of them belonging to the species *Panulirus argus* and the rest belonging to the species *Panulirus laevicauda*. The animals were sacrificed and dissected to access the microbiota using conventional bacterial cultivation techniques. The bacterial isolates were subjected to morphological, biochemical and enzymatic characterization tests and subsequent identification using molecular biology techniques. The results demonstrated a quantitative difference in the cultivable bacterial groups of the lobster microbiota, with higher numbers recorded in green lobsters. The hemolymph was among the strata with the lowest abundance of bacteria. When comparing the total count of microorganisms in the lobsters studied, it was found that there was no significant difference in the abundance of *Vibrio*, showing that this genus had similar relative abundance in red and green lobsters. Of the total Cultivable Heterotrophic Bacteria (BHCs), 96.5% were Gram negative rods. When investigating biofilm production in BHCs, the hegemony of microorganisms with the capacity to produce exopolysaccharides (81%) was noticeable. Although the microbiota of both lobster species demonstrate the ability to hydrolyze proteases, it was observed that the microbiota of *P. laevicauda* lobsters has a higher prevalence of caseinase-producing bacteria in relation to *P. argus*. The genus *Vibrio* was ubiquitous in both species. Fifteen samples were genotypically identified at the genus level, showing the presence of the genera *Bacillus*, *Enterobacter*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*,

Shewanella and *Vibrio*. The cultivable bacterial microbiota of spiny lobsters found on the coast of Ceará, *Panulirus argus* (red lobster) and *Panulirus laevicauda* (green lobster), may differ in abundance and diversity. The genera *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Bacillus* demonstrate biotechnological potential for probiotic use by expressing a diversity of digestive enzyme activities and exopolysaccharide production. This research presents for the first time results regarding the microbiome of different strata of the species *Panulirus argus* and *Panulirus laevicauda*, two species of lobsters of extreme ecological and economic importance for the coast of Ceará.

Keywords: intestinal microbiome; bacterial identification; crustaceans; enzymatic activity; hemolymph.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação de um indivíduo da espécie <i>Panulirus argus</i> , ocorrência e sua distribuição geográfica	23
Figura 2	- Representação de um indivíduo da espécie <i>Panulirus aevicauda</i> , ocorrência e sua distribuição geográfica	24
Figura 3	- Fluxograma referente ao procedimento de seleção dos artigos encontrados.	31
Figura 4	- Produção média anual de lagostas e lagostins a partir de dados da FAO e publicações científicas relacionadas à microbiota desses organismos aquáticos	34
Figura 5	- Número de artigos científicos abordando o microbioma por espécie de lagosta e lagostim (A) e percentual de estudos por sítios anatômicos de lagostas (B)	35
Figura 6	- Diversidade de gêneros microbianos encontrados no intestino de lagostas.	35
Figura 7	- Diversidade de gêneros microbianos encontrados na hemolinfa da lagosta e no hepatopâncreas	36
Figura 8	- Localização de Redonda, comunidade pesqueira onde foi realizado o estudo	41
Figura 9	- Procedimento de extração da hemolinfa de uma lagosta <i>Panulirus laevicauda</i>	42
Figura 10	- Dissecção de lagosta <i>P. argus</i> , com observação do intestino na região abdominal	42
Figura 11	- Fluxograma de análise microbiológica, utilizando a técnica <i>Pour Plate</i> , para quantificação de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC)	44
Figura 12	- Fluxograma de análise microbiológica, utilizando a técnica <i>Spread Plate</i> , para quantificação de Vibrios	44
Figura 13	- Teste oxidativo-fermentativo da glicose (OF). (A) bactéria com metabolismo fermentativo; (B) bactéria com metabolismo oxidativo; (C) bactéria não sacarolítica	46
Figura 14	- Placa de poliestireno de 96 poços ilustrando cepa positiva (+) e negativas	47

	(-) para produção de exopolissacarídeo	
Figura 15	- Verificação da positividade do teste de caseinase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano.....	48
Figura 16	- Verificação da positividade do teste de gelatinase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano	49
Figura 17	- Verificação da positividade do teste de elastase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano	49
Figura 18	- Verificação da positividade do teste de lipase representado pela formação de halo opalescente ao redor do inóculo bacteriano	50
Figura 19	- Verificação da positividade do teste de fosfolipase representado pela formação de halo opalescente ao redor do inóculo bacteriano	50
Figura 20	- Verificação da positividade do teste de amilase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano	51
Figura 21	- Verificação da positividade do teste de celulase representado pela formação de halo alaranjado ao redor do inóculo bacteriano.....	52
Figura 22	- Imagem de foto documentação de extrações de DNA total de amostras de bactérias heterotróficas cultiváveis e víbrios analisadas	53
Figura 23	- Box Plot comparando a distribuição da abundância de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis em lagosta <i>P. argus</i> (P.A) e <i>P. laevicauda</i> (P.L) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers)	57
Figura 24	- Box Plot comparando a distribuição da abundância de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nos diferentes estratos de <i>P. argus</i> (A) e <i>P. laevicauda</i> (B) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers)	59
Figura 25	- Box Plot comparando a distribuição da abundância de bactérias de gênero <i>Vibrio</i> em lagosta <i>P. argus</i> (P.A) e <i>P. laevicauda</i> (P.L) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers)	61
Figura 26	- Box Plot comparando a distribuição da abundância de bactérias do gênero <i>Vibrio</i> nos diferentes estratos de <i>P. argus</i> (A) e <i>P. laevicauda</i> (B) por	62

meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers) ..

Figura 27 - Figura 27 - Box Plot comparando a distribuição da abundância de bactérias do gênero *Vibrio de* acordo com a utilização ou não de sacarose (Sac+) ou (Sac-) de *P. argus* (A) e *P. laevicauda* (B) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers)..... 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Doenças em lagostas causadas ou associadas com espécies de <i>Vibrio</i>	28
Quadro 2 - Divisão dos tratamentos para realização das análises microbiológicas	43
Quadro 3 - Interpretação do Teste de Oxidação-Fermentação da glicose	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Relação dos artigos científicos selecionados e analisados neste estudo segundo critérios previamente estabelecidos.....	32
Tabela 2	- Tamanhos mínimos de captura de abdômen e cefalotórax das espécies <i>Panulirus argus</i> e <i>Panulirus laevicauda</i> , de acordo com o Art. 7º da Portaria nº 221, de 8 de junho de 2021, da Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	55
Tabela 3	- Medidas de peso e comprimento (cefalotórax e abdômen) das espécies e lagostas analisada	56
Tabela 4	- Contagem de UFC de bactérias heterotróficas cultiváveis em lagostas <i>Panulirus argus</i> e <i>Panulirus laevicauda</i> nos diferentes estratos	57
Tabela 5	- Contagem Padrão em Placas (CPP) de cepas cultivadas em meio TCBS, de lagostas <i>Panulirus argus</i> e <i>Panulirus laevicauda</i> nos diferentes estratos	61
Tabela 6	- Perfil da morfologia da parede celular (Gram) de Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) de lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> em diferentes estratos anatômicos	65
Tabela 7	- Perfil bioquímico a partir do teste da presença da enzima citocromo-oxidase e teste para análise do viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) em Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) em lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> , em diferentes estratos anatômicos	67
Tabela 8	- Perfil da produção de exopolissacarídeo em Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) de lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> em diferentes estratos anatômicos.....	69
Tabela 9	- Testes bioquímicos: confirmação de presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) do gênero <i>Vibrio</i> nas lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> , em diferentes estratos anatômicos	71
Tabela 10	- Perfil da produção de exopolissacarídeo em Bactéria do gênero <i>Vibrio</i> de lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> em diferentes estratos anatômicos	72
Tabela 11	- Perfil enzimático em Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) de	74

lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.....

Tabela 12 - Perfil enzimático em Bactéria do gênero <i>Vibrio</i> de lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> em diferentes estratos anatômicos	77
Tabela 13 - Identificação, perfil enzimático e capacidade de produção de exopolissacarídeos das bactérias extraídas de lagostas <i>P. argus</i> e <i>P. laevicauda</i> em diferentes estratos anatômicos	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	Atividade pesqueira no Brasil	21
2.2	Exploração de lagosta no Brasil	21
2.3	Espécies investigadas	23
2.3.1	<i>Panulirus argus</i> (Latreille, 1804)	23
2.3.2	<i>Panulirus laevicauda</i> (Latreille, 1817)	24
2.4	Importância do estudo da microbiota em lagostas	24
3	DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS NOS SISTEMAS DIGESTIVO E CIRCULATÓRIO DE LAGOSTAS E LAGOSTINS: CONEXÕES IMPORTANTES PARA UMA AQUICULTURA EFICIENTE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA	30
4	HIPÓTESE	40
5	OBJETIVOS	40
5.1	Objetivos específicos	40
6	MATERIAL E MÉTODOS	41
6.1	Procedimentos realizados em campo	41
6.2	Procedimentos em laboratório	42
6.2.1	Contagem Padrão em Placas (CPP) – bactérias heterotróficas cultiváveis ...	44
6.2.2	Contagem Padrão em Placas (CPP) – bactérias do gênero <i>Vibrio</i>	45
6.2.3	Seleção e isolamento das colônias	45
6.2.4	Técnica de coloração em Gram	45
6.2.5	Teste bioquímico: presença de citocromo-oxidase	45
6.2.6	Teste bioquímico: viés metabólico para utilização da glicose (O/F)	46
6.2.7	Produção de exopolissacarídeo	47
6.2.8	Atividade enzimática - Proteases (caseinase, gelatinase, elastase)	48
6.2.8.1	Caseinase	48
6.2.8.2	Gelatinase	48
6.2.8.3	Elastase	49
6.2.9	Atividade enzimática – Lipase e fosfolipase	49
6.2.9.1	Lipase	49
6.2.9.2	Fosfolipase	50

6.2.10	Atividade enzimática - Carboidrases (amilase, celulase)	51
6.2.10.1	<i>Amilase</i>	51
6.2.10.2	<i>Celulase</i>	51
6.2.11	Testes genotípicos	52
6.2.11.1	<i>Extração de DNA total</i>	52
6.2.11.2	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	52
6.2.11.3	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	53
6.2.11.4	<i>Sequenciamento genético e análise das amostras</i>	54
6.2.12	Análise estatísticas	54
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
7.1	Procedimento realizado em campo	55
7.2	Procedimento em laboratório	56
7.2.1	Contagem Padrão em Placas (CPP) – BHCs	56
7.2.1.1	<i>Comparação entre as duas espécies de lagostas</i>	56
7.2.1.2	<i>Comparação entre os estratos anatômicos da lagosta <i>Panulirus argus</i> e <i>Panulirus laevicauda</i></i>	58
7.2.2	Contagem Padrão em Placas (CPP) – gênero <i>Vibrio</i>	61
7.2.2.1	<i>Comparação da CPP total entre as duas espécies de lagosta</i>	61
7.2.2.2	<i>Comparação de CPP total entre os estratos anatômicos da lagosta <i>Panulirus argus</i> e <i>Panulirus laevicauda</i></i>	62
7.2.2.3	<i>Contagem diferencial de vibrio de acordo com a utilização de sacarose</i>	63
7.2.3	Seleção e isolamento das colônias	64
7.2.4	Técnica de coloração em Gram	65
7.2.5	Testes bioquímicos: presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) - BHCs	66
7.2.6	Produção de exopolissacarídeo – BHCs	68
7.2.7	Testes bioquímicos: confirmação de presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) do gênero <i>Vibrio</i>	70
7.2.8	Produção de exopolissacarídeo – gênero <i>Vibrio</i>	71
7.2.9	Perfil enzimático das Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs)	73
7.2.10	Perfil enzimático do gênero <i>Vibrio</i>	76
7.2.11	Identificação, perfil enzimático e capacidade de produção de	78

	<i>exopolissacarídeos das amostras</i>	
8	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A - DECLARAÇÃO DE ACEITAÇÃO DE ARTIGO	102

1 INTRODUÇÃO

A atividade pesqueira tem um importante papel econômico na nutrição mundial, como fonte de proteína, renda e subsistência de inúmeras comunidades litorâneas e ribeirinhas. Sendo, portanto, um ramo responsável por fornecer saúde e segurança alimentar para bilhões de indivíduos no mundo (FAO, 2016; 2022). Atualmente, a pesca tem a missão de contribuir para o alcance do objetivo número dois dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) – “Fome Zero”. (FAO, 2022).

No Brasil, a pesca extrativista é considerada uma importante atividade econômica, principalmente, no que se refere à produção de alimentos (CRUZ, 2011). Sendo realizada no mar territorial, na plataforma continental, zona econômica exclusiva (ZEE) e em zonas de alto mar (pesca marinha), além de ser desenvolvida em ecossistemas como baías, estuários, manguezais e lagoas (pesca continental) (VASCONCELOS; DIEGUES; SALES, 2007; MPA, 2011).

O nordeste brasileiro, de forma geral, possui uma cadeia produtiva pesqueira caracterizada pela dominância da pesca artesanal, voltada para espécies de alto valor comercial. Sendo desenvolvida, principalmente, por três modalidades distintas: linhas, redes e armadilhas. A pescaria utilizando linha é empregada nas capturas de peixes das famílias Sciaenidae (pescadas) e Lutjanidae (cioba e pargo), as redes são usadas especialmente na captura de camarões da família Penaeidae (camarão branco e camarão rosa), e as armadilhas para apreensão de lagostas da família Palinuridae (lagosta vermelha e lagosta verde). Essas atividades pesqueiras são desempenhadas, em especial, nos Estados do Piauí, Bahia e Ceará (LUCENA-FRÉDOU *et al.*, 2021).

Além disso, essa região possui uma estreita plataforma continental, sofre forte influência da corrente oceânica do Brasil, pobre em nutrientes e com temperaturas elevadas, aspectos que contribuem para a formação de fundos rochosos. Em suma, essas áreas ficam localizadas na província sedimentar central, abundante em sedimentos biogênicos compostos por carbonato de cálcio, características essenciais para *habitats* de lagostas (FONTELES-FILHO, 2011).

Assim sendo, na região nordeste do Brasil ocorrem em abundância as lagostas *Panulirus argus* (lagosta vermelha) e *Panulirus laevicauda* (lagosta verde), e estes recursos pesqueiros apresentam destaque devido a sua grande importância econômica. Entre os principais produtores de lagostas tem-se os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte (FONTELES-FILHO; GUIMARÃES, 2000; LUCENA-FRÉDOU *et al.*, 2021).

A literatura a respeito das populações de lagostas espinhosas brasileiras costuma se concentrar apenas em parâmetros ligados à captura e ao ciclo de vida (OLIVEIRA, 2018; DUARTE *et al.*, 2011). Porém, aspectos relevantes da biologia das lagostas, como as enfermidades a que estão expostas e qual o seu impacto sobre a produção, perfil enzimático da sua microbiota e seu papel na saúde desses indivíduos têm sido menos estudados. Diversas enfermidades de etiologia viral já foram identificadas em crustáceos, entretanto, as mais estudadas são aquelas que afetam o camarão marinho (FLEGEL, 2012).

Doenças são os resultados do desequilíbrio entre o meio, o patógeno e o hospedeiro, isto pode ser observado quando a microbiota do hospedeiro está em desarmonia com seu *habitat* (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Podemos observar que microrganismos benéficos, comensais e patogênicos constituem grande parte da microbiota intestinal dos organismos (STECHEER; HARDT, 2011). Dentre esses, as bactérias fazem parte dos principais microrganismos encontrados no intestino de invertebrados aquáticos (TZUC *et al.*, 2014).

O sistema digestivo de lagostas é composto por três porções: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. O intestino anterior é formado pelo esôfago, o cardíaco e o estômago pilórico; o intestino médio inclui o hepatopâncreas e termina no sexto segmento abdominal, já o intestino posterior tem início após o intestino médio, terminando no ânus. A assimilação alimentar acontece principalmente na porção superior do intestino médio, por meio da excreção de enzimas oriundas do hepatopâncreas (YONGE, 1924).

O hepatopâncreas desempenha uma diversidade de funções, dentre elas, podem ser citadas: síntese e secreção de enzimas digestivas, absorção e armazenamento de nutrientes e liberação de reservas armazenadas durante o período intermuda (CECCALDI, 1989; VOGT, 2002). Esse órgão pode secretar três classes principais de enzimas digestivas: proteases, lipases e carboidrases (BROWN, 1995; HAMMER *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Além disso, essas enzimas podem agir contra alguns patógenos, agindo como agentes antibiofilmes. As proteases e lipases, por exemplo, são capazes de hidrolisar o biofilme bacteriano. Já que a produção do biofilme é uma fase primária importante para o ataque patogênico e é composto principalmente por exopolissacarídeos, proteínas, lipídios, e outras macromoléculas (KALPANA *et al.*, 2012; ESAKKIRAJ *et al.*, 2016).

A microbiota bacteriana intestinal é composta por um conjunto de microrganismos que possuem interações complexas com o indivíduo que a hospeda (ZOKAEIFAR *et al.*, 2012). Essas bactérias colaboram na realização da nutrição e coopera para a boa saúde do hospedeiro, combatendo a colonização de patógenos oportunistas e

ajudando na manutenção do sistema imune de espécies de crustáceos cultivados e selvagens, assegurando um maior crescimento e aumento na taxa de sobrevivência (DANIELS *et al.*, 2010; LAWLEY; WALKER, 2013; RUNGRASSAMEE *et al.*, 2016). Por outro lado, mudanças estruturais nessas comunidades bacterianas podem ocasionar diversos processos fisiopatológicos (KAMO *et al.*, 2017; LEZUTEKONG *et al.*, 2018).

As bactérias da hemolinfa dos crustáceos podem atuar de forma positiva na saúde do hospedeiro, modulando a resposta imune, gerando substâncias antimicrobianas e combatendo os patógenos (WANG; WANG, 2015). No entanto, o estresse ocasionado por alterações na temperatura pode causar disbiose, ou seja, o desequilíbrio nas comunidades microbianas da hemolinfa, levando à proliferação e ao aumento da carga bacteriana (septicemia) (SCOTT; THUNE, 1986). Portanto, manter o equilíbrio da microbiota intestinal, do hepatopâncreas e da hemolinfa é de suma importância para a manutenção da saúde do hospedeiro (OOI *et al.*, 2019).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Atividade pesqueira no Brasil

O Brasil é o país que tem a maior linha de costa do Oceano Atlântico Sul, com aproximadamente 8.500 km de extensão. As condições oceanográficas dessa costa fazem com que haja o predomínio de águas quentes, o que resulta em baixas produtividades primárias, consequentemente, baixa abundância relativa de recursos pesqueiros (STOCK *et al.*, 2017).

Variações regionais na produtividade, elevada diversidade de espécies e ecossistemas diversos são elementos que moldam as características da pesca no Brasil, fazendo dessa atividades uma segmento de grande heterogeneidade e complexidade (DIAS NETO; DIAS, 2015).

Na região Norte do país, o estuário do Rio Amazonas proporciona águas ricas em nutrientes, o que sustenta pescarias importantes, como pesca de camarão, bagres amazônicos e dourados. No Sul e Sudeste, de outro modo, as águas frias e mais produtivas facilitam a produção em maior escala de espécies de peixes pelágicos, como sardinha-verdadeira e peixes demersais, como corvinas e pescadas, além da pesca de camarão. Em suma, a costa do Nordeste é banhada por águas equatoriais, possuindo capacidade produtiva modesta estimulada primordialmente por recifes de corais e ecossistemas manguezais. Nessa região, a pescaria é majoritariamente artesanal, tendo como principais recursos explorados peixes recifais, lagostas e em águas mais profundas, peixes pelágicos (DIAS NETO; DIAS, 2015).

Estima-se que a produção da pesca marinha do país é de aproximadamente 500 mil toneladas por ano. Os últimos dados publicados pela FAO mostram que foram produzidas mais de 489 mil toneladas de pescado, no período de 2017-2018. Tornando o Brasil como trigésimo terceiro maior produtor pesqueiro de captura marinha do mundo (OCEANA, 2020; FAO, 2018).

2.2 Exploração de lagosta no Brasil

No Brasil, na década de 1950 deu início a captura, com perfil comercial, de lagosta e, desde então essa pescaria, apresenta relevância socioeconômica, principalmente em cidades costeiras (BRASIL, 2008). Esse crustáceo é considerado um recurso pesqueiro de suma importância para a exportação brasileira, sendo apontado como o mais valioso da região Nordeste, com representação de 30% das exportações de produtos marinhos, com valores de

movimentação entre 60 e 90 milhões de dólares (SANTOS, 2019). A pesca desses indivíduos ocorre desde o estado do Amapá até o estado do Espírito Santo, proporcionando emprego e renda em todo país (SANTANA *et al.*, 2015). Mesmo sendo capturadas ao longo de todo o Nordeste, 80% dos desembarques são realizados nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (MELO *et al.*, 2021).

Dados estatísticos sobre a pescaria de lagosta brasileira são falhos, pois o preenchimento dos mapas de bordo são realizados ainda manualmente nas superintendências federais de pesca e aquicultura. No entanto, registros do comércio exterior relatam que o país exportou 1,6 mil toneladas no ano de 2020, 1,49 mil toneladas em 2021 e mil toneladas em 2022 (BRASIL, 2023).

De acordo com dados gerais de exportação do COMEX STAT, a região Nordeste possui maior produção de lagosta e o estado do Ceará é o principal produtor e exportador desse recurso pesqueiro (BRASIL, 2021). O município de Icapuí, incluindo a praia de Redonda, merece destaque no setor da Pesca Marinha do Ceará, sendo por vários anos um dos maiores produtores de lagosta do Brasil (PREFEITURA DE ICAPUÍ, 2019).

No Brasil, há exploração de cinco espécies de lagostas: *Panulirus argus* (lagosta vermelha), *Panulirus laevicauda* (lagosta verde), *Scyllarides brasiliensis* (lagosta sapateira), *Scyllarides delfosi* (lagosta sapateira) e *Panulirus echinatus* (lagosta pintada). No entanto, a lagosta vermelha e a lagosta verde são as mais abundantes comercialmente, representando cerca de 70% e 20% da produção, respectivamente (FONTELES-FILHO; GUIMARÃES, 2000; OCEANA, 2020).

É necessário salientar que existe uma discussão entre geneticistas e ecólogos relacionada a um novo conhecimento genético, que diferencia populações de lagosta da América do Norte e Central da população brasileira (TOURINHO; SOLÉ-CAVA; LAZOSKI, 2012). De acordo com Giraldes e Smyth (2016), essa distinção ocorreu devido a pluma das bacias hidrográficas do Amazonas e Orinoco, que atuam como barreira física, impedindo o fluxo gênico. Em razão desse isolamento, surgiram duas populações geneticamente diferentes, sendo a lagosta da costa brasileira citada como *Panulirus meripurpuratus* e na América do Norte e Central citada como *Panulirus argus*. No entanto, maiores estudos são necessários para que essa discussão seja elucidada já que outros cientistas estão contrapondo essa proposta de separação genética entre espécies.

O esforço de pesca empregado de forma desordenada acarretou na sobrepesca de recursos pesqueiros marinhos em escala global e não foi diferente com a pescaria de lagosta no Brasil, que a partir da década de 1970 sofreu com a drástica redução de seus estoques,

devido ao ingresso de barcos de grande porte e de técnicas proibidas, transformando essa prática insustentável e predatória (MUNIZ, 2005). Em adição, a fiscalização realizada de forma ineficiente e a ausência de acompanhamento para monitorar as pescarias, que proporcionam sucessivos descumprimentos das medidas de ordenamento vigentes, ocasionaram um cenário de crise nesse setor (CAVALCANTE; FURTADO-NETO; COSTA, 2011). No Brasil, os estoques de lagostas vermelhas e verdes estão em elevada sobrepesca, o que ocasiona instabilidade nas pescarias, podendo acarretar um colapso total nesse campo (DIAS-NETO, 2017).

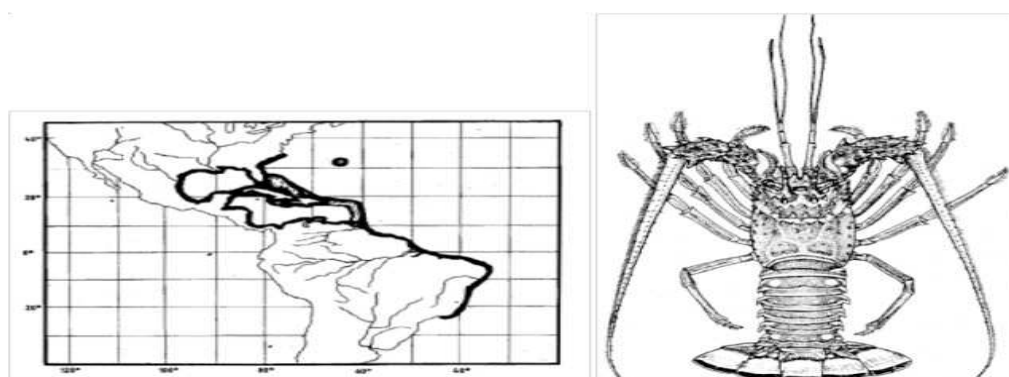
2.3 Espécies investigadas

Para o presente estudo, foram investigadas as espécies *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*, por serem mais exploradas e conseqüentemente sofrem maior impacto em suas populações.

2.3.1 *Panulirus argus* (Latreille, 1804)

Essa espécie faz parte da família Palinuridae e tem como nomes vulgares lagosta vermelha, lagosta comum e lagosta-espinhosa-do-Caribe. Pode ser encontrada no Oceano Atlântico, Centro Ocidental e Sudeste. Na plataforma continental do Brasil, pode ser encontrada desde o Amapá até o Espírito Santo. Possui espinhos em seu corpo cilíndrico, apresenta antenas muito longas e finas (Figura 1). Sua cor é avermelhada ou amarronzada. Os machos e fêmeas podem atingir 174 mm e 231 mm de comprimento, respectivamente (SILVA *et al.*, 2008).

Figura 1 - Representação de um indivíduo da espécie *Panulirus argus*, ocorrência e sua distribuição geográfica



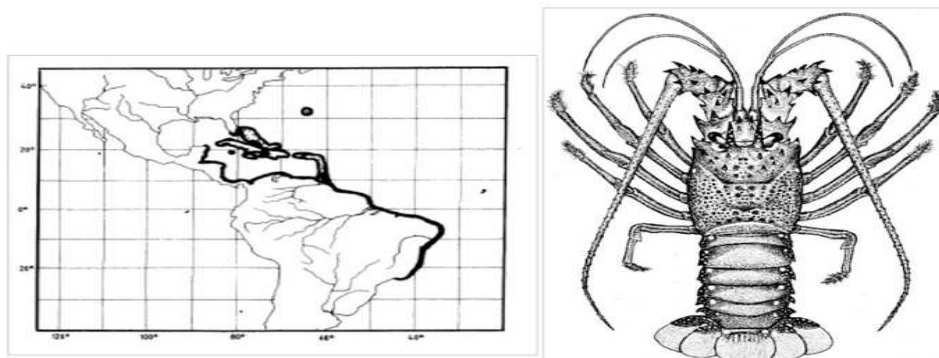
Fonte: HOLTHUIS, 1991.

2.3.2 *Panulirus laevicauda* (Latreille, 1817)

Segunda espécie mais relevante do Oceano Atlântico Centro Ocidental e Sudoeste. Conhecida popularmente como lagosta verde ou lagosta-de-cabo-verde. Assim como a lagosta-espinhosa-do-Caribe, também contém espinhos distribuídos ao longo do seu corpo, com antenas compridas e finas. Sua cor é esverdeada e os anéis abdominais se distinguem da lagosta comum por serem completamente lisos (FONTELES-FILHO, 2000).

Esses indivíduos são encontrados nas costas tropicais americanas do Oceano Atlântico, e de Cuba até o sudeste do Brasil (CRUZ *et al.*, 1987) (Figura 2).

Figura 2 - Representação de um indivíduo da espécie *Panulirus aevicauda*, ocorrência e sua distribuição geográfica.



Fonte: HOLTHUIS, 1991.

Lagostas vermelhas e verdes coexistem no mesmo habitat, no entanto, divergem quanto à profundidade de ocorrência, pois as lagostas-de-cabo-verde pertencem a ambiências mais limitadas, desde a região de maré até 50 metros (SILVA *et al.*, 2008).

2.4 Importância do estudo da microbiota em lagostas

Os microrganismos crescem em um local estável dentro do intestino do animal e em troca o hospedeiro pode ser beneficiado pela digestão de alimentos realizada por esses seres microscópicos, havendo portanto, sinergismo entre eles (MEZITI *et al.*, 2010). A remoção e geração de energia está diretamente associada à atividade, diversidade e abundância da microbiota que povoa o hospedeiro, influenciando conseqüentemente seu metabolismo e podendo ter efeitos sobre a aptidão do indivíduo (TIETJEN, 2014).

Ademais, essa microbiota ajuda na ativação do sistema imunológico por meio da mucosa intestinal ou pode agir de forma antagônica contra diversos patógenos que se aderem ao organismo do animal, além de ter a capacidade de influenciar de forma direta a fisiologia enzimática do trato gastrointestinal dos seus hospedeiros por meio da produção de enzimas digestivas (proteases, lipases, celulasas, amilases, dentre outras) (HOLT *et al.*, 2020).

Essas enzimas atuam na quebra de moléculas complexas transformando-as em estruturas mais simples e de fácil absorção. Desse modo, a ação das enzimas da microbiota favorece o coeficiente de digestibilidade de lipídeos, proteínas brutas, fósforo, aminoácidos essenciais e ácidos graxos, o que tem influência direta em fatores de conversão alimentar (ANGELIM; COSTA, 2017).

Nos crustáceos, a capacidade de obtenção de nutrientes por vastas fontes de alimentos é possível devido aos processos fisiológicos que acontecem no trato digestivo, incluindo o perfil e as atividades enzimáticas digestivas desenvolvidas (CECCALDI, 1989). Diferentes espécies de crustáceos expõem uma diversidade particular dessas enzimas, que reflete seus *habitats* e hábitos alimentares diversos (FIGUEIREDO, 2009). Como exemplo, os lagostins do gênero *Cherax*, considerados detritívoros/onívoros, possuem enzimas digestivas capazes de hidrolisar diversos substratos encontrados em sua dieta natural, o que mostra sua capacidade para se adaptar a uma dieta variada (LINTON, 2009).

A enzima quitinase pode degradar a quitina em N-acetilglicosamina (BHATTACHARYA *et al.*, 2007; HAMID, 2013), essa reação pode estar amplamente ligada a resposta imune e ao processo de ecdise de invertebrados, incluindo as lagostas (ZHOU *et al.*, 2017).

No Brasil, ainda hoje, não foi possível fazer a reprodução de lagostas em cativeiro, com sucesso. A falta de pesquisas relacionadas às funções digestivas e o perfil enzimático desses indivíduos podem ser um empecilho, pois as respostas das enzimas digestivas à adequação da alimentação podem esclarecer as necessidades nutricionais, e em consequência, adaptações fisiológicas das dietas formuladas, e desse modo tornar possível o cultivo desse crustáceo (PAVASOVIC *et al.*, 2007).

Os biofilmes, comunidades microbianas heterogêneas associadas a uma matriz extracelular (EPS) composta por distintos tipos de biopolímeros originado do metabolismo bacteriano (ABEE *et al.*, 2011), fornecem às bactérias diversas vantagens em relação ao microrganismo “solitário”, visto que, podem propiciar um ambiente mais seguro (CAI, 2017).

Esses agregados possuem importância para alimentação de organismos aquáticos, manutenção da qualidade de água e para o controle de patógenos, pois são fonte de proteína de boa qualidade, são fundamentais para garantir os ciclos de nitrogênio e carbono equilibrados, e por serem bastante resistentes podem combater organismos patogênicos em ambientes diversos (PANDEY *et al.*, 2014).

Em contrapartida, a expressão de determinados aspectos de virulência, variações fenotípicas e formação de agregados microbianos (biofilmes) facilitam a introdução nos tecidos e conseqüentemente conferem maior patogenicidade aos microrganismos. Por exemplo, ao crescerem em biofilmes, as células alteram seu fenótipo e passam a ter uma resistência extraordinária a diversos fármacos, dificultando a extinção do processo infeccioso (NAVES *et al.*, 2013).

Outrossim, a produção de gelatinases, amilases, quitinases e elastases já são amplamente conhecidas como fatores de virulência, sendo mostradas como positivas na letalidade de testes em camundongos (RODRIGUES *et al.*, 1993; VERGIS *et al.*, 2002). As lipases bacterianas estão envolvidas na absorção de nutrientes por meio da degradação de lipídeos de membranas, o que pode ocasionar danos ao hospedeiro. Além do mais, as fosfolipases podem atuar como hemolisinas e, portanto, podem causar lise de eritrócitos (FIORE *et al.*, 1997).

Doenças na carapaça de lagostas vem sendo associadas à infecções causadas por bactérias, em especial, bactérias que desenvolvem atividades quitinolíticas, muitas vezes combinadas com ações proteolíticas e lipolíticas (MANCUSO *et al.*, 2010; QUINN *et al.*, 2013; ZHA *et al.*, 2017).

Fatores exógenos como a alimentação e a qualidade da água podem ter diferentes efeitos nas comunidades bacterianas intestinais de diferentes espécies. A microbiota do sistema gastrointestinal das lagostas sofre influência direta da água e do sedimento em que habitam, uma vez que esses indivíduos são bentônicos (QIAO *et al.*, 2016; MEZITI; MENTE; KORMAS, 2012).

Alguns parâmetros ambientais podem se tornar estressores, particularmente a temperatura, pois afetam significativamente a saúde e a produtividade dos animais. As lagostas são organismos ectotérmicos, desta forma, a temperatura do ambiente atinge diretamente a utilização do oxigênio dissolvido, o metabolismo e o crescimento (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). O estresse causado pelo aumento da temperatura também pode comprometer significativamente a microbiota da hemolinfa, no “sistema circulatório” das lagostas e outros decápodes (SCOTT; THUNE, 1986). Essas informações são relevantes

no contexto das mudanças climáticas, pois a elevação da temperatura da água do mar pode ter o potencial de causar maiores taxas de mortalidade em lagostas (OOI *et al.*, 2019).

O gênero *Vibrio* pode ser utilizado como bioindicador de mudanças climáticas (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2017), pois diversas espécies podem ser considerados estacionais, sendo mais comumente detectados durante meses específicos de alto verão, em temperaturas mais elevadas e chuvas reduzidas (CHENG *et al.*, 2005; VEZZULLI *et al.*, 2013; SULLIVAN; NEIGEL, 2018). E, durante o período de inverno, essas mesmas células bacterianas podem ser não cultiváveis (URAKAWA; RIVERA, 2006).

No entanto, essas bactérias podem estar relacionadas com uma diversa gama de animais aquáticos, como peixes, moluscos e crustáceos (BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2010; CUÉLLAR-ANJEL *et al.*, 2014; MOHAMAD *et al.*, 2019). Esse gênero pode ser encontrado nesses animais saudáveis, fazendo parte da microbiota natural desses organismos (GAO *et al.*, 2019).

Em contrapartida, algumas espécies de *Vibrio* são patogênicas e causadoras de infecções denominadas “vibrioses”. Nos crustáceos, essas enfermidades são as mais graves e onipresentes. Essas doenças podem ser devastadoras principalmente durante o estágio larval (GOULDEN *et al.*, 2012; SCHRYVER *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2017).

Todos os crustáceos aquáticos estão sujeitos a doenças associadas a esse patógeno oportunista. Prejuízos substanciais de produção, em fazendas de camarão, são comumente observadas após surtos de vibrioses, como por exemplo, a doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND) (SCHRYVER *et al.*, 2014).

Ademais, outras patologias causadas por víbrios são relatadas em crustáceos, tais quais: incubação e vibriose luminescente, síndrome da casca, necrose da cauda, doença da lagosta flácida, doença do corpo vermelho, bacteremia causada por *Vibrio* e síndrome do verão (JAYASREE *et al.*, 2006; SOTO RODRIGUEZ *et al.*, 2006; MANCUSO *et al.*, 2010; CAWTHORN, 2011; CUÉLLAR-ANJEL *et al.*, 2014; SULLIVAN; NEIGEL, 2018; RADHAKRISHNAN; KIZHAKUDAN, 2019).

Como descrito na revisão realizada por Valente e Wan (2021), as vibrioses podem causar diversos danos às lagostas (Quadro 1).

Quadro 1- Doenças em lagostas causadas ou associadas com espécies de v́brios.

DOENÇAS	ESPÉCIES DE VIBRIOS	ESPÉCIE DE LAGOSTA	REFERÊNCIAS
Vibriose de incubadora de lagostas (filossoma)	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. harveyi</i> <i>V. owensii</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Jasus edwardsii</i> <i>Panulirus</i> sp.	Handlinger <i>et al.</i> (1999) Bourne <i>et al.</i> (2007) Goulden <i>et al.</i> (2012) Radhakrishnan e Kizhakudan (2019)
Vibriose luminescente (ovos e larvas)	<i>V. campbellii</i> <i>V. harveyi</i> <i>V. splendidus</i>	<i>Jasus verreauxi</i>	Diggles <i>et al.</i> (2000)
Doença da carapaça (juvenis e adultos)	<i>Vibrios spp.</i> quitinolíticos, incluindo: <i>V. alginolyticus</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. harveyi-like</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. splendidus</i> <i>V. vulnificus</i>	<i>Homarus americanus</i> <i>Panulirus argus</i> <i>Panulirus cygnus</i>	Porter <i>et al.</i> (2001) Stephen <i>et al.</i> (2003)
Necrose da Cauda (subdivisão da doença da carapaça)	<i>V. atlanticus</i> <i>V. crassostreae</i> <i>V. cyclitrophicus</i> <i>V. gigantis</i> <i>V. splendidus</i>	<i>Jasus</i> sp. <i>Palinurus</i> sp. <i>Panulirus</i> sp. <i>Thenus</i> sp.	Mancuso <i>et al.</i> (2010) Shields (2011) Zha <i>et al.</i> (2018) Radhakrishnan e Kizhakudan (2019)
Doença da lagosta mole (adulto)	<i>V. fluvialis</i> <i>V. fluvialis-like</i>	<i>Homarus americanus</i>	Tall <i>et al.</i> (2003) Cawthorn (2011)
Doença do corpo vermelho (juvenis e adultos)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Panulirus homarus</i> <i>Panulirus longipes</i> <i>Panulirus ornatus</i> <i>Panulirus polyphagus</i>	Radhakrishnan e Kizhakudan (2019)

Fonte: AUTORA, 2023.

Como uma diversidade de espécies de crustáceos aquáticos podem ser prejudicados pelas vibrioses, é essencial entender a biocomplexidade do *Vibrio*, portanto, identificar e caracterizar esses microrganismos nesses indivíduos é de suma importância.

No Brasil, não há informações sobre a microbiota natural das lagostas, o que dificulta a identificação de microrganismos potencialmente invasores e patogênicos. A

diminuição dos estoques de lagostas sempre esteve associada à sobre-exploração desses indivíduos, no entanto, nada se sabe sobre a saúde desses organismos no ambiente natural. Além disso, identificar esses microrganismos e caracterizar seu perfil enzimático é essencial para buscar elucidar lacunas necessárias para o desenvolvimento do cultivo de lagostas e desse modo diminuir a pressão sobre os estoques lagosteiros.

3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS NOS SISTEMAS DIGESTIVO E CIRCULATÓRIO DE LAGOSTAS E LAGOSTINS: CONEXÕES IMPORTANTES PARA UMA AQUICULTURA EFICIENTE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Uma revisão sistemática da literatura foi realizada usando uma adaptação da metodologia *Methodi Ordinatio* (PAGANI *et al.*, 2015; PAGANI *et al.*, 2017). Na qual, foram estabelecidas como etapas:

- 1 Intenção da pesquisa, que consistiu em à qual linha de pesquisa se vinculou a busca;
- 2 Busca preliminar com palavras-chave nas bases de dados;
- 3 Definição de combinações de palavras-chave e base de dados a serem usadas;
- 4 Estabelecimento de um limite temporal;
- 5 Filtragem:

a) eliminação dos artigos não relacionados ao tema, por meio da leitura de seus títulos e resumos;

b) conferência dos artigos, após leitura integral dos estudos foram descartados os que não eram de interesse da revisão.

- 6 Leitura sistemática e análise dos artigos.

Buscando explorar o conhecimento da diversidade bacteriana simbiótica nos sistemas digestivo e circulatório de lagostas e lagostins. A busca foi realizada na base de dados eletrônica *Scopus*. Como estratégia de busca foram utilizados o título do artigo, resumo e palavras-chave de indexação, utilizando termos específicos como: microbioma, bactéria, lagosta, lagostim, intestino, hemolinfa, em combinações possíveis, utilizando os operadores booleanos AND – OR

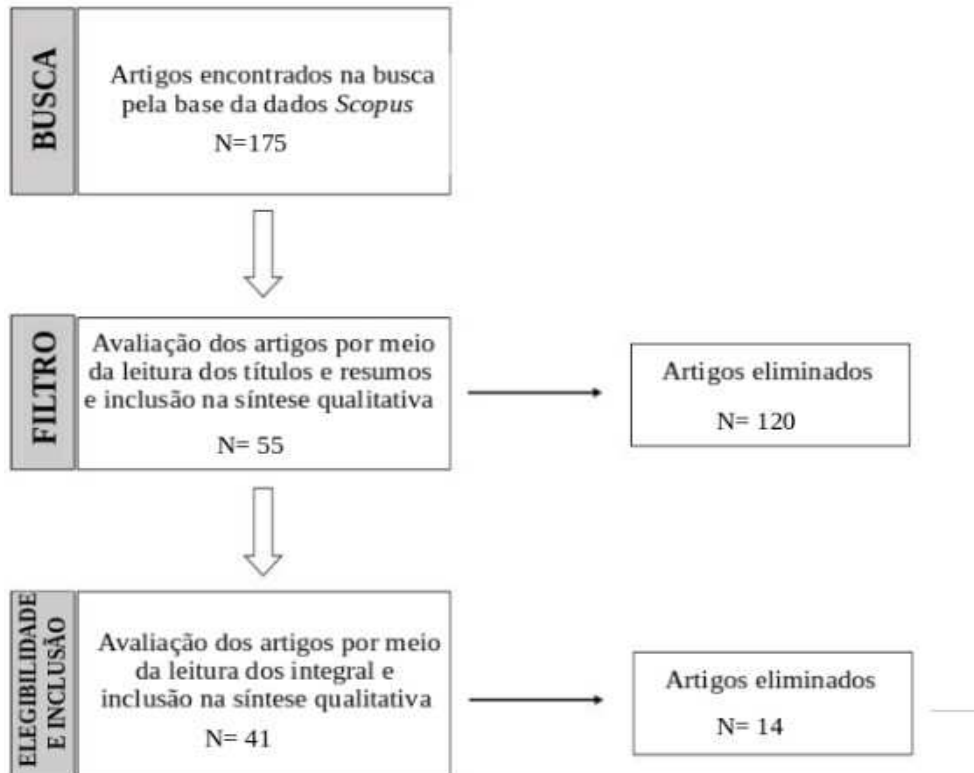
- Lagosta OU lagostim E
- Microbioma OU bactérias E
- Intestino OU hemolinfa OU hepatopâncreas

Para garantir a elegibilidade das informações, foram adotados os seguintes critérios: publicação de artigos científicos dos anos de 2002 a 2023, escritos em inglês ou espanhol, com conteúdo voltado para microbiologia bacteriana do intestino, hepatopâncreas e hemolinfa de lagostas. Quando os termos foram encontrados e os artigos estavam de acordo com os critérios estabelecidos, os resultados publicados foram analisados. A seleção e análise das informações foram feitas por meio da leitura dos documentos.

Cento e setenta e cinco artigos foram encontrados a partir da busca por palavras-

chave. No entanto, após a leitura dos títulos e resumos dos documentos, apenas cinquenta e cinco artigos estavam dentro dos critérios de elegibilidade. Posteriormente, foi realizada uma análise mais detalhada, por meio da leitura completa dos estudos, restando quarenta e um artigos escolhidos para síntese qualitativa (Figura 3 e Tabela 1).

Figura 3 - Fluxograma referente ao procedimento de seleção dos artigos encontrados.



Fonte: AUTORA, 2023.

Tabela 1 -Relação dos artigos científicos selecionados e analisados neste estudo segundo critérios previamente estabelecidos. “continua”

Autores	Título do Periódico	Citações	Fator de Impacto
Tall <i>et al.</i> 2003	Applied and Environmental Microbiology	55	5.005
Chistoserdov <i>et al.</i> 2005	Journal of Shellfish Research	74	1.218
Battison <i>et al.</i> 2008	Journal of Invertebrate Pathology	14	2.795
Bartlett <i>et al.</i> 2008	Journal of Fish Diseases	20	2.580
Jiravanichpaisal <i>et al.</i> 2009	Journal of Invertebrate Pathology	131	2.795
Meziti <i>et al.</i> 2010	FEMS Microbiology Ecology	83	4.519
Basti <i>et al.</i> 2010	Diseases of Aquatic Organisms	33	1.769
Meziti <i>et al.</i> 2012	Systematic and Applied Microbiology	72	4.064
Quinn <i>et al.</i> 2013	Diseases of Aquatic Organisms	14	1.769
Ooi <i>et al.</i> 2017	FEMS Microbiology Ecology	32	4.519
Ooi <i>et al.</i> 2019	Scientific Reports	22	4.996
Holt <i>et al.</i> 2020	ISME Journal	35	11.217
Zamora <i>et al.</i> 2020	Journal of Invertebrate Pathology	5	2.795
Liu <i>et al.</i> 2020	Aquaculture	33	5.135
Jung <i>et al.</i> 2021	Diseases of aquatic organisms	5	1.769
Wang <i>et al.</i> 2021	Frontiers in Microbiology	15	6.064
Chen <i>et al.</i> 2021	Frontiers in Microbiology	8	6.064
Wu <i>et al.</i> 2021	Aquaculture	19	5.135
Xavier <i>et al.</i> 2021	Hydrobiologia	6	2.822
Dragičević <i>et al.</i> 2021	Microbiology Spectrum	10	9.043
Hernández <i>et al.</i> 2022	Developmental and Comparative Immunology	11	3.605
Cai <i>et al.</i> 2022	Aquaculture	9	5.135
Bekavac <i>et al.</i> 2022	Journal of Fish Diseases	1	2.580
Foysal <i>et al.</i> 2022	Environmental Microbiology Reports	3	4.006
Xue <i>et al.</i> 2022	Aquaculture Reports	11	3.385
Zhang <i>et al.</i> 2022	Ecotoxicology and Environmental Safety	2	6.8
Zhu <i>et al.</i> 2022	Environmental Microbiomes	3	7.370
Cheng <i>et al.</i> 2022	Ecotoxicology and Environmental Safety	2	6.8
Zhang <i>et al.</i> 2022	Antioxidants	3	7.0
Wan <i>et al.</i> 2022	Animals	1	3.0
Han <i>et al.</i> 2022	Science of the Total Environment	16	10.753
Huang <i>et al.</i> 2022	Fish and Shellfish Immunology	5	4.622
Huang <i>et al.</i> 2022	Frontiers in Microbiology	2	6.064
Li <i>et al.</i> 2022	Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	2	6.073

Tabela 1- Relação dos artigos científicos selecionados e analisados neste estudo segundo critérios previamente estabelecidos. “conclusão”.

Autores	Título do Periódico	Citações	Fator de Impacto
Chen <i>et al.</i> 2022	Microbiology Spectrum	7	9.043
Vaughn e Jackson 2022	Microorganisms	0	4.5
Zheng <i>et al.</i> 2023	Fish and Shellfish Immunology	2	4.7
Bennett <i>et al.</i> 2023	Veterinary Pathology	0	2.4
Dai <i>et al.</i> 2023	Aquaculture	2	4.5
Guillén-Watson <i>et al.</i> 2023	Frontiers in Microbiology	0	5.2
Zhang <i>et al.</i> 2023	Environmental Science and Pollution Research	0	5.8

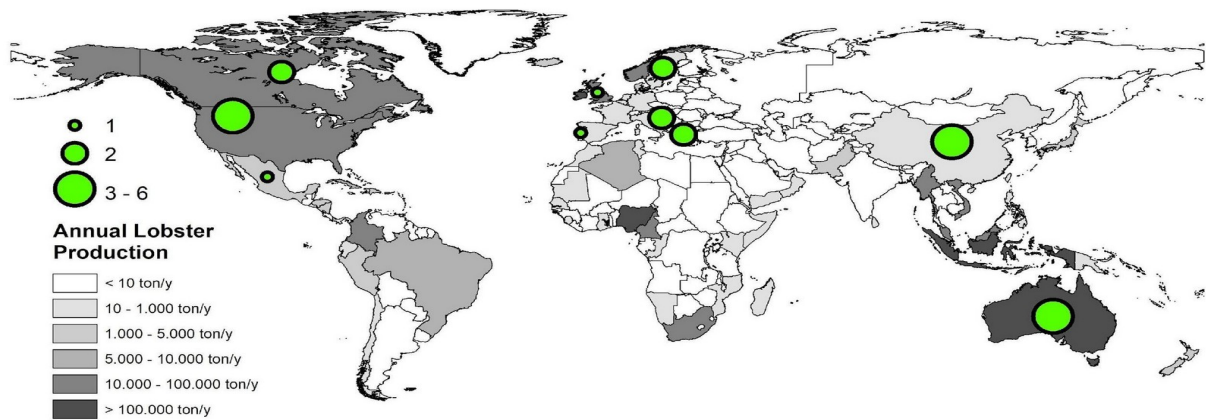
Fonte: AUTORA, 2023.

De acordo com o limite temporal estabelecido nesta revisão sistemática (2003 - 2023), foi possível perceber que houve uma crescente na produção de estudos envolvendo o assunto abordado. Dando destaque para os últimos 3 anos, com 6, 16 e 5 artigos publicados por ano, respectivamente. Superando a média anual que seria de 1,95 artigos.

Ao analisar o número de citações totais neste período de tempo, obteve-se 768 citações, uma média de aproximadamente 36,57 alusões a esse tema por ano. Destacando-se Jiravanichpaisal *et al.* (2009) e Meziti *et al.* (2010), com 131, 83 menções, respectivamente. Tais estudos abordam a *Aeromonas hydrophila*, como patógeno altamente virulento em lagostas e mudança na diversidade das comunidades bacterianas intestinais relacionada com variações temporais. Sendo portanto os temas mais referenciados quando levado em consideração a microbiota de lagostas, nos últimos 21 anos. Apesar dos estudos de microbiota dos organismos serem de suma importância, há poucas pesquisas publicadas, ao redor do mundo, relacionadas a esse assunto envolvendo lagostas.

Estas publicações científicas foram avaliadas em relação à quantidade e produção média anual de lagosta da pesca e aquicultura no seu país de origem, na última década, segundo a FAO, em 2022. A partir desta análise geográfica, 13 países incluindo Austrália, Canadá, China, Costa Rica, Croácia, Escócia, Estados Unidos da América, Grécia, Inglaterra, México, Nova Zelândia, Portugal e Suécia publicaram estudos sobre a microbiota bacteriana da lagosta. Destacando Austrália, China e Estados Unidos da América como os países que publicaram a maioria dos estudos relacionados a esse tema. Foi possível observar que há carência de estudos microbiológicos envolvendo lagostas em países africanos e sul-americanos, mesmo que tenham uma produção anual de lagostas e lagostins acima de 13,9 mil e 30,4 mil toneladas, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 - Produção média anual de lagostas e lagostins a partir de dados da FAO e publicações científicas relacionadas à microbiota desses organismos aquáticos.



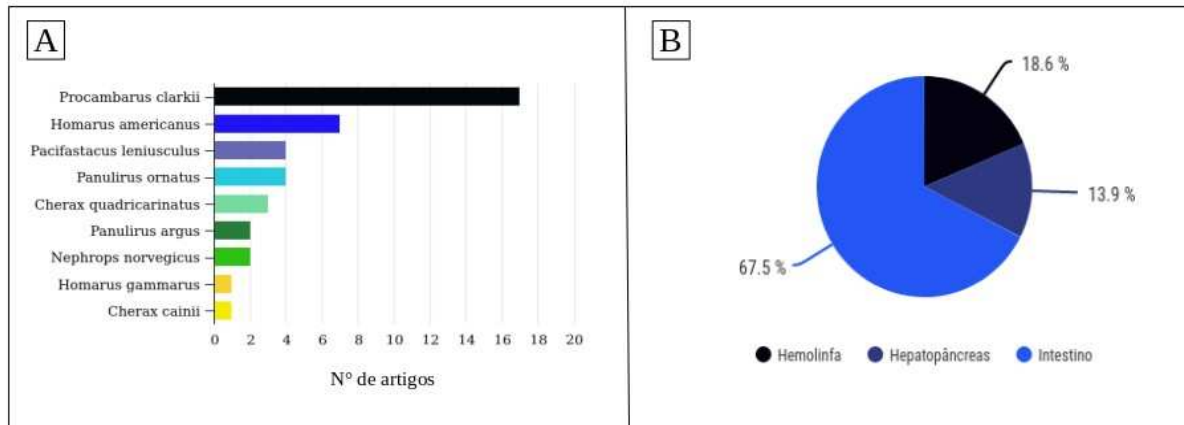
Fonte: AUTORA, 2022.

As espécies de lagostas analisadas nesses artigos foram *Cherax cainii*, *Cherax quadricarinatus*, *Homarus americanus*, *Homarus gammarus*, *Nephrops norvegicus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Panulirus argus*, *Panulirus ornatus* e *Procambarus clarkii* e com foco principalmente na microbiota intestinal.

A maioria das pesquisas analisadas está relacionada ao intestino, pois este órgão, em sinergia com os microorganismos, possui diversas funções vitais, dentre as quais podemos destacar as atividades imunoestimulantes, a geração de vitaminas, a regulação do desenvolvimento intestinal e a prevenção do aparecimento de desordens de microorganismos patogênicos (PÉREZ *et al.*, 2010; SEMOVA *et al.*, 2012). Em suma, o microbioma intestinal desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde do hospedeiro, por meio de uma variedade de mecanismos adaptativos e inatos capazes de induzir respostas imunorreguladoras para controlar as variações dessa microbiota (PALM *et al.*, 2015).

Apenas dois artigos investigaram a microbiota de uma espécie de lagosta que ocorre no Brasil (*P. argus*), porém os estudos foram conduzidos na Costa Rica e no México. O que confirma a escassez de informações científicas produzidas e a importância de uma pesquisa direcionada para preencher a lacuna de conhecimento existente (Figura 5 A-B).

Figura 5 - Número de artigos científicos abordando o microbioma por espécie de lagosta e lagostim (A) e percentual de estudos por sítios anatômicos de lagostas (B).



Fonte: AUTORA, 2023.

Um total de 14 filos, 69 famílias e 137 gêneros bacterianos foram identificados, sendo *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Candidatus-Bacilloplasma*, *Candidatus-Hepatoplasma*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio* os gêneros mais comuns em mais da metade das espécies estudadas. No intestino, o tecido mais estudado da lagosta, foi encontrada uma grande diversidade microbiana (Figura 6), seguida pela hemolinfa e hepatopâncreas, respectivamente (Figura 7).

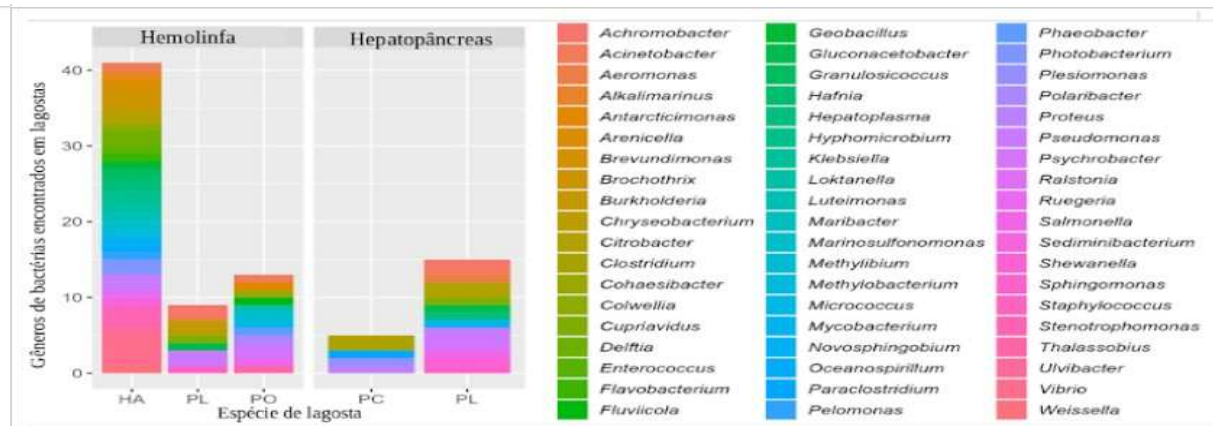
Figura 6 - Diversidade de gêneros microbianos encontrados no intestino de lagostas.



Fonte: AUTORA, 2022.

CC: *Cherax cainii*; CQ: *Cherax quadricarinatus*; HA: *Homarus americanus*; HG: *Homarus gammarus*; NN: *Nephrops norvegicus*; PL: *Pacifastacus leniusculus*; PA: *Panulirus argus*; PO: *Panulirus ornatus* e PC: *Procambarus clarkii*.

Figura 7 - Diversidade de gêneros microbianos encontrados na hemolinfa da lagosta e no hepatopâncreas.



Os artigos comprovaram diferenças na microbiota das lagostas em vários aspectos, comparando indivíduos sadios e infectados (QUINN *et al.*, 2013; BATTISON *et al.*, 2008) ; organismos vivos e mortos (JUNG *et al.*, 2021) técnicas, dietas, ambientes e temperaturas distintas (MEZITI *et al.*, 2012; BARTLETT *et al.*, 2008); diferenças nas fases de desenvolvimento, diferentes períodos do ano (MEZITI *et al.*, 2010; OOI *et al.*, 2017), entre outras particularidades.

Com base nas análises de similaridade do conteúdo completo do artigo, os artigos podem ser classificados em 3 classes distintas. O artigo escrito por Tall *et al.* (2003) focou apenas na identificação de espécies do gênero *Vibrio* na hemolinfa de *Homarus americanus* e o estudo conduzido por Bennett e seu colaboradores (2023) deram ênfase a bactéria causadora (*Vibrio harveyi*) de necrose do hepatopâncreas de *Panulirus argus*, enquanto os demais focaram na diversidade microbiana.

A classe 1 concentra artigos científicos relacionados ao potencial patogênico de microrganismos. Esses estudos mostram um aumento de patógenos oportunistas no intestino, hepatopâncreas e/ou hemolinfa, relacionados ao enfraquecimento das lagostas causado por doenças como o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), *Panulirus argus* Vírus 1 (PaV1), estresse causado por alterações em temperatura e salinidade ou morte (BASTI *et al.*, 2010; OOI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020; ZAMORA-BRISEÑO *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021; XUE *et al.*, 2022). No entanto, evidências indicam que as doenças epizoóticas da carapaça (ESD) não estão relacionadas a infecções internas por nenhuma espécie bacteriana específica. Isso significa que a ESD é uma doença dérmica que não envolve um patógeno bacteriano interno (QUINN *et al.*, 2013).

É possível perceber a ocorrência da diminuição de microrganismos simbióticos e probióticos, o que demonstra o papel potencial dessa microbiota na manutenção da saúde dos indivíduos estudados e sua suscetibilidade a doenças com a alteração desse microbioma (WU *et al.*, 2021). De acordo com esses estudos, há um aumento significativo de vibrios em lagostas doentes, estressadas ou mortas. Várias espécies de *Vibrio* são descritas como microrganismos que auxiliam na digestão de celulose, quitina, compostos derivados de algas, carboidratos e lipídios em crustáceos (GATESOUBE *et al.*, 1997, HENDERSON; MILLAR, 1998; ITOI *et al.*, 2006, PERERA; SIMON, 2015). Em contraste, muitas dessas espécies são consideradas patógenos oportunistas, pois podem afetar a fisiologia e a saúde de seus hospedeiros (EGERTON *et al.*, 2018). As espécies *Vibrio harveyi* e *Vibrio parahaemolyticus*, por exemplo, são relatadas como agentes nocivos na carcinicultura, inclusive sendo relacionados a lagostas imunocomprometidas (SHIELDS, 2011).

Além disso, *Aeromonas* é outro gênero bacteriano que tem sua abundância aumentada em lagostas enfraquecidas. Devido às interações com a microbiota intestinal, eles podem ser comumente encontrados no intestino e não são capazes de prejudicar a saúde de seu hospedeiro. Por outro lado, achados relatam que lagostas infectadas podem ter suas barreiras epiteliais intestinais danificadas de forma a facilitar o aumento desordenado de patógenos oportunistas como *Aeromonas* (SHUI *et al.*, 2020). Há aumento de lagostas infectadas por *Candidatus Bacilloplasma*, bactéria comumente encontrada no trato intestinal de artrópodes e que beneficia quem a hospeda. Este gênero possui algumas espécies que contribuem para uma maior eficiência na resposta adaptativa a condições de limitação alimentar (FRAUNE; ZIMMER, 2008; LECLERCQ *et al.*, 2014). Portanto, o aumento na abundância de *Candidatus Bacilloplasma* em lagostas contaminadas pode estar associado a uma estratégia compensatória para aumentar a absorção de nutrientes quando as lagostas param de se alimentar (LECLERCQ *et al.*, 2014).

A classe 2 agrega artigos que comparam os efeitos do gênero *Vibrio* na saúde das lagostas. Esses estudos corroboram achados anteriores que caracterizam esse gênero como ubíquo em ecossistemas marinhos e estuarinos, podendo também estar presente em ambientes de água doce.

Em geral, as espécies de *Vibrio* são capazes tanto de beneficiar seu hospedeiro, principalmente colaborando na digestão dos alimentos e inibindo outras bactérias através da produção de compostos antibióticos, quanto causando doenças graves (CHISTOSERDOV *et al.*, 2005; BARTLETT *et al.*, 2008; BATTISON *et al.*, 2008; OOI *et al.*, 2017; HOLT *et al.*, 2020; JUNG *et al.*, 2021; HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2022). Além disso, algumas cepas de

vibrios, identificadas como patógenos oportunistas, são encontradas em lagostas saudáveis, mas podem causar problemas se os animais estiverem imunocomprometidos (SHIELDS, 2011). Isso pode ocorrer durante o período de ecdise das lagostas, pois as barreiras externas podem estar comprometidas, deixando-as mais suscetíveis à proliferação e consequente ataque patogênico por espécies residentes de *Vibrio* que podem causar altas mortalidades (BOURNE *et al.*, 2004). Esses estudos destacam as espécies *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* como importantes patógenos de crustáceos, pois são capazes de gerar exotoxinas conhecidas por causar mortalidades em camarões das espécies *Penaeus japonicus* e *Penaeus monodon* (HARRIS; OWENS, 1999, BOURNE *et al.*, 2004).

Por fim, a classe 3 agrupa artigos relacionados à influência que os ecossistemas aquáticos exercem sobre a microbiota intestinal, hepatopâncreas e hemolinfa. Através dos estudos analisados e discutidos, é possível afirmar que as lagostas possuem uma microbiota interna definida por filtros ecológicos, que abrangem níveis geográficos e celulares dependentes do ambiente, nos quais aspectos ambientais como qualidade da água, disponibilidade de alimentos, poluição, entre outros os parâmetros que desempenham um papel importante (MEZITI *et al.*, 2010; MEZITI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2021; DRAGICEVIC *et al.*, 2021; XAVIER *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021).

Um ambiente com uma microbiota natural diversa e abundante pode trazer benefícios subsequentes para a saúde e crescimento dos indivíduos, pois pode proporcionar seleção e colonização de uma comunidade bacteriana intestinal mais diversa e consequentemente mais eficiente contra patógenos (HOLT *et al.*, 2020). Essas pesquisas revelam que a dieta das lagostas pode modular a diversidade e abundância de sua microbiota. Dietas que incluem proteínas animais e de insetos podem influenciar uma variedade de grupos bacterianos responsáveis por uma série de atividades metabólicas, como o crescimento de firmicutes e bactérias do ácido lático (FOYSAL *et al.*, 2022). Em resumo, as dietas compostas por *Haematococcus pluvialis*, uma alga de água doce, demonstraram ajudar a estabilizar a homeostase microbiana (CAI *et al.*, 2022). Diferenças no microbioma intestinal relacionadas ao sexo das lagostas podem ser explicadas pelo período reprodutivo das fêmeas, que se isolam em tocas quando ovígeras. Esses ambientes possuem características e condições ambientais distintas e consequentemente a disponibilidade e qualidade das presas (alimento) diferem durante o confinamento (FOYSAL *et al.*, 2022). Além disso, mudanças nas comunidades microbianas intestinais podem seguir um padrão temporal, que ocorre devido a mudanças temporais na disponibilidade de alimentos, os componentes exatos para essas dinâmicas ainda precisam ser elucidados (MEZITI *et al.*, 2010).

Foi possível perceber uma nova classe de pesquisas surgindo em relação a esse tipo de estudo, que consiste na preocupação com as possíveis mudanças na microbiota de lagostas pela ingestão ou exposição aos microplásticos e/ou nanoplásticos. O que pôde ser verificado a partir dos estudos de Cheng *et al.* (2022) e Guillén-Watson *et al.* (2023).

Do levantamento realizado, pode ser concluído que a microbiota do intestino, hepatopâncreas e hemolinfa de lagostas e lagostins é diversa e que algumas variações podem ocorrer por diversos motivos, como infecções acometidas ao indivíduo, estresses causados por mudanças no ambiente, disponibilidade e qualidade dos alimentos, época do ano, estágio de desenvolvimento e sexo das lagostas, entre outros aspectos. A presente revisão detectou um número razoável de estudos relacionados à microbiota natural das lagostas no mundo. No entanto, esses estudos ocorreram apenas em alguns países e nenhum deles foi realizado no Brasil. Assim, é fundamental padronizar técnicas de análise que permitam comparações entre a microbiota de espécies geograficamente separadas e uma abordagem global multiespecializada que possa usar essas informações como potenciais indicadores para avaliação da saúde das lagostas, manejo de estoques pesqueiros e construção de bases tecnológicas para aprimoramento das técnicas de cultivo desses animais como estratégia para driblar a superexploração dos recursos pesqueiros que já ocorre em muitos países exportadores.

4 HIPÓTESE

Existem variações na bacteriota nos diferentes estratos anatômicos das lagostas e há diferenças ao comparar as duas espécies de lagostas espinhosas exploradas pela pesca cearense.

5 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa é quantificar, avaliar, identificar e caracterizar a microbiota bacteriana do intestino, do hepatopâncreas e da hemolinfa de lagostas espinhosas exploradas pela pesca cearense.

5.1 Objetivos específicos

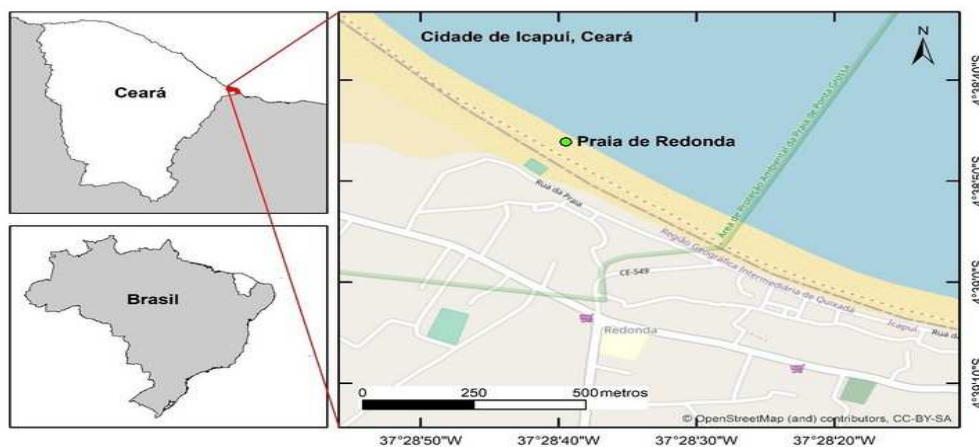
- Realizar a quantificação de grupos bacterianos no sistema gastrointestinal, hepatopâncreas e hemolinfa de lagostas espinhosas;
- Identificar e caracterizar bactérias presentes nas lagostas espinhosas das espécies *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*;
- Caracterizar espécies de víbrios dominantes nas lagostas analisadas.
- Verificar a diversidade e possíveis diferenças na microbiota das espécies investigadas;
- Investigar o perfil enzimático das cepas analisadas;

6 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do presente estudo, foi realizada uma coleta na comunidade da praia de Redonda (04°39'000"S: 037°28'480"W), situada no município de Icapuí, no extremo leste do estado do Ceará, a aproximadamente 200 km de Fortaleza (Figura 8). Esse município fica limitado ao norte pelo Oceano Atlântico, ao sul e a oeste pelo município de Aracati e a leste pelo estado do Rio Grande do Norte. Possui cerca de 64 km de extensão litorânea, aproximadamente 19 mil habitantes e aproximadamente 430 km² de área total, representando 0,29% do território do estado do Ceará.

Foram coletados vinte indivíduos, dez deles pertencentes à espécie *Panulirus argus* e o restante pertencente a espécie *Panulirus laevicauda*. Os animais foram acondicionados em reservatórios contendo água do mar, mantidos vivos por um dia após captura, para posterior análise.

Figura 8 - Localização de Redonda, comunidade pesqueira onde foi realizado o estudo.



Fonte: AUTORA, 2023.

6.1 Procedimentos realizados em campo

Para a caracterização bacteriana, foi realizada uma coleta nos dias 15 e 16 do mês de outubro do ano de 2019. As lagostas sofreram insensibilização em choque térmico, evitando assim o sofrimento do animal. Todos os indivíduos foram medidos e pesados.

Posteriormente, foi feita a extração da hemolinfa, do hepatopâncreas e do intestino. A hemolinfa foi extraída da glândula aorta, com ajuda de uma seringa (EVANS, 2003) (Figura 9). Foi utilizado uma solução de citrato de sódio (10%) como anticoagulante, na proporção de 1:1 (hemolinfa/anticoagulante) para conservação do material (RODRÍGUEZ-

RAMOS, 2011). Os animais foram dissecados utilizando tesouras e pinças estéreis e durante este procedimento houve a retirada do intestino e do hepatopâncreas para posterior análise da microbiota destes tecidos (MEZITI *et al.*, 2010) (Figura 10).

Figura 9 - Procedimento de extração da hemolinfa de uma lagosta *Panulirus laevicauda*.



Fonte: AUTORA, 2019.

Figura 10 - Dissecação de lagosta *P. argus*, com observação do intestino na região abdominal.



Fonte: AUTORA, 2019.

6.2 Procedimentos em laboratório

Em laboratório, para realização das análises microbiológicas, as amostras foram divididas em tratamentos, por estratos anatômicos: cepas pertencentes ao hepatopâncreas; cepas encontradas na hemolinfa; cepas do intestino (microbiota transitória e residente). Essa

divisão foi utilizada para as duas espécies de lagostas e realizadas separadamente, utilizando meio ágar PCA para hepatopâncreas e intestino, e ágar marinho para hemolinfa, no cultivo de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) para cultivar vibrios foi utilizado ágar TCBS em todos os estratos anatômicos, totalizando 16 tratamentos (Quadro 2).

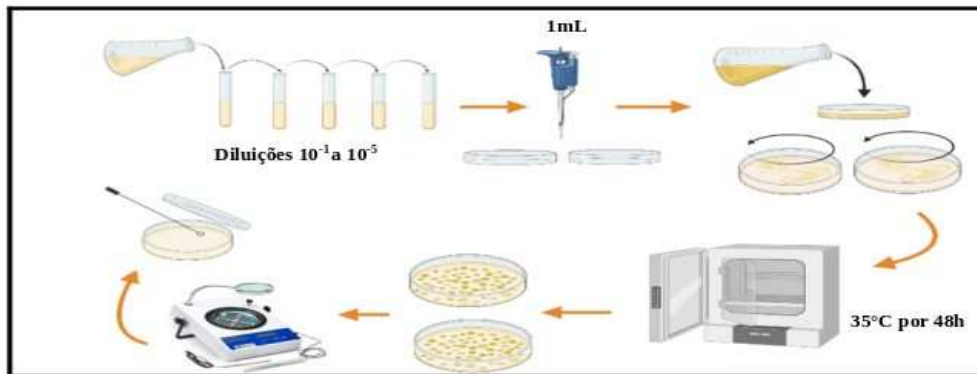
Quadro 2- Divisão dos tratamentos para realização das análises microbiológicas.

ESPÉCIES ESTUDADAS	ESTRATOS ANATÔMICOS	MEIO DE CULTIVO	SIGLA TRATAMENTO
<i>Panulirus laevicauda</i>	Hemolinfa	ÁGAR MARINHO	HPL
		TCBS	VHPL
	Hepatopâncreas	PCA	HPPL
		TCBS	VHPPL
	Intestino (microbiota transitória)	PCA	ITPL
		TCBS	VITPL
	Intestino (microbiota residente)	PCA	IRPL
		TCBS	VIPPL
<i>Panulirus argus</i>	Hemolinfa	ÁGAR MARINHO	HPA
		TCBS	VHPA
	Hepatopâncreas	PCA	HPPA
		TCBS	VHPPA
	Intestino (microbiota transitória)	PCA	ITPA
		TCBS	VITPA
	Intestino (microbiota residente)	PCA	IRPA
		TCBS	VIPPA

Fonte: AUTORA, 2023.

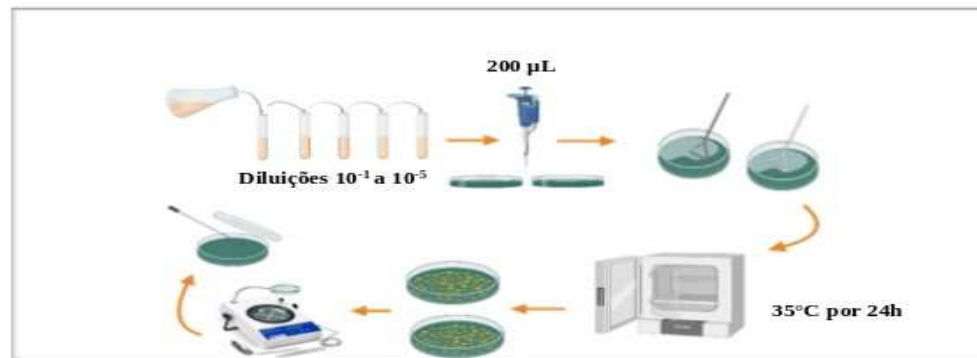
O material biológico de cada estrato foi reunido para formar uma amostra composta, quais foram homogeneizadas e diluídas em água do mar com salinidade ajustada para 10 g.L⁻¹ para bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e água peptonada alcalina (APA) para o isolamento de espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*. Foram feitas diluições seriadas até 10⁻⁵. Posteriormente, para o cultivo de BHCs foram realizadas as técnicas de *Pour Plate* (Figura 11) e para víbrio o método de *Spread Plate* (Figura 12), procedimento realizado em duplicata. Logo após, foi feita a incubação, em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas, no caso dos vibrios e 48 horas para BHC.

Figura 11 - Fluxograma de análise microbiológica, utilizando a técnica *Pour Plate*, para quantificação de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC).



Fonte: AUTORA, 2021.

Figura 12 - Fluxograma de análise microbiológica, utilizando a técnica *Spread Plate*, para quantificação de Vibrios.



Fonte: AUTORA, 2021.

Nos tratamentos ITPL, IRPL e HPPL, nas diluições 10⁻⁵, das BHCs as placas foram lavadas com 9 mL de salina a 10 ppm e novamente plaqueadas. Esse procedimento foi realizado devido ao elevado crescimento de colônias, o que impossibilitou a contagem. Os isolamentos das colônias somente foram possíveis a partir do novo plaqueamento. Portanto, as contagens foram realizadas apenas nos tratamentos em que não foi necessário o procedimento de lavagem.

6.2.1 Contagem Padrão em Placas (CPP) – bactérias heterotróficas cultiváveis

A quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis foi realizada a partir da Contagem Padrão em Placas (CPP). Para quantificação foi utilizada a média das cepas contadas em cada placa (duplicata), multiplicado pelo fator de correção, multiplicado pelo inverso da diluição escolhida (VIEIRA; TORRES, 2004).

6.2.2 Contagem Padrão em Placas (CPP) – bactérias do gênero *Vibrio*

A quantificação de bactérias presuntivamente pertencentes ao gênero *Vibrio* foi realizada por meio da técnica de CPP. As colônias crescidas em TCBS foram contadas diferenciando as cepas sacarose positiva (cor amarela) e sacarose negativa (cor verde).

6.2.3 Seleção e isolamento das colônias

A escolha e isolamento das colônias foram realizadas buscando encontrar a maior diversidade de microrganismos, para isso buscou-se as colônias de tamanhos, cores e formatos distintos.

6.2.4 Técnica de coloração em Gram

As bactérias isoladas de bactérias heterotróficas cultiváveis foram submetidas à técnica de coloração em Gram para caracterização das suas paredes celulares, a fim de classificar sua morfologia celular e comprovar a pureza das células, seguindo o protocolo detalhado por Levy (2004).

Para a caracterização fenotípicas das cepas bacterianas (bactérias heterotrófica cultiváveis e suspeitas do gênero *Vibrio*) foram realizados os seguintes testes: citocromo-oxidase, oxidante-fermentativo (OF), detecção de enzimas caseinase, elastase, gelatinase, lipase, fosfolipase, amilase, celulase e capacidade de produção de exopolissacarídeo.

6.2.5 Teste bioquímico: presença de citocromo-oxidase

O teste citocromo-oxidase foi utilizado para verificar a presença ou ausência da enzima citocromo-oxidase. Neste teste, utiliza-se substâncias (corantes) que agem como aceptadores artificiais de elétrons, que são oxidadas pelo sistema da citocromo-oxidase. O corante na sua forma reduzida não possui coloração e na sua forma oxidada é colorido, desse modo, a presença da enzima citocromo-oxidase é percebida pela geração da cor azul-púrpura (reação positiva) (SAHM; WEISSFELD, 2009).

As cepas BHCs e de *Vibrio* foram repicadas em ágar TSA 10 ppm e mantidas incubadas em estufa bacteriológica a 35° C por 24 horas. Após verificação da pureza das células, por meio do teste de coloração em Gram, uma pequena quantidade das culturas foi

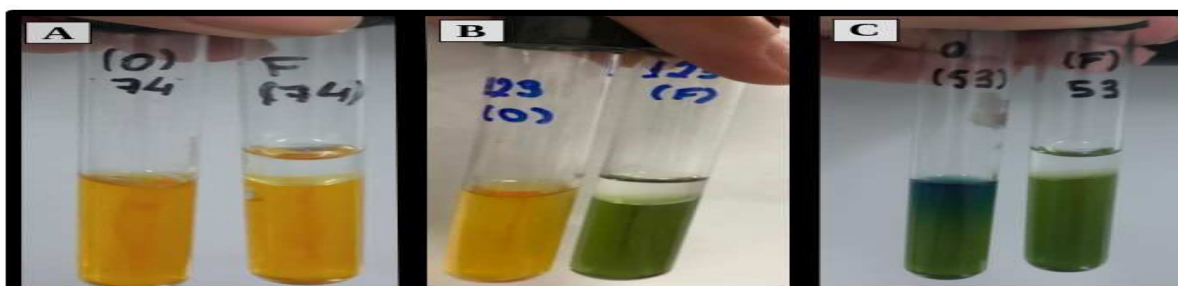
transferida para uma fita de oxidase adaptada (tiras de papel filtro foram esterilizadas e embebidas com solução aquosa a 1% de dicloridrato de N,N,N,N-tetrametil-para-fenilenodiamina) utilizando uma alça de platina, recomendada para evitar resultados falsos positivos, e em seguida foram verificadas as reações. O aparecimento da cor púrpura no intervalo de tempo de até um minuto garantiu a positividade do teste.

6.2.6 Teste bioquímico: viés metabólico para utilização da glicose (O/F)

O teste oxidativo-fermentativo da glicose (O/F) foi realizado com a finalidade de verificar se as cepas de BHCs e *Vibrio* estudadas possuíam metabolismo oxidativo e/ou fermentativo dos carboidratos. Esse método é considerado simples e eficiente para identificar bactérias que utilizam glicose na presença ou ausência de oxigênio, baseado na produção de ácido ao metabolizar a glicose (OLIVEIRA, 2000).

As cepas foram repicadas em ágar TSA 10 ppm e transferidas para estufa bacteriológica a 35° C por 24 horas, após verificação da pureza das células, por meio do teste de coloração em Gram, as cepas foram transferidas para tubos de baquelite contendo 4 mL de meio oxidativo-fermentativo da glicose. Cada cepa foi inoculada em dois tubos com as indicações “O” e “F”. No tubo “F”, após transferência da cultura para o ágar, foi colocado 1 mL de glicerol (tindalizado), a fim de promover um ambiente de anaerobiose. Esses tubos foram então incubados a 35° C por até cinco dias. Durante o processo de degradação da glicose a alta concentração de ácido produzido transformou o indicador azul de bromthymol em meio OF, de verde para amarelo, essa mudança de coloração confirmou a positividade do teste. Em alguns casos, a mudança de cor se deu de verde para azul, isso ocorreu porque as bactérias que quebram peptona, produziram aminas, o que aumenta o pH do meio (Figura 13 e Quadro 3).

Figura 13 - Teste oxidativo-fermentativo da glicose (OF). (A) bactéria com metabolismo fermentativo; (B) bactéria com metabolismo oxidativo; (C) bactéria não sacarolítica.



Fonte: AUTORA, 2023.

Quadro 3 - Interpretação do Teste de Oxidação-Fermentação da glicose.

Tubo aberto (aeróbico)	Tubo coberto (anaeróbico)	Metabolismo
ácido (amarelo)	alcalino (verde)	Oxidativo
ácido (amarelo)	ácido (amarelo)	Oxidativo/Fermentativo
alcalino (verde)	ácido (amarelo)	Fermentativo
alcalino (verde)	alcalino (verde)	Não sacarolítico (glicose não metabolizada)

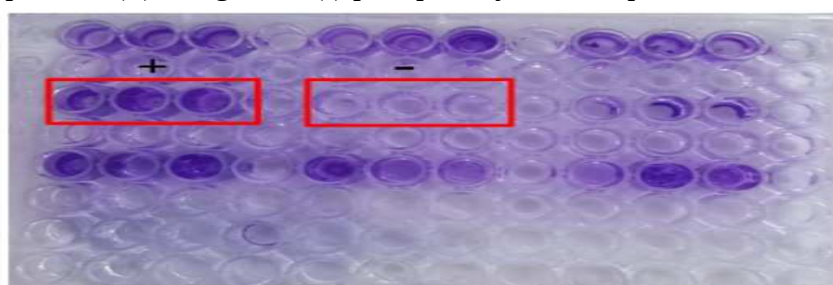
Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.7 Produção de exopolissacarídeo

Para a verificação de produção de exopolissacarídeo foi realizado o teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC). As cepas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo Brain Heart Infusion - BHI (infusão cérebro e coração) e incubadas por 24 horas à 35°C. Posteriormente, 200 µL desta suspensão bacteriana foi inoculada em placas de poliestireno de 96 poços estéreis, com fundo em formato de “U”. O teste foi realizado em triplicata. Após aplicação das cepas nos poços, as placas foram então colocadas em estufa em temperatura de 35°C, na qual permaneceram por 24 horas. Logo após o período de incubação, foi realizada a remoção dos inóculos, por meio da lavagem dos poços, utilizando 200 µL de água destilada estéril. Essa lavagem foi realizada três vezes para posterior secagem em estufa a 60°C por 1 h.

Logo após o período de secagem, foram adicionados aos poços 200 µL de solução de cristal violeta 1% por cerca de 1 minuto, em seguida foram feitas sucessivas lavagens com água destilada e por fim, a placa foi seca em temperatura ambiente. Os poços que continuaram com a coloração roxa após todos os processos de lavagem foram considerados positivos para produção de exopolissacarídeo. Esse teste foi adaptado a partir da metodologia descrita por Christensen *et al.* (1985) (Figura 14).

Figura 14 - Placa de poliestireno de 96 poços ilustrando cepa positiva (+) e negativas (-) para produção de exopolissacarídeo.



Fonte: AUTORA, 2022.

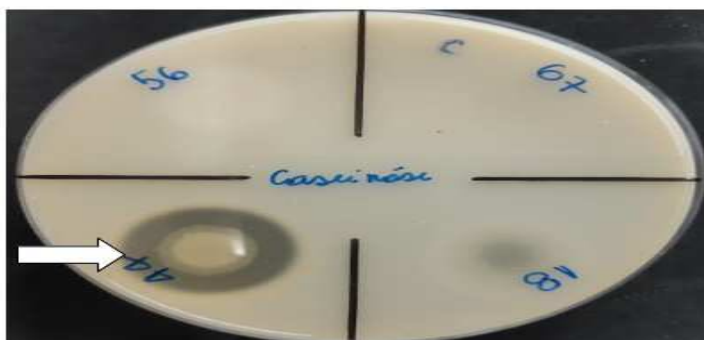
6.2.8 Atividade enzimática - Proteases (Caseinase, gelatinase, elastase)

Para detecção do perfil enzimático de proteases, foram realizados ensaios de caseinase, gelatinase e elastase. As cepas bacterianas foram repicadas em caldo BHI 10 ppm. Após incubação por 24 horas a 35°C, foram então inoculadas em placas de Petri descartáveis contendo os meios de cultura específicos para cada exoenzima.

6.2.8.1 Caseinase

Para a caseinase, a metodologia aplicada foi realizada de acordo com as indicações de Rodrigues *et al.* (1993), com alterações. Com auxílio de uma pipeta, 4 µL das culturas bacterianas foram aplicadas em placas contendo ágar nutriente adicionado de 5% de leite em pó desnatado. Essas placas foram então incubadas a 35° C por até 5 dias. A verificação do aparecimento de um halo translúcido ao redor do crescimento bacteriano foi o indicativo da positividade do teste (Figura 15).

Figura 15 - Verificação da positividade do teste de caseinase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano.

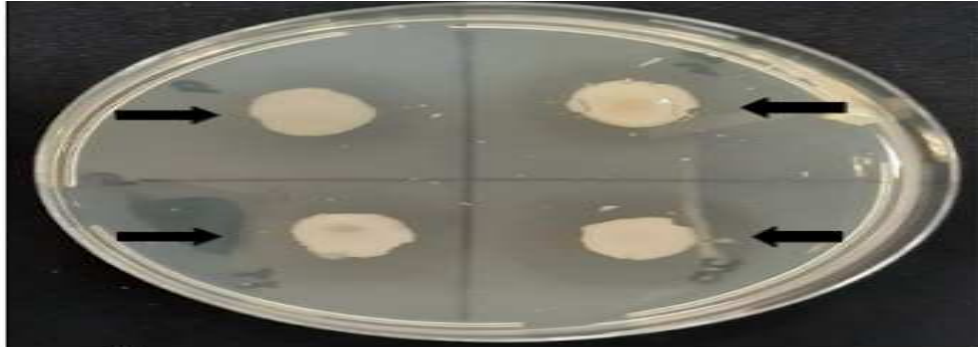


Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.8.2 Gelatinase

Para detecção da presença da enzima gelatinase, as cepas previamente crescidas em caldo BHI 10 ppm, foram transferidas (4 µL) para placas contendo meio ágar TSA, com adição de 0,5% de gelatina. Posteriormente ao procedimento de inoculação, as culturas foram incubadas a 35°C por até 7 dias. O aparecimento de halo translúcido ao redor das colônias após aplicação de 2 mL de solução saturada de sulfato de amônio como revelador foi averiguado nas culturas positivas (RODRIGUES *et al.*, 1993) (Figura 16).

Figura 16 - Verificação da positividade do teste de gelatinase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano.

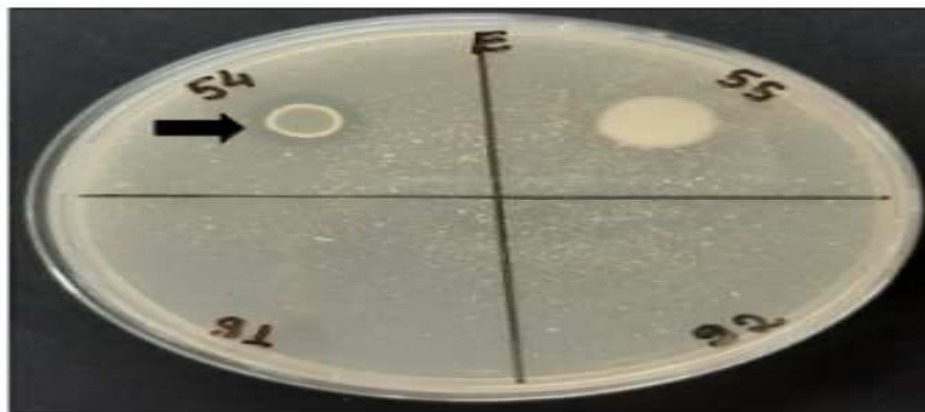


Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.8.3 Elastase

Para verificação da presença de elastase, 4 μ L das cepas inoculadas em caldo BHI foram aplicadas em placas compostas por uma camada inferior de 15 mL de caldo nutriente e ágar Noble (Difco) com adição de 5 mL de cobertura composta por caldo nutriente, ágar Noble e 0,3% de elastina. A positividade do teste foi verificada pelo aparecimento de um halo transparente ao redor das colônias, após incubação a 35°C por até 2 dias (RUST; MESSING; IGLEWSKI, 1994) (Figura 17).

Figura 17 - Verificação da positividade do teste de elastase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano.



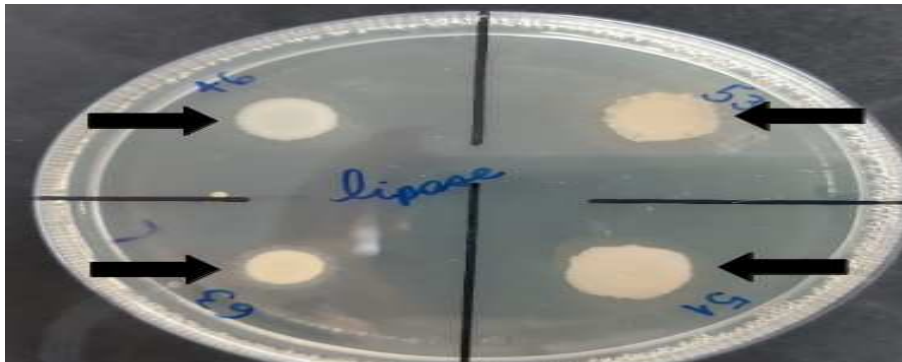
Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.9 Atividade enzimática – Lipase e fosfolipase

6.2.9.1 Lipase

Para a constatação da produção de lipase, as cepas previamente cultivadas em caldo BHI 10 ppm, foram inoculadas em placas contendo TSA enriquecido com 1% de *Tween* 80 e então incubadas por um período de tempo de 24 horas, em temperatura de 35°C. A formação de um halo opalescente em torno dos inóculos demonstrou a presença da enzima lipase (LIU; LEE; CHEN, 1996) (Figura 18).

Figura 18 - Verificação da positividade do teste de lipase representado pela formação de halo opalescente ao redor do inóculo bacteriano.

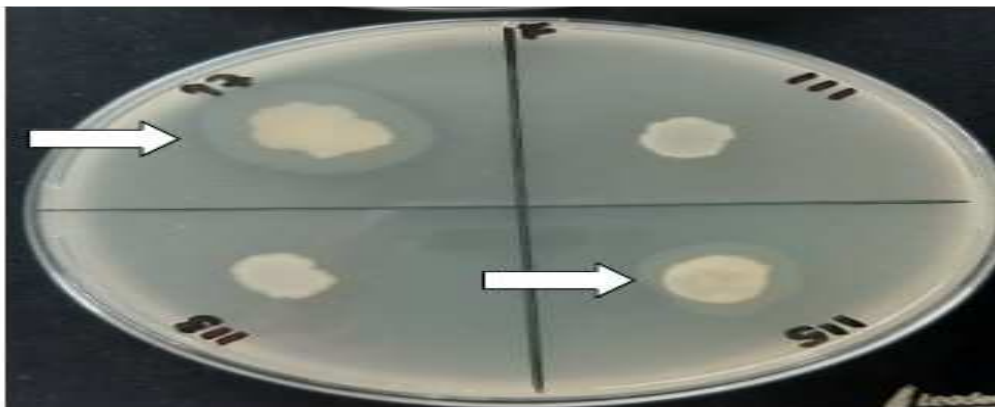


Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.9.2 Fosfolipase

A determinação da produção de fosfolipase foi realizada a partir dos inóculos em placas contendo TSA acrescido de 1% de emulsão de gema de ovo. A positividade desse teste foi dada pela presença de um halo opalescente em torno da cepa inoculada. Para esse teste, as placas foram incubadas por 24 horas, a 35°C, de acordo com as recomendações de Liu, Lee e Chen (1996), com modificações (Figura 19).

Figura 19 - Verificação da positividade do teste de fosfolipase representado pela formação de halo opalescente ao redor do inóculo bacteriano.



Fonte: AUTORA, 2023.

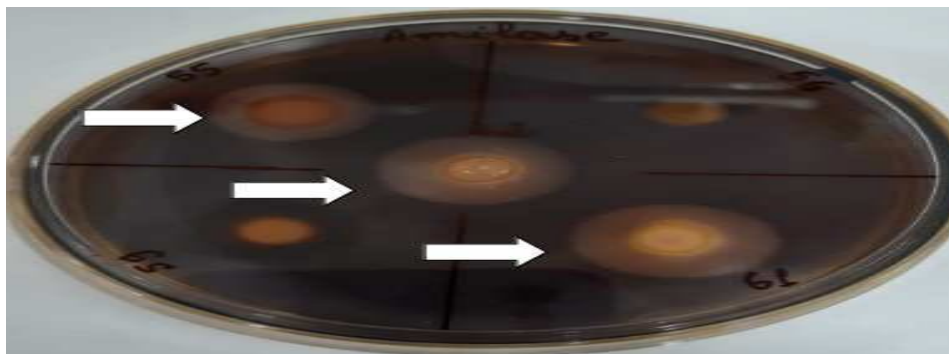
6.2.10 Atividade enzimática - Carboidrases (amilase, celulase)

Para determinação do perfil enzimático capaz de degradar carboidratos, foram realizados ensaios de amilase, celulase e quitinase. As cepas bacterianas foram repicadas em caldo BHI 10 ppm, após incubação por 24 horas, a 35°C foram então inoculadas em placas de Petri descartáveis contendo os meios de cultura específicos para cada exoenzima.

6.2.10.1 Amilase

A fim de constatar a presença de enzimas capazes de digerir amido, as cepas bacterianas foram cultivadas (4 µL) em placa de Petri com meio composto por ágar nutriente (AN-Difto) acrescido de 0,1% de amido solúvel. Após a inoculação, as placas passaram por incubação a 35°C por 24 horas, posteriormente, adicionou-se de 2 a 3 mL de solução de lugol 1% como revelador. A formação de um halo translúcido ao redor do inóculo constatou a positividade do teste. Essa metodologia foi utilizada de acordo com Rodrigues *et al.* (1993) (Figura 20).

Figura 20 - Verificação da positividade do teste de amilase representado pela formação de halo translúcido ao redor do inóculo bacteriano.



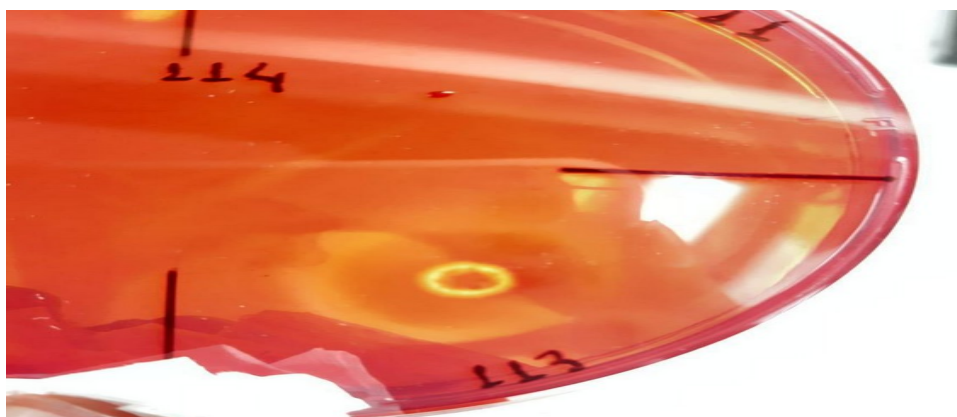
Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.10.2 Celulase

A fim de determinar a existência de enzimas digestivas celulases, seguiu-se o protocolo, relatado por Teather e Wood (1982) com adaptações. Quatro microlitros do inóculo foi transferido para placas contendo meio ágar carboximetilcelulose (CMC), preparado a partir de meio mineral (DIFTO *Bushnell-Haas Broth*), adicionado de 1% peso por volume (p/v) de carboximetilcelulose, acrescido de Ágar-ágar.

Ao fim do período de incubação (até 4 dias), foi adicionado de 2 a 3 mL de solução de vermelho congo à 1% nas placas, com intuito de revelar um halo na coloração alaranjada ao redor dos inóculos e desse modo verificando a positividade do teste (Figura 21).

Figura 21 - Verificação da positividade do teste de celulase representado pela formação de halo alaranjado ao redor do inóculo bacteriano.



Fonte: AUTORA, 2023.

6.2.11 Testes genotípicos

6.2.11.1 Extração de DNA total

Para que o DNA bacteriano fosse extraído, as cepas foram previamente inoculadas em ágar TSA 10 ppm e após incubação por 24 horas a 35°C, verificou-se suas purezas por meio da técnica de coloração de Gram e os inóculos puros foram então transferidos para tubos contendo caldo BHI 10 ppm e novamente incubados por 24 horas a 35°C.

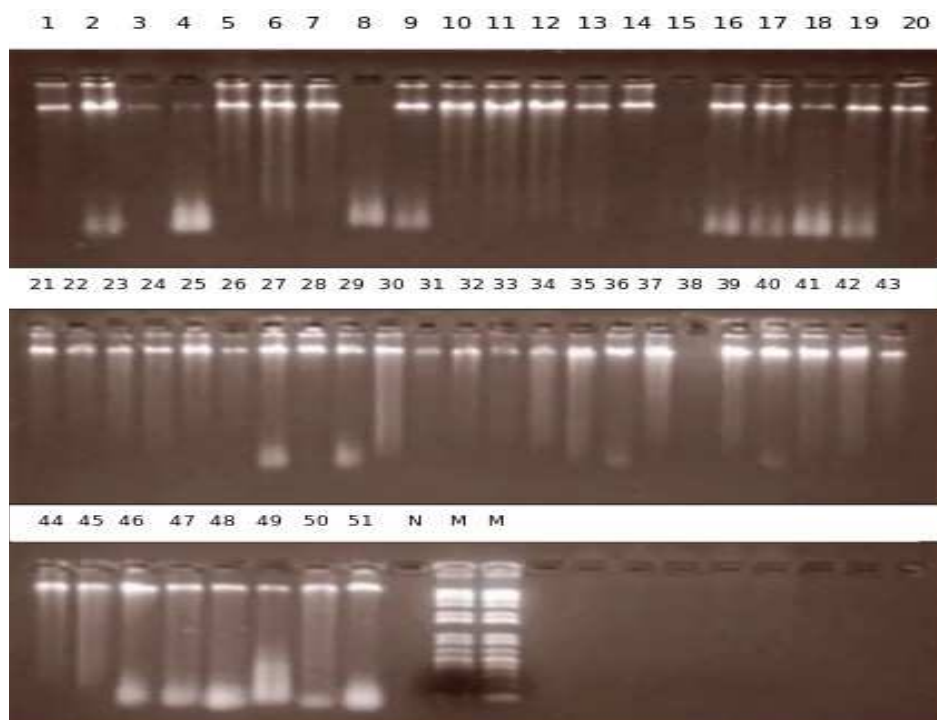
A técnica de extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e o protocolo de extração utilizado foi o fornecido pelo fabricante.

6.2.11.2 Eletroforese em gel de agarose

Para confirmação dos resultados da extração de DNA, a técnica de eletroforese em gel de agarose à 1% foi utilizada. Após a polimerização do gel, aplicou-se 2 µl do produto da extração de DNA juntamente com 3 µl de um mix de GelRed e BlueJuice. Tal procedimento ocorreu em voltagem de 70 V com corrente de 300 mA a uma potência de 120 W por 30

minutos. O produto da corrida foi documentado em um sistema de fotodocumentação digital (KODAK EDAS 900) (Figura 22).

Figura 22 - Imagem de foto documentação de extrações de DNA total de amostras de bactérias heterotróficas cultiváveis e víbrios analisadas.



Fonte: AUTORA (2019).

Os números indicam as amostras que foram extraídas, M= marcadores moleculares e N= controle negativo.

6.2.11.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após realização de extração de DNA e confirmação por gel de eletroforese, os perfis genéticos dos isolados foram obtidos por meio de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) (LANE, 1991).

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando primer universal (U968) e (L1401). A reação de PCR continha Tampão 10x, MgCl₂, dNTP, iniciadores, Taq polimerase, água ultrapura e DNA genômico.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador da marca *Applied Biosystems Life Technologies* da corporação *Thermo Fisher Scientific* utilizando as seguintes condições para termociclagem. Passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 52°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 8 minutos e redução a 4°C.

A avaliação do produto de PCR foi realizada por comparação visual a partir dos pares de base (pb) do DNA visualizados e pelas bandas do 1Kb ladder, por meio de eletroforese em de gel de agarose a 1%.

6.2.11.4 Sequenciamento genético e análise das amostras

Os produtos amplificados da região do DNA das bactérias foram purificados utilizando-se o *Pure Link Quick Purification Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o fragmento purificado foi clonado, com etapa de ligação no vetor plasmidial pela enzima T4 DNA ligase e inserção na bactéria *Escherichia coli* HT115 competente. Em seguida, as sequências adquiridas foram lidas por meio do método de sequenciamento de *Sanger* de segunda geração através de sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. O procedimento foi realizado utilizando o reagente BigDye™ Terminator v3.1 *Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*, em conformidade com as recomendações do fabricante. Por fim, as sequências foram analisadas e tratadas no software MEGA versão 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021) em que todas as amostras passaram por uma análise prévia das regiões senso e anti-senso, sendo submetidas ao alinhamento local (GenBank), por meio do algoritmo BLAST.

6.2.12 Análise estatísticas

A fim de verificar a normalidade dos dados, o teste de Shapiro-Wilk foi realizado. Para constatar a homocedasticidade/homogeneidade aplicou-se o teste de Bartlett. Após a verificação da normalidade ou não normalidade dos dados foram utilizadas análise de variância paramétrica através de Anova-one way e teste Tukey a posteriori e análise de variância não paramétrica através de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, respectivamente, com nível de significância de 5%. Para essas análises o *R Project for Statistical Computing* foi utilizado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Procedimento realizado em campo

Após as medições de todas as lagostas foi verificado que, de acordo com o Art. 7º da Portaria nº 221, de 8 de junho de 2021, da Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2021 – Tabela 2), todos os indivíduos estavam dentro dos tamanhos mínimos de captura exigidos (Tabela 3).

Tabela 2 - Tamanhos mínimos de captura de abdômen e cefalotórax das espécies *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*, de acordo com o Art. 7º da Portaria nº 221, de 8 de junho de 2021, da Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Espécie	Ano	Comprimento da abdômen (cm)	Comprimento do cefalotórax (cm)
Lagosta-vermelha (<i>Panulirus argus</i>)	2023	13	7,5
Lagosta-verde (<i>Panulirus laevicauda</i>)	2023	11	6,5

Fonte: BRASIL, 2021.

Tabela 3 - Medidas de peso e comprimento (cefalotórax e abdômen) das espécies e lagostas analisadas.

Espécie de lagosta	Peso (g)	Cefalotórax (cm)	Abdômen (cm)
<i>Panulirus argus</i>	353	7,4	13,6
	310	6,8	13,0
	360	7,3	13,6
	571	8,6	15,2
	567	8,6	15,4
	403	7,6	13,2
	406	7,6	14,4
	618	9,2	15,0
	401	7,3	14,2
	395	7,6	13,7
<i>Panulirus laevicauda</i>	435	7,9	14,6
	288	7,2	11,7
	473	8,7	13,3
	493	8,4	13,2
	389	7,4	13,9
	351	7,1	12,9
	474	7,9	15,1
	337	7,3	13,2
	447	8,0	13,3
	420	8,0	13,1

Fonte: AUTORA, 2023.

Esses tamanhos mínimos garantem que o animal é maduro e já se reproduziu pelo menos uma vez (SOARES e PERET, 1998a; SOARES e PERET, 1998b). Desse modo, pode-se inferir que todos os 20 animais analisados no presente estudo eram adultos.

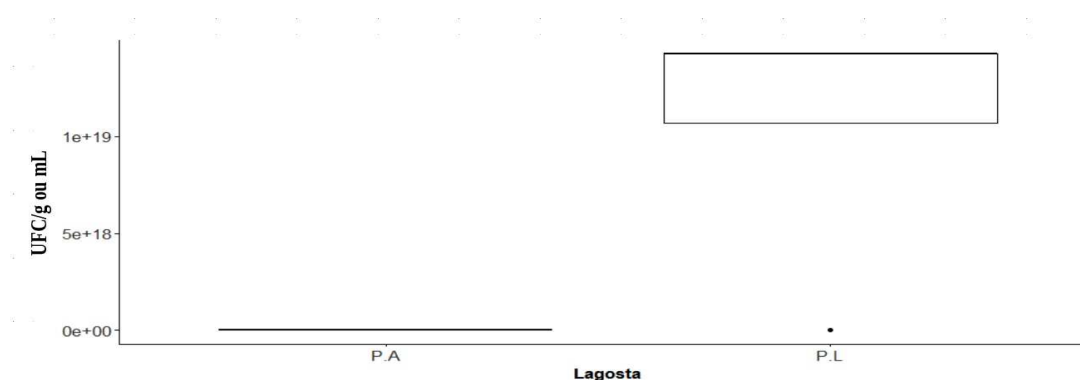
7.2 Procedimento em laboratório

7.2.1 Contagem Padrão em Placas (CPP) – BHCs

7.2.1.1 Comparação entre as duas espécies de lagostas

A partir dos 16 tratamentos realizados, fez-se as Contagens Padrão em Placas (CPP) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis, para as espécies *P. argus* e *P. laevicauda*. Os valores de BHCs obtidos nos diferentes estratos e espécies de lagostas foram comparados nos tratamentos onde foi possível a contagem. Assim, foram comparados os valores de BHCs nas hemolinfas, os demais foram estimados. De acordo com a análise houve diferença estatística na abundância de BHCs entre as duas espécies de lagosta. Uma maior abundância de microrganismos foi encontrada nas lagostas verdes (Figura 23, Tabela 4).

Figura 23 - Box Plot comparando a distribuição da abundância de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis em lagosta *P. argus* (P.A) e *P. laevicauda* (P.L) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers).



Fonte: AUTORA, 2023.

Tabela 4 - Contagem de UFC de bactérias heterotróficas cultiváveis em lagostas *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda* em quatro diferentes estratos anatômicos.

Contagem (PCA)	<i>Panulirus argus</i>	<i>Panulirus laevicauda</i>
	CPP (UFC)	CPP (UFC)
Hemolinfa	$2,48 \times 10^7$	$3,29 \times 10^8$
Hepatopâncreas	$1,50 \times 10^9$	Incontáveis
Intestino Residente	$3,95 \times 10^6$	Incontáveis
Intestino Transitório	$1,63 \times 10^9$	Incontáveis

Fonte: AUTORA, 2023.

Essa diferença quantitativa de grupos bacterianos cultiváveis das lagostas pode ter ocorrido devido ao *habitat* das espécies, que apesar de coexistirem numa mesma localização, divergem quando relacionadas a profundidade, pois as lagostas verdes pertencem a regiões mais rasas (região de maré até 50 metros) (SILVA *et al.*, 2008). A microbiota é regulada por diversos fatores físicos (luminosidade, temperatura, correntes, estratificação da coluna

d'água) e esse parâmetros podem ser limitantes para uma maior diversidade e abundância com o aumento da profundidade (CAVICCHIOLI, 2015).

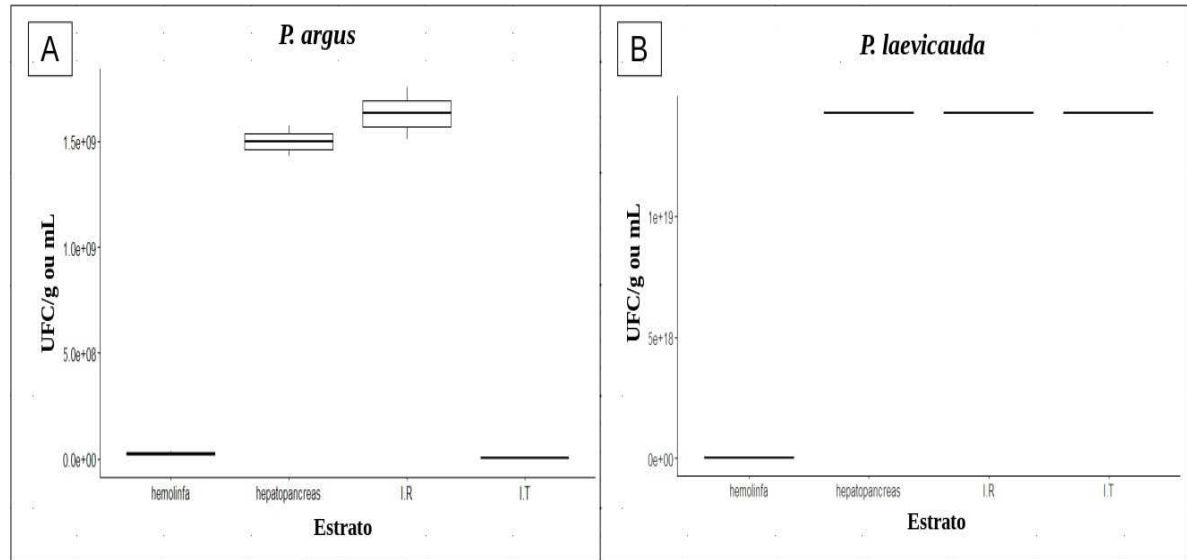
A técnica de contagem em placas apresenta limitações já discutidas na literatura, entretanto, é entendimento comum a sua validade para acompanhamento da abundância bacteriana em diferentes matrizes. Por tanto, a determinação da densidade populacional de bactérias cultiváveis nas lagostas, em duas diferentes espécies de grande importância econômica é justificada para fins comparativos e para fornecer informações valiosas para perspectivas futuras (HARRIS, 1993; AMANN *et al.*, 1995).

Os estudos referentes à comunidade bacteriana de lagosta, em sua maioria, se concentram no trato gastrointestinal. Outros poucos artigos descrevem a composição ou variação da microbiota na hemolinfa e hepatopâncreas desses crustáceos. As investigações envolvendo hepatopâncreas estão mais relacionadas a alterações nos aspectos histológicos (BASTI *et al.*, 2010; MEZITI *et al.*, 2010; MEZITI *et al.*, 2012; OOI *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020; ZAMORA-BRISEÑO *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; DRAGICEVIC *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021; XAVIER *et al.*, 2021; CHENG *et al.* 2022; XUE *et al.*, 2022; GUILLÉN-WATSON *et al.*, 2023).

7.2.1.2 Comparação entre os estratos anatômicos da lagosta *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*.

Ao investigar a microbiota bacteriana dos estratos anatômicos de *Panulirus argus* foi possível perceber que I.R. e hepatopâncreas foram os estratos com maior abundância, possuindo diferença estatística significativa da hemolinfa e do I.T (Figura 24 A). O microbioma de *Panulirus laevicauda* se comportou um pouco diferente, havendo maior abundância em I.R, I.T e hepatopâncreas com diferença estatística significativa para a hemolinfa (Figura 24 B). Em ambas espécies de lagosta, a hemolinfa estava entre os estratos com menor abundância (Figura 24 A-B).

Figura 24 - Box Plot comparando a distribuição da abundância de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis nos diferentes estratos de *P. argus* (A) e *P. laevicauda* (B) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers).



Fonte: AUTORA, 2023.

I.R significa microbiota residente do intestino e I.T microbiota transitória do intestino.

Sugita *et al.* (1987) ao estudar a microbiota de lagostas e caranguejos observaram que as contagens viáveis totais do conteúdo intestinal desses crustáceos variaram de 10^5 a 10^9 células por g^{-1} . Mathew e Joseph (2019), ao realizar Contagem Padrão em Placas (CPP) de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) no intestino de lagostas *Panulirus homarus* encontraram uma variação de 8×10^4 a $3,8 \times 10^6$ UFC/g. De acordo com Lein *et al.* (2022), a carga bacteriana presente no sistema digestivo das lagostas variou de 10^6 para 10^9 por grama de trato gastrointestinal. Todos esses resultados corroboraram com os achados no presente estudo para a lagosta *P. argus* e diante do que foi observado estima-se que a lagosta *P. laevicauda* possui maior abundância.

Hernández-Pérez e Söderhäll (2023), em seus estudos mostraram que as comunidades microbianas intestinais dos lagostins apresentaram elevada plasticidade e que essa abundância é fortemente influenciada pela alimentação, especialmente em ambiente de cultivo.

Dragičević *et al.* (2021), ao analisarem a comunidade bacteriana de tecidos de lagostins (exoesqueleto, hemolinfa, hepatopâncreas e intestino) de populações selvagens *Pacifastacus leniusculus*, em diferentes localizações, ao longo de um rio na Croácia, perceberam que a microbiota sofre influência pela expansão da área de distribuição dos lagostins. Como resultado, descobriram que o intestino estava entre os tecidos com menor riqueza. Hernández-Pérez *et al.* (2022) afirmaram que a composição e a disponibilidade dos

alimentos presente nos sedimentos de diferentes locais, hábitos detritívoros de lagostins, a competição por recursos e até mesmo a densidade de lagostas determinam a quantidade e variabilidade da comunidade microbiana no intestino desses crustáceos. Esses mesmos aspectos podem também influenciar a microbiota da hemolinfa, já que devido ao sistema circulatório aberto nos crustáceos, esses microrganismos podem facilmente serem carreados do intestino para a hemolinfa (HERNÁNDEZ-PÉREZ; SÖDERHÄLL, 2023).

Oxley *et al.* (2002) e Johnson *et al.* (2008) averiguaram que a parte anterior do intestino e o hepatopâncreas de camarões possuem densidades bacterianas menores quando comparados a porção posterior do intestino. Assim sendo, quantitativamente, o microbioma bacteriano no intestino de camarões não é igualmente distribuído. Tendo a região posterior do intestino abrangendo a maior abundância de bactérias. Tal fato ainda não foi esclarecido para as lagostas.

Zhang *et al.* (2018) ao analisarem a hemolinfa de caranguejos, camarões e ostras encontraram abundância de mais de $2,6 \times 10^4$ UFC/mL de células microbianas e esses indivíduos eram desprovidos de contaminação por hemócitos do hospedeiro. Portanto, concluíram que a hemolinfa desses crustáceos saudáveis abriga uma vasta abundância de microrganismos.

Segundo Bartlett *et al.* (2008) o elevado nível de bacteremia em lagostas pode ser associado à localização, época do ano, temperatura da água, altos níveis de poluição ou outras condições ambientais potencialmente imuno comprometedoras. Em seus estudos, a abundância elevada da microbiota da hemolinfa da lagosta *Homarus americanus* consistiu em padrões gerais de estresse e de mortalidade. Assim sendo, pode-se inferir que a baixa abundância de microrganismo encontradas na hemolinfa das espécies estudadas, quando comparada aos demais estratos, leva a crer que esses animais, no momento da análise, estavam em ambientes sem estresse aparente e estavam saudáveis.

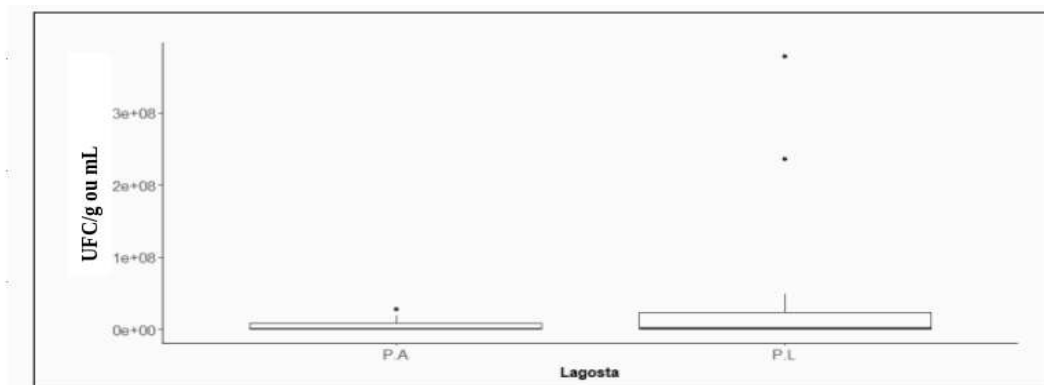
Crustáceos saudáveis podem abrigar uma variedade de bactérias na hemolinfa sem apresentar patologia sistêmica ou sinais clínicos associados. Esse fenômeno é denominado bacteremia assintomática (WANG *et al.*, 2015). Contudo, o estresse térmico pode ocasionar a disbiose do microbioma hemolinfático, levando a septicemia, como foi relatado em *Procambarus clarkii* (lagostim vermelho do pântano) por Scott e Thune (1986).

7.2.2 Contagem Padrão em Placas (CPP) – gênero *Vibrio*

7.2.2.1 Comparação da CPP total entre as duas espécies de lagostas

Ao comparar a contagem total de ambas espécies constatou-se não haver diferença significativa na abundância desse gênero. Mostrando que os vîbrios possuíam abundância relativa semelhante em lagostas vermelhas e verdes (Figura 25). Essa comparação foi realizada a partir das análises de CPPs das cepas de lagosta verdes e vermelhas (Tabela 5).

Figura 25 - Box Plot comparando a distribuição da abundância de bactérias de gênero *Vibrio* em lagosta *P. argus* (P.A) e *P. laevicauda* (P.L) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers).



Fonte: AUTORA, 2023.

Tabela 5 - Contagem Padrão em Placas (CPP) de cepas cultivadas em meio TCBS, de lagostas *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda* nos diferentes estratos.

Contagem	<i>Panulirus argus</i>			<i>Panulirus laevicauda</i>	
	(SAC)	CPP	TOTAL	CPP	TOTAL
Hemolinfa	+	1,15x10 ⁵ UFC/mL	1,15x10 ⁵ UFC/mL	3,07x10 ⁸ UFC/mL	3,08x10 ⁸ UFC/mL
	-	0		1,00x10 ⁶ UFC/mL	
Hepatopâncreas	+	5,53x10 ⁵ UFC/g	5,53x10 ⁵ UFC/g	2,98x10 ⁶ UFC/g	3,98x10 ⁶ UFC/g
	-	0		1,00x10 ⁶ UFC/g	
I.R.	+	5,93x10 ⁶ UFC/g	6,73x10 ⁶ UFC/g	1,85x10 ⁴ UFC/g	2,25x10 ⁴ UFC/g
	-	8,00x10 ⁵ UFC/g		4,00x10 ³ UFC/g	
I.T.	+	2,38x10 ⁷ UFC/g	3,20x10 ⁷ UFC/g	4,18x10 ⁷ UFC/g	5,86x10 ⁷ UFC/g
	-	8,25x10 ⁶ UFC/g		1,68x10 ⁷ UFC/g	

Fonte: AUTORA, 2023.

I.R significa microbiota residente do intestino e I.T microbiota transitória do intestino.

As bactérias do gênero *Vibrio* são amplamente dispostas no ambiente marinho. Por mais que diversas espécies sejam relatadas como agentes patogênicos em crustáceos, esse microrganismo é identificado como um dos mais importantes constituintes do microbioma natural desses animais (CHISTOSERDOV *et al.*, 2005; BATTISON *et al.*, 2008; BARTLETT

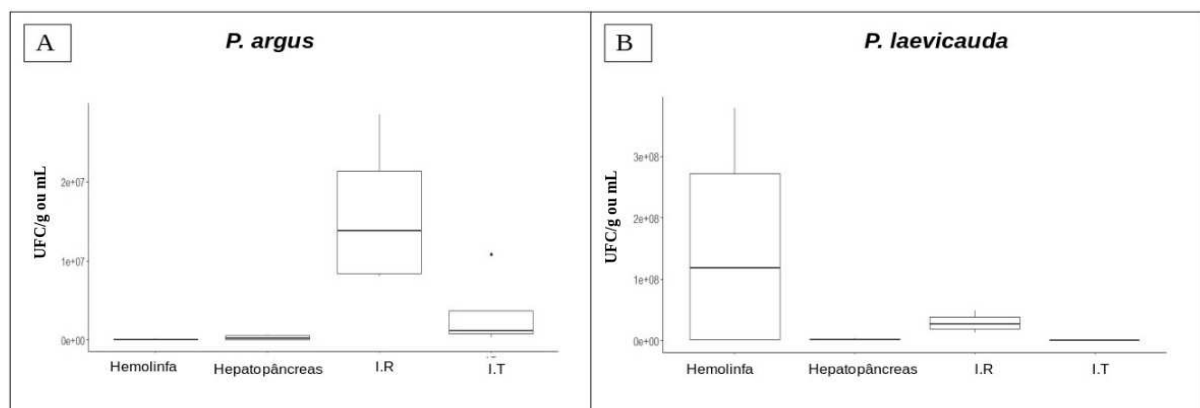
et al., 2008; OOI *et al.*, 2017; HOLT *et al.*, 2020; JUNG *et al.*, 2021; HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2022).

Nos crustáceos, *Vibrio* spp. habitam uma diversidade de órgãos e tecidos, como o hepatopâncreas, o intestino, a hemolinfa, o coração, os órgãos linfóides, o músculo somático, as brânquias, a carapaça e o músculo. Esse gênero de bactéria pode ser encontrado em todo o ciclo de vida desses animais (NOGA *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2004; BURGENTS *et al.*, 2005; URAKAWA; RIVERA 2006), sendo detectado nos órgãos de animais saudáveis, compondo a microbiota natural (KENNEDY *et al.*, 2006, CASTEX *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2019) e a detecção desses microrganismos não necessariamente significa uma eventual infecção (ZHENG *et al.*, 2017).

7.2.2.2 Comparação de CPP total entre os estratos anatômicos da lagosta *Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*

Ao examinar os estratos da *P. argus* verificou-se que houve uma diferença significativa na abundância de víbrio na microbiota residente do intestino (I.R) quando comparada ao hepatopâncreas e a hemolinfa, mas, não houve essa diferença significativa ao comparar com a microbiota transitória do intestino (I.T). Sendo os estratos I.R e I.T com maior contagem de víbrio. Porém, o mesmo não foi observado para *P. laevicauda*, não ocorrendo diferença entre os estratos (Figura 26 A-B).

Figura 26 - Box Plot comparando a distribuição da abundância de bactérias do gênero *Vibrio* nos diferentes estratos de *P. argus* (A) e *P. laevicauda* (B) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers).



Fonte: AUTORA, 2023.

I.R significa microbiota residente do intestino e I.T microbiota transitória do intestino.

Ueda *et al.* (1995), ao contrastarem o microbioma de lagostas com outros animais costeiros como gastrópodes, peixes e outros crustáceos, observaram que o gênero *Vibrio* foi dominante no trato gastrointestinal de todos esses indivíduos. Porém, distintas espécies desse microrganismo eram prevalentes nos diferentes tipos de animais. Assim sendo, os autores concluíram que a variedade dessa bactéria no trato intestinal desses animais pode ser específica.

Hernández-Pérez *et al.* (2022) em seus estudos encontraram *Vibrio* como um dos principais gêneros no intestino da lagostas *Pacifastacus leniusculus* e perceberam que ao expor esses animais a concentrações ambientalmente relevantes do antibiótico sulfametoxazol ocorreu um aumento de bactérias quitinolíticas, incluindo espécies de *Vibrio*.

Zhang *et al.* (2022), constataram que os quatro principais gêneros de bactérias no intestino de *Procambarus clarkii*, eram *Shewanella* (28,60–16,08%), *Vibrio* (19,45–5,98%), *Bacteroides* (13,28–6,45%) e *Aeromonas* (6,00–2,50%).

Ademais, Foysal (2023) a partir de uma meta-análise, buscou informações sobre as diferenças de composição microbiana a nível de gênero para encontrar bactérias intestinais centrais ou residentes e *Vibrio* foi o único gênero identificado em mais de 95% das amostras. Esse mesmo estudo revelou que há uma maior abundância de espécies em sistemas de cultivo de água doce, com a dominância de espécies de *Vibrio* quando comparados a ambientes de águas salgadas, no qual ocorre predominância de outros gêneros.

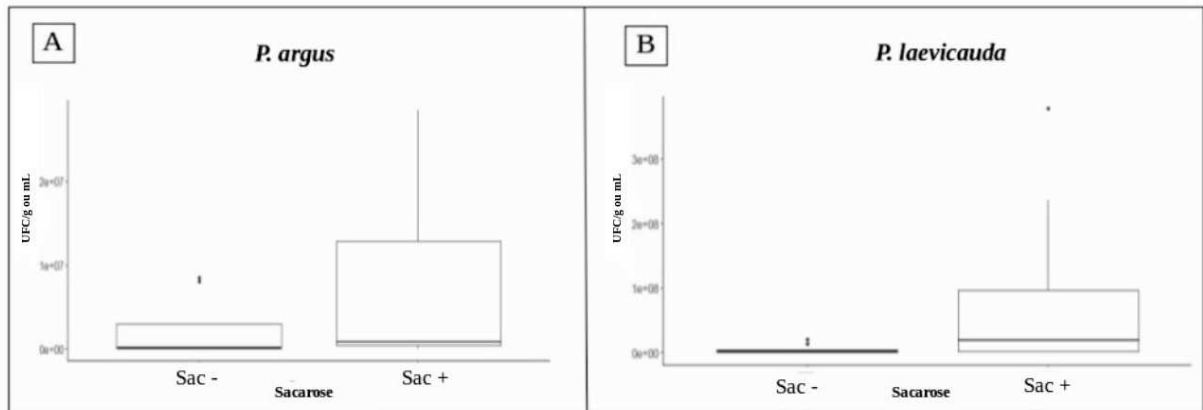
A cutícula de quitina que possui a porção posterior do intestino pode estar relacionada com a abundância desse gênero, uma vez que é apontada como importante substrato para aderência e colonização para essa bactéria (SOONTHORNCHA *et al.*, 2015).

A existência ou não de *Vibrio* spp. na hemolinfa não deve ser enxergada como fator decisivo utilizado como diagnóstico para indivíduos doentes ou saudáveis, pois as bactérias desse gênero colonizam normalmente o líquido corpóreo dos crustáceos. É possível notar que a quantidade de *Vibrios* cultiváveis nesse estrato diminui com o tempo, isso pode estar associado com efeitos bacteriostáticos mediados por peptídeos antimicrobianos (BURGENTS *et al.*, 2005).

7.2.2.3 Contagem diferencial de *Vibrio* de acordo com a utilização de sacarose

Ao fazer a comparação separadamente das cepas capazes de consumir sacarose (Sac+) das não capazes (Sac-) constatou-se que estatisticamente não ocorreu diferença significativa entre elas (Figura 27 A-B). O mesmo ocorreu ao comparar as duas espécies de lagostas estudadas.

Figura 27 - Box Plot comparando a distribuição da abundância de bactérias do gênero *Vibrio* de acordo com a utilização ou não de sacarose (Sac+) ou (Sac-) de *P. argus* (A) e *P. laevicauda* (B) por meio das medianas, mínimos, máximos e valores discrepantes (outliers).



Fonte: AUTORA, 2023.

Esses resultados diferem dos achados por Lima (2007), que encontrou uma maior quantidade de vibrio Sac+ em pós-larvas de camarões. De acordo com Menezes (2005), os criadores de camarão, geralmente, fazem uma correlação da quantidade de vibrios Sac+ e vibrios Sac- a fim de tentar evitar o surgimento de doenças. Porém, não há base científica comprovando essa relação, pois tanto as espécies positivas como negativas são causadoras de patogenicidade em animais aquáticos (VIEIRA *et al.*, 2000).

7.2.3 Seleção e isolamento das colônias

Cento e sessenta colônias foram isoladas, sendo escolhidas 10 colônias representando cada estrato anatômico das duas espécies de lagostas analisadas e crescidos em meio de cultivo não seletivo (BHCs) e seletivo para o gênero *Vibrio*.

Do total de cepas, cento e nove foram viáveis. Sendo cinquenta e oito bactérias heterotróficas cultiváveis: hemolinfa (5); hepatopâncreas (6); intestino - microbiota residente (10); intestino - microbiota transitória (8), pertencente a lagosta vermelha e hemolinfa (6); hepatopâncreas (6); intestino - microbiota residente (9); Intestino - microbiota transitória (8), relacionados a lagosta verde; e cinquenta e uma presuntivas para o gênero *Vibrio*: hemolinfa (5); hepatopâncreas (7); intestino - microbiota residente (6); intestino - microbiota transitória (6), pertencente a lagosta vermelha e hemolinfa (5); hepatopâncreas (5); intestino - microbiota residente (9); intestino - microbiota transitória (8), relacionados a lagosta verde.

7.2.4 Técnica de coloração em Gram

Todas as cepas foram submetidas a técnica de coloração em Gram e apenas duas delas pertencentes as Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs), originárias do hepatopâncreas das lagostas *P. laevicauda*, foram constatadas como bastonetes curtos, Gram positivas e com capacidade para esporular. Ademais, as estirpes estudadas variaram entre bastonetes curtos a médios, Gram negativos. Desse modo, ao comparar as cepas do grupo de BHCs, houve diferença significativa entre bactérias Gram positivas e negativas, havendo um domínio de bactérias Gram negativas nas duas espécies de lagostas estudadas (Tabela 6). Ao confrontar *P. argus* com *P. laevicauda*, não ocorreu diferença significativa em relação à morfologia de parede entre as bactérias isoladas nas duas espécies de lagosta.

Tabela 6 - Perfil da morfologia da parede celular (Gram) de Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) de lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)			Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. laevicauda</i> (lagosta verde)		
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Gram	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Gram
Hemolinfa	31	-	Hemolinfa	11	-
	32	-		14	-
	36	-		16	-
	37	-		18	-
	40	-		15	-
	∅	∅		20	-
Hepatopâncreas	72	-	Hepatopâncreas	51	-
	73	-		53	-
	74	-		54	+
	79	-		55	+
	77	-		56	-
	80	-		59	-
Microbiota residente do Intestino	111	-	Microbiota residente do Intestino	91	-
	112	-		92	-
	113	-		93	-
	114	-		94	-
	115	-		95	-
	116	-		97	-
	117	-		98	-
	118	-		100	-
	119	-		∅	∅
120	-	∅	∅		
Microbiota transitória do Intestino	151	-	Microbiota transitória do Intestino	131	-
	152	-		132	-
	153	-		133	-
	154	-		134	-
	157	-		136	-
	158	-		137	-
	159	-		138	-
	160	-		140	-
∅	∅	135	-		

Fonte: AUTORA, 2023.

Esse resultado corrobora com os achados da revisão sistemática do presente estudo, pois os principais gêneros encontrados revelaram que *Acinetobacter*, *Aeromonas*,

Candidatus Bacilloplasma, *Candidatus Hepatoplasma*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio* foram os mais encontrados em lagostas ao redor do mundo. Desses achados, apenas os gêneros *Candidatus Bacilloplasma* e *Candidatus Hepatoplasma* não são Gram negativos.

De acordo com Moss *et al.* (2000), a qualidade do ambiente pode ter interferência na abundância de bactérias no intestino de camarões *L. vannamei*, pois em seus estudos perceberam uma menor contagem de bactérias aeróbias, Gram negativas em intestinos de animais criados em ambiente eutróficos em comparação com animais criados em ambiente oligotrófico.

7.2.5 Testes bioquímicos: presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) - BHCs

Ao fazer a análise da existência de citocromo-oxidase em BHCs, não se observou supremacia dessa enzima nas cepas das lagostas vermelhas. O hepatopâncreas dessa espécie de crustáceo apresentou cinco cepas oxidase negativa e apenas uma oxidase positiva, nos demais estratos as cepas eram (O+) (Tabela 7).

Houve dominância significativa de (O+) nas cepas das lagostas verdes. Apenas uma cepa, originária do hepatopâncreas, não possuía citocromo-oxidase. Essas enzimas são componentes da cadeia de conversão de energia que catalisa a redução do oxigênio em água e, portanto, são necessárias para a síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) (KADENBACH, 2018). Portanto, ao comparar o hepatopâncreas das duas espécies de lagosta, o presente estudo sugere que nesse estrato as bactérias das lagostas verdes possam ter uma maior produção de ATP para gastos energéticos (Tabela 7).

Um total de 47 (81%) cepas BHCs isoladas, independentemente de estrato anatômico ou da espécie de lagosta, possuía a capacidade de usar a glicose tanto pela via oxidativa como pela fermentativa, sendo portanto microrganismos anaeróbios facultativos (HUGH e LEIFSON, 1953). Ao fazer uma comparação entre as espécies de lagosta é notória a predominância dessa capacidade no microbioma de *P. argus*, pois apenas duas cepas originárias da microbiota residente do intestino dessa lagosta não possuía capacidade de utilizar glicose. A bacteriota do hepatopâncreas de *P. laevicauda* foi composto por cinco cepas não utilizadoras de glicose e apenas uma cepa capaz de utilizar a glicose pelas vias oxidativa e fermentativa (Tabela 7).

Tabela 7 - Perfil bioquímico a partir do teste da presença da enzima citocromo-oxidase e teste para análise do viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) em Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) em lagostas *P. argus* e *P. laevicauda*, em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)				Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. laevicauda</i> (lagosta verde)			
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Citocromo oxidase	Oxidativo/fermentativo de glicose (O/F)	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Citocromo oxidase	Oxidativo/fermentativo de glicose (O/F)
Hemolinfa	31	+	O+F	Hemolinfa	11	+	O+F
	32	+	O+F		14	+	O+F
	36	+	O+F		16	+	O+F
	37	+	O+F		18	+	O
	40	+	O+F		15	+	O+F
	∅	∅	∅		20	+	O
Hepatopâncreas	72	-	O+F	Hepatopâncreas	51	+	ND (A)
	73	-	O+F		53	+	ND (A)
	74	-	O+F		54	+	ND
	79	+	O+F		55	-	ND
	77	-	O+F		56	+	ND
	80	-	O+F		59	+	O+F
Microbiota residente do Intestino	111	+	O+F	Microbiota residente do Intestino	91	+	O+F
	112	+	O+F		92	+	O+F
	113	+	O+F		93	+	ND (A)
	114	+	O+F		94	+	O+F
	115	+	O+F		95	+	O+F
	116	+	O+F		97	+	O+F
	117	+	O+F		98	+	O
	118	+	O+F		100	+	O+F
	119	+	O+F		∅	∅	∅
	120	+	O+F		∅	∅	∅
Microbiota transitória do Intestino	151	+	O+F	Microbiota transitória do Intestino	131	+	O+F
	152	+	ND (A)		132	+	O+F
	153	+	ND (A)		133	+	O+F
	154	+	O+F		134	+	O+F
	157	+	O+F		136	+	O+F
	158	+	O+F		137	+	O+F
	159	+	O+F		138	+	O+F
	160	+	O+F		140	+	O+F
	∅	∅	∅		135	+	O+F

Para o teste oxidativo-fermentativo de glicose (O/F): O+F= cepas oxidativa e fermentativa; ND= cepas não degradadoras de glicose; ND (A) = não degradadora com produção de amina; O= oxidativa.

Fonte: AUTORA, 2023.

Tirloni *et al.* (2016), ao analisar lagostas *Homarus americanus* verificaram que 43,1% das cepas retiradas do músculo, brânquias e intestino desses animais eram anaeróbias facultativas, enquanto 56,9% restantes eram aeróbias.

De acordo com o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (STALEY *et al.*, 2005) bactéria Gram negativa, oxidase positiva e anaeróbias facultativas podem pertencer aos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*. Esses dois gêneros foram dominantes na lagosta vermelha. Já em *P. laevicauda* é possível notar uma maior variedade de microrganismos em relação a capacidade de degradação da glicose, havendo além de bactérias capazes de oxidar e fermentar, microrganismos apenas oxidativos e também indivíduos não utilizadores desse carboidrato.

7.2.6 Produção de exopolissacarídeo – BHCs

Ao investigar a produção de exopolissacarídeo em bactérias heterotróficas cultiváveis de forma geral, foi perceptível a hegemonia de microrganismos com essa capacidade (47 cepas - 81%). Porém, ao analisar a espécie *P. argus*, a microbiota residente do intestino possuía uma microbiota composta por nove cepas não capazes de produzir exopolissacarídeo (-) e uma única com essa capacidade (+). Nos demais estratos todas as cepas tinham essa aptidão (Tabela 8).

Para *P. laevicauda*, as cepas produtoras de exopolissacarídeo eram predominantes em sua microbiota, independentemente de estrato anatômico. Apenas uma cepa originária do hepatopâncreas e uma advinda da hemolinfa eram inaptas a produção de exopolissacarídeo (Tabela 8).

Tabela 8 - Perfil da produção de exopolissacarídeo em Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) de lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)			Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. laevicauda</i> (lagosta verde)		
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Produção de exopolissacarídeos	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Produção de exopolissacarídeos
Hemolinfa	31	+	Hemolinfa	11	+
	32	+		14	+
	36	+		16	+
	37	+		18	+
	40	+		15	+
	Ø	Ø		20	-
Hepatopâncreas	72	+	Hepatopâncreas	51	+
	73	+		53	+
	74	+		54	+
	79	+		55	-
	77	+		56	+
	80	+		59	+
Microbiota residente do Intestino	111	-	Microbiota residente do Intestino	91	+
	112	-		92	+
	113	-		93	+
	114	-		94	+
	115	-		95	+
	116	-		97	+
	117	-		98	+
	118	-		100	+
	119	-		Ø	Ø
	120	+		Ø	Ø
Microbiota transitória do Intestino	151	+	Microbiota transitória do Intestino	131	+
	152	+		132	+
	153	+		133	+
	154	+		134	+
	157	+		136	+
	158	+		137	+
	159	+		138	+
	160	+		140	+
	Ø	Ø		135	+

Fonte: AUTORA, 2023.

A formação de exopolissacarídeo é um processo dinâmico. Inicialmente, as bactérias se organizam em microcolônias e por meio de divisão celular e/ou recrutamento de outras células esses microrganismos crescem e revestem-se numa matriz extracelular. No interior desta matriz podem ser formadas organizações complexas que facilitam a absorção de nutrientes (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; TOUTAIN *et al.*, 2004)

As bactérias com habilidade de formar biofilme têm menos chances de serem expulsas e desse modo podem ter um papel protetor da microbiota saudável, por meio da produção de compostos inibitórios, competição por nutrientes e locais de adesão e proteção contra agentes patogênicos, em superfícies como pele, brânquias e trato gastrointestinal (GRZEŚKOWIAK *et al.*, 2012).

Whitten *et al.* (2014) compararam as comunidades de biofilmes bacterianos de duas espécies de lagosta (*Homarus gammarus* e *H. americanus*), de indivíduos saudáveis e portadores de doenças na carapaça. Esse estudo revelou abundância e diversidade nas comunidades dos biofilmes na superfície de bactérias doentes e saudáveis. Meres *et al.* (2012) ao estudarem lagostas com doenças epizoóticas na carapaça identificaram que mudanças disbióticas no biofilme microbiano da carapaça desempenhou função essencial na etiologia da doença. Os resultados desse estudo indicaram que as lesões avaliadas estavam relacionadas com um componente polimicrobiano ao invés de serem ocasionadas por um agente patogênico discreto.

7.2.7 Testes bioquímicos: confirmação de presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) do gênero *Vibrio*

Todas as cepas analisadas eram Gram negativas. A partir dos testes bioquímicos para confirmação de presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F), constatou-se que das 24 cepas analisadas 18 eram oxidase positiva e anaeróbias facultativas em *P. argus*, enquanto das 27 bactérias investigadas 17 possuíam essas duas principais características do gênero *Vibrio* em *P. laevicauda*. Além disso, foi possível encontrar microrganismos incapazes de degradar glicose em *P. argus* e *P. laevicauda*. Somente a lagosta verde apresentou indivíduos apenas oxidativos para esse carboidrato. Acredita-se que as cepas que não apresentaram enzima citocromo-oxidase e que não foram capazes de utilizar a glicose pelas duas vias metabólicas sejam outros gêneros de bactérias (Tabela 9).

Tabela 9 - Testes bioquímicos: confirmação de presença de citocromo-oxidase e viés metabólico pela utilização da glicose (O/F) do gênero *Vibrio* nas lagostas *P. argus* e *P. laeviscauda*, em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias presuntivas do gênero <i>Vibrio</i> advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)				Bactérias presuntivas do gênero <i>Vibrio</i> advindas de <i>P. laeviscauda</i> (lagosta verde)			
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Citocromo oxidase	Oxidativo/fermentativo de glicose (O/F)	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Citocromo oxidase	Oxidativo/fermentativo de glicose (O/F)
Hemolinfa	21	+	O+F	Hemolinfa	2	+	O+F
	24	-	ND		3	+	ND
	25	+	O+F		4	-	O+F
	26	+	O+F		8	+	O+F
	27	+	O+F		9	+	O+F
Hepatopâncreas	61	+	O+F	Hepatopâncreas	43	+	O+F
	62	+	O+F		44	+	O+F
	63	+	ND		46	+	O+F
	64	+	O+F		48	-	O+F
	66	+	O+F		49	+	O+F
	67	+	O+F		Ø	Ø	Ø
	69	+	O+F		Ø	Ø	Ø
Microbiota residente do Intestino	101	+	O+F	Microbiota residente do Intestino	81	+	O
	102	+	O+F		82	+	ND
	103	+	O+F		83	+	ND
	104	+	ND		85	+	O+F
	109	+	ND		86	-	ND
	110	+	O+F		87	+	O+F
	Ø	Ø	Ø		88	+	O+F
	Ø	Ø	Ø		89	+	F
	Ø	Ø	Ø		90	+	O+F
Microbiota transitória do Intestino	142	+	O+F	Microbiota transitória do Intestino	121	+	O+F
	143	-	ND		122	+	O+F
	145	+	O+F		124	+	ND
	147	+	O+F		125	+	O+F
	148	+	ND		126	+	O+F
	149	+	O+F		127	+	O+F
	Ø	Ø	Ø		129	+	F
	Ø	Ø	Ø		130	+	O+F

Fonte: AUTORA, 2023.

Para o teste oxidativo-fermentativo de glicose (O/F): O+F= cepas oxidativa e fermentativa; ND= cepas não degradadoras de glicose; ND (A) = não degradadora com produção de amina; O= oxidativa.

7.2.8 Produção de exopolissacarídeo – gênero *Vibrio*

As cepas obtidas a partir do meio seletivo para víbrios não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as bactérias produtoras de exopolissacarídeo (+) e as não produtoras (-) em nenhuma das duas espécies de lagosta estudadas. Ao analisar os estratos separadamente em *P. argus* e *P. laeviscauda* é possível perceber que a microbiota da

hemolinfa, do hepatopâncreas e do intestino residente eram compostas pela maioria das cepas formadoras desses agregados, com destaque para o hepatopâncreas e I.R em *P. laevicauda* com 100% das cepas produtoras de exopolissacarídeo (Tabela 10).

Tabela 10 - Perfil da produção de exopolissacarídeo em bactéria do gênero *Vibrio* de lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias presuntivas do gênero <i>Vibrio</i> advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)			Bactérias presuntivas do gênero <i>Vibrio</i> advindas de <i>P. laevicauda</i> (lagosta verde)		
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Produção de exopolissacarídeo	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Produção de exopolissacarídeo
Hemolinfa	21	-	Hemolinfa	2	+
	24	+		3	-
	25	+		4	+
	26	+		8	+
	27	-		9	+
Hepatopâncreas	61	-	Hepatopâncreas	43	+
	62	+		44	+
	63	+		46	+
	64	+		48	+
	66	+		49	+
	67	+		Ø	Ø
	69	+		Ø	Ø
Microbiota residente do Intestino	101	+	Microbiota residente do Intestino	81	+
	102	+		82	+
	103	-		83	+
	104	-		85	+
	109	+		86	+
	110	+		87	+
	Ø	Ø		88	+
	Ø	Ø		89	+
	Ø	Ø		90	+
Microbiota transitória do Intestino	142	+	Microbiota transitória do Intestino	121	-
	143	-		122	-
	145	-		124	-
	147	-		125	+
	148	+		126	+
	149	-		127	-
	Ø	Ø		129	-
	Ø	Ø		130	+

Fonte: AUTORA, 2023.

Possuir a capacidade de se adaptar às mudanças no ecossistema aquático ou aos seus hospedeiros é uma situação crítica para a sobrevivência de espécies de *Vibrio*. Um aspecto chave para sobreviver é a capacidade de formar biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002). No entanto, a formação de biofilme dessas bactérias depende de diversos aspectos, como genes específicos responsáveis pela biossíntese de flagelos, pili e exopolissacarídeos, além de processos regulatórios, como por exemplo o *quorum sensing* ou em português o sensor de quórum ou densidade. Algo que vale salientar é que como a produção de

exopolissacarídeos também está presente em agentes patogênicos do gênero *Vibrio*, elucidar como é feita a formação e regulação desses biofilmes podem ser úteis como base para o desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias de prevenção contra doenças associadas a esse microrganismo (YILDIZ; VISICK, 2009).

7.2.9 Perfil enzimático das Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs)

Ao investigar o perfil enzimático de BHCs, a partir dos estratos anatômicos, das lagosta *P. argus* foi possível perceber que essa microbiota era composta por bactérias contendo enzimas proteolíticas, lipolíticas, amilolíticas e celulolíticas. Contendo principalmente lipases e amilases. A enzima caseinase foi escassa principalmente na microbiota residente do intestino desses animais. Bactérias da microbiota residente e transitória do intestino desse crustáceo não possuíam elastase. Essa enzima juntamente com a celulase foram as mais raras na composição desse microbioma. Uma cepa específica (151), pertencentes a microbiota transitória de intestino se mostrou eficiente na digestão de diversos alimentos ao apresentar seis das sete enzimas testadas. Ademais, bactérias originárias da hemolinfa (36), hepatopâncreas (79, 80), microbiota residente do intestino (113) e microbiota transitória (152, 153 e 160) possuíam cinco das sete enzimas analisadas (Tabela 11).

Ao averiguar o perfil enzimático das BHCs de lagosta *P. laevicauda* constatou-se que o microbioma da hemolinfa, do hepatopâncreas, da microbiota residente e transitória do intestino desses animais possuía cepas contendo enzimas com capacidade proteolítica, lipolítica, amilolítica e celulolítica. Composta principalmente por proteases (caseínase, gelatinase) e amilases. Fosfolipase foi escassa nas cepas do hepatopâncreas, enquanto lipases foram e menos evidentes na microbiota residente desses animais. Elastases e celulases foram enzimas raras nas bactérias dessa espécie de lagosta. Cepas originária da hemolinfa (14) e hepatopâncreas (55, 59) das lagostas verdes merecem destaque pela presença de seis das sete enzimas analisadas. Além dessas, cepas advindas da hemolinfa (11, 20), microbiota residente do intestino (91, 95, 100), microbiota transitória do intestino (131, 132, 138, 140, 135) possuíam cinco das sete enzimas investigadas (Tabela 11).

A comunidade bacteriana pertencente às lagostas vermelhas foi predominantemente capaz de produzir lipases. Não se observou esse predomínio nas bactérias oriundas das lagostas verdes. A presença de amilases foi constatada em todos os estratos anatômicos de *P. argus* e *P. laevicauda*. Todas as cepas transitórias do intestino de *P. argus* e todas as cepas residentes do intestino de *P. laevicauda* possuíam a competência de degradar

amido. Notoriamente, o hepatopâncreas foi o estrato com menor abundância dessa atividade enzimática. A existência de celulasas foi percebida em todos os estratos estudados nas lagostas. Foi perceptível a escassez dessa atividade enzimática quando comparada à outra carbohidrase (amilase) (Tabela 11).

Tabela 11 - Perfil enzimático em Bactéria Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) de lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)			Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs) advindas de <i>P. laevicauda</i> (lagosta verde)		
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Perfil enzimático	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Perfil enzimático
Hemolinfa	31	Cas, Elas, Lip, Fosf	Hemolinfa	11	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	32	Lip, Cel		14	Cas, Gel, Elas Lip, Fosf, Ami
	36	Cas, Elas, Lip, Fosf, Ami		16	Cel
	37	Cas, Gel, Fosf, Ami		18	Cas, Gel, Lip,
	40	Cas, Elas, Lip, Fosf		15	Fosf, Ami
	Ø	Ø		20	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
Hepatopâncreas	72	Cas, Elas, Lip, Cel	Hepatopâncreas	51	Cas, Gel, Lip,
	73	Elas, Cel		53	Cas, Gel, Lip, Fosf,
	74	Cel		54	Cas, Gel, Elas, Cel
	79	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami		55	Cas, Gel, Elas, Lip, Ami, Cel
	77	Cas, Gel, Lip, Fosf		56	Gel, Elas, Cel
	80	Cas, Gel, Lip, Fosf, Cel		59	Cas, Gel, Elas, Lip, Ami, Cel
Microbiota residente do Intestino	111	Lip, Fosf, Ami	Microbiota residente do Intestino	91	Cas, Gel, Fosf, Ami, Cel
	112	Lip, Fosf, Ami		92	Cas, Gel, Fosf, Ami
	113	Cas, Lip, Fosf, Ami, Cel		93	Cas, Ami
	114	Lip, Fosf		94	Cas, Gel, Fosf, Ami
	115	Lip, Fosf		95	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	116	Gel, Lip, Ami		97	Cas, Gel, Fosf, Ami
	117	Gel, Lip, Fosf		98	Cas, Ami
	118	Cas, Gel, Ami		100	Gel, Lip, Fosf, Ami, Cel
	119	Gel, Lip, Ami		Ø	Ø
	120	Lip		Ø	Ø
Microbiota transitória do Intestino	151	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami, Cel	Microbiota transitória do Intestino	131	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	152	Cas, Gel, Lip, Ami, Cel		132	Cas, Lip, Fosf, Ami, Cel
	153	Cas, Gel, Lip, Ami, Cel		133	Cas, Lip, Fosf, Ami
	154	Cas, Gel, Fosf, Ami		134	Fosf, Ami
	157	Cas, Gel, Lip, Ami		136	Cas, Gel, Lip
	158	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami		137	Cas, Lip, Ami, Cel
	159	Lip, Fosf, Ami		138	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	160	Cas, Lip, Fosf, Ami, Cel		140	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	Ø	Ø		135	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami

Fonte: AUTORA, 2023.

Cas= caseinase, Gel= gelatinase, Elas= elastase, Lip= lipase, Fosf= fosfolipase, Ami= amilase, Cel=quitinase

Glass e Stark (1994) verificaram a atividade de proteases do estômago e hepatopâncreas de *Homarus gammarus* e perceberam que a hidrólise de caseína foi semelhante nos dois estratos. No hepatopâncreas, foi encontrado endoprotease - elastase.

Rahman *et al.* (2019) tiveram como objetivo avaliar a distribuição de bactérias produtoras das enzimas protease, amilase e lipase do trato digestivo de lagostas da espécie *Panulirus ornatus*. Os resultados mostraram que a comunidade bacteriana do sistema

gastrointestinal desse crustáceo era composta por cepas proteolíticas (27,45%), amilolíticas (23,53%) e lipolíticas (21,77%).

Kumar *et al.* (2010) compararam a variedade da microbiota de lagostas *Panulirus versicolor* selvagens com lagostas criadas em laboratório e descobriram que a comunidade bacteriana encontrada no intestino anterior dos crustáceos selvagens era dominada por bactérias celulolíticas, enquanto bactérias proteolíticas eram mais abundantes no intestino anterior dos indivíduos criados em laboratório. Esses achados indicam que o comportamento alimentar das lagostas podem modificar o microbioma capaz de sintetizar enzimas no sistema digestivo desses animais.

A distribuição geográfica dos crustáceos faz com que esses indivíduos se exponham a uma ampla gama de condições ambientais como diferentes faixas de temperatura e salinidade, por exemplo. Aliado a isso, a ingestão de variedades de alimentos faz com que esses indivíduos possuam abundância e diversidade de enzimas digestivas distintas, como predomínio de celulase naqueles indivíduos que se alimentam de vegetais. No entanto, todas as espécies compartilham enzimas digestivas principais como lipases e amilases (RODRÍGUEZ-VIERA, 2021).

As lagostas costumam se alimentar de peixes vivos, moluscos, outros crustáceos, vermes aquáticos e algumas algas, sendo portanto considerados onívoros e conseqüentemente a microbiota presente no sistema digestivo de lagostas consiste principalmente em bactérias proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas e celulolíticas (KUMAR *et al.* 2010; RAHMAN *et al.*, 2019). Outras bactérias como as do gênero *Flavobacterium* presentes no intestino de lagostas têm o potencial de hidrolisar polissacarídeos complexos. Todos esses microrganismos são necessariamente importantes (WAŚKIEWICZ; IRZYKOWSKA, 2014).

De acordo com Menezes (1991), a dieta das lagostas vermelhas e verdes, no Brasil, é composta principalmente por moluscos, gastrópodes e crustáceos, tendo como alimentos secundários algas, equinodermas e corais. Sendo, portanto, as lagostas animais onívoros. Esse hábito alimentar pode justificar os achados do presente estudo, que mostrou uma microbiota rica em proteases e lipases. A baixa quantidade de atividade de celulase pode ser explicada pelas algas serem apenas alimentos secundários encontrados nos conteúdos estomacais de *P. argus* e *P. laevicauda*. No entanto, é indicado que um estudo mais atual sobre o conteúdo estomacal de ambas as espécies de lagostas seja realizado para verificar se não houveram mudanças em seus hábitos alimentares e por conseguinte alterações na diversidade e abundância da microbiota destes animais.

7.2.10 Perfil enzimático do gênero *Vibrio*

Ao investigar o perfil enzimático das bactérias do gênero *Vibrio*, a partir dos estratos anatômicos, das lagostas *P. argus* foi possível identificar um microbioma composto por bactérias contendo enzimas proteolíticas, lipolíticas, amilolíticas e celulolíticas. Contendo principalmente fosfolipases e amilases. A microbiota transitória do intestino demonstrou ser o estrato com menor presença de caseinase. Foi evidente a supremacia da atividade proteolítica na quebra de gelatina na hemolinfa dessa espécie de lagosta. Nas comunidades bacterianas da hemolinfa e transitória do intestino de *P. argus* não houve a presença de elastase. Essa enzima juntamente com a celulase foram as mais raras na composição desse microbioma. Foi notória a escassez de lipase na microbiota transitória do intestino da lagosta vermelha. Cepas específicas originárias da hemolinfa (21), do hepatopâncreas (62, 63 e 69) e microbiota residente do intestino (102) merecem destaque por possuir seis das sete enzimas averiguadas (Tabela 12).

Ao verificar o perfil enzimático das bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* de lagosta *P. laevicauda* foi possível perceber que as bactérias da hemolinfa, do hepatopâncreas, da microbiota residente e transitória do intestino desses animais possuía cepas contendo enzimas com capacidade proteolítica, lipolítica, amilolítica e celulolítica. Composta principalmente por proteases (caseinase, gelatinase), lipases, fosfolipases e amilases. Elastase e celulase foram as enzimas mais escassas. A hemolinfa de *P. laevicauda* apresentou uma alta taxa de atividade de caseinase. Foi evidente a supremacia de gelatinase na hemolinfa e no microbioma residente do intestino desse crustáceo, pois todas cepas analisadas possuíam essa enzima. Uma cepa originária do microbioma residente do intestino (89) possuía todas as enzimas investigadas. O hepatopâncreas apresentou uma cepa (44) contendo seis das sete enzimas estudadas. Os demais estratos apresentaram bactérias contendo cinco do total de atividades enzimáticas verificadas (Tabela 12).

Nas comunidades bacterianas da hemolinfa e transitória do intestino de *P. argus* e *P. laevicauda* não havia bactérias capazes de quebrar elastina. A supremacia da fosfolipase foi verificada nas duas espécies de lagostas investigadas. No qual todos os microbiomas analisados nos diferentes estratos em *P. argus* continham essa enzima. Em *P. laevicauda*, a microbiota da hemolinfa e residente do intestino também foi composta por 100% das cepas com essa aptidão. A comparação de amilase foi verificada nas lagostas vermelhas e verdes e foi observado, estatisticamente, o predomínio dessa enzima em ambas espécies de lagosta. Havendo dominância total das cepas analisadas no hepatopâncreas, microbiota residente e

transitória do intestino de *P. argus* e na hemolinfa de *P. laevicauda*. A escassez de celulases foi percebida em lagostas vermelhas e verdes. Essa atividade enzimática foi ausente na microbiota residente do intestino de lagostas vermelhas e no microbioma transitório do intestino e hemolinfa de lagostas verdes (Tabela 12).

Tabela 12 - Perfil enzimático em Bactéria do gênero *Vibrio* de lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.

Bactérias presuntivas do gênero <i>Vibrio</i> advindas de <i>P. argus</i> (lagosta vermelha)			Bactérias presuntivas do gênero <i>Vibrio</i> advindas de <i>P. laevicauda</i> (lagosta verde)		
Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Perfil enzimático	Estrato anatômico (origem)	Código da cepa	Perfil enzimático
Hemolinfa	21	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami, Cel	Hemolinfa	2	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	24	Gel, Fosf		3	Gel, Lip, Fosf, Ami
	25	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami		4	Cas, Gel, Fosf, Ami
	26	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami		8	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	27	Gel, Lip, Fosf, Ami		9	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
Hepatopâncreas	61	Cas, Gel, Fosf, Ami	Hepatopâncreas	43	Gel, Fosf, Lip
	62	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami, Cel		44	Cas, Gel, Elas, Fosf, Ami, Cel
	63	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami, Cel		46	Gel, Lip, Fosf,
	64	Lip, Fosf, Ami		48	Cas
	66	Cas, Gel, Fosf, Ami		49	Cas, Lip, Fosf, Ami
	67	Lip, Fosf, Ami		∅	∅
	69	Cas, Gel, Elas, Lip, Fosf, Ami		∅	∅
Microbiota residente do Intestino	101	Gel, Fosf, Ami,	Microbiota residente do Intestino	81	Cas, Gel, Lip, Fosf
	102	Cas, Gel, Elas, Lip, Fosf, Ami		82	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	103	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami		83	Gel, Lip, Fosf, Ami, Cel
	104	Fosf, Ami		85	Cas, Gel, Fosf, Ami, Cel
	109	Cas, Gel, Fosf, Ami		86	Cas, Gel, Fosf
	110	Cas, Lip, Fosf, Ami		87	Cas, Gel, Fosf, Ami
	∅	∅		88	Gel, Lip, Fosf, Ami
	∅	∅		89	Cas, Gel, Elas, Lip, Fosf, Ami, Cel
	∅	∅		90	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
Microbiota transitória do Intestino	142	Gel, Fosf, Ami	Microbiota transitória do Intestino	121	Cas, Gel, Lip, Fosf
	143	Fosf, Ami		122	Cas, Gel, Lip, Fosf
	145	Fosf, Ami, Cel		124	Cas
	147	Cas, Gel, Fosf, Ami		125	Fosf, Ami
	148	Fosf, Ami		126	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	149	Lip, Fosf, Ami, Cel		127	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
	∅	∅		129	Gel, Lip, Fosf, Ami
	∅	∅		130	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami

Fonte: AUTORA, 2023.

Cas= caseinase, Gel= gelatinase, Elas= elastase, Lip= lipase, Fosf= fosfolipase, Ami= amilase, Cel=quitinase

A partir dessas análises, em cepas presuntivas para *Vibrio*, foi possível inferir que esse gênero possui eficiência nas hidrólises de proteínas (caseína e gelatina), possuem abundância de lipases, fosfolipases e amilases. Atividades enzimáticas realizadas por agentes

não patogênicos podem ter importante papel nutricional nas lagostas (GATESOUBE *et al.*, 1997, HENDERSON; MILLAR, 1998; ITOI *et al.*, 2006, PERERA; SIMON, 2015)..

Por fim, a comunidade bacteriana presente no sistema gastrointestinal e sistema circulatório (hemolinfa) dos crustáceos é composta por um conjunto complexo e dinâmico de microrganismos que vivendo em sinergia com o hospedeiro (lagosta) podem beneficiá-lo por meio da facilitação de diversas funções biológicas. Desempenhando papel fundamental e impactando significativamente o estado geral de saúde desses animais. Por meio da secreção de enzimas, auxiliam na digestão de alimentos e desse modo suprem as necessidades por nutrientes. Ademais, essa microbiota protege o hospedeiro contra agentes patogênicos, por meio da ativação de mecanismos imunológicos encontrados no sistema digestivo (LEIN *et al.*, 2022).

O entendimento da microbiota é um fator necessário para o desfecho de cultivos de lagostas. Por esse motivo, nas últimas décadas tem se dado mais atenção à relação hospedeiro-microbiota nesses indivíduos, a fim de explorar as capacidades probióticas, e desse modo, adquirir nutrição adequada, aumentando a possibilidade de sobrevivência desses crustáceos (LEIN *et al.*, 2022).

7.2.11 Identificação genotípica, perfil enzimático e capacidade de produção de exopolissacarídeos das amostras

Dentre as 160 cepas analisadas, 109 mostraram-se viáveis para análise genotípica. Nesse estudo, quinze foram sequenciadas por meio do método de *Sanger* de segunda geração. Os microrganismos selecionados pertenciam aos estratos anatômicos das duas espécies de lagosta advindas do tratamento de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHCs). Essa seleção foi realizada de forma a se obter uma diversidade de espécies, para isso foram selecionadas duas cepas com características morfológicas, bioquímicas e/ou enzimáticas diferentes de cada estrato anatômico, exceto a microbiota transitória do intestino da lagosta vermelha, que apenas uma cepa foi escolhida.

A partir do sequenciamento genético, as bactérias foram identificadas em nível de gênero. Evidenciando a presença dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* e *Vibrio*. Em poucas amostras já foi percebido uma diversidade de gêneros pertencentes ao microbioma do sistema digestivo (intestino e hepatopâncreas) e circulatório (hemolinfa) (Tabela 13).

As amostras advindas da hemolinfa das duas espécies de lagostas foram identificadas como *Pseudomonas* e *Vibrio*. As únicas duas amostras de bactérias Gram

positivas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* e tinham como origem o hepatopâncreas das lagostas verdes. No hepatopâncreas das lagostas vermelhas foram encontrados *Enterobacter* e *Vibrio*. As amostras identificadas na microbiota transitória do intestino da lagosta vermelha eram *Photobacterium*, enquanto na lagosta verde identificou-se *Vibrio* e *Shewanella*. Por fim, no microbioma transitório do intestino foi encontrado *Pseudomonas* na lagosta vermelha, *Vibrio* e *Shewanella* na lagosta verde (Tabela 13).

Pseudomonas sp. identificadas na hemolinfa (36) e na microbiota transitória do intestino (152), *Vibrio* sp. originários do hepatopâncreas (79), pertencentes as lagostas vermelhas expressaram cinco enzimas das sete verificadas e tiveram capacidade de produção de exopolissacarídeos. Esses achados mostram que essas cepas possuem características importantes para potenciais usos biotecnológicos, podendo utilizá-las na suplementação de ração, como probióticos. As bactérias identificadas como *Photobacterium* sp. da microbiota residente do intestino (113, 118) desse crustáceo não possuíam capacidade de produção exopolissacarídeo. *Enterobacter* sp. mostrou baixa expressão de atividade enzimática, apresentando apenas elastase e celulase (Tabela 13).

Bacillus sp. originário do hepatopâncreas (55) da lagosta verde não expressou apenas a enzima fosfolipase, sendo portanto eficiente na quebra de proteases, lipases, amilases e celulases, porém, essa bactéria não possuiu capacidade de produção de exopolissacarídeo. *Vibrio* sp. encontrados na hemolinfa (20) e microbiota transitória do intestino (132) foram eficientes ao expressar cinco enzimas das sete estudadas. Esses resultados evidenciam o potencial dessas cepas para uso probiótico. *Shewanella* sp. identificada na microbiota residente (93) e transitória do intestino (136) da *P. laevicauda* tiveram baixa expressão de atividade enzimática, tendo apenas enzimas caseinase e amilase; caseinase, gelatinase e lipase, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 - Identificação, perfil enzimático e capacidade de produção de exopolissacarídeos das bactérias extraídas de lagostas *P. argus* e *P. laevicauda* em diferentes estratos anatômicos.

Origem da amostra	Código da Cepa	Identificação	Produção de exopolissacarídeos	Perfil enzimático
<i>Panulirus argus</i>				
Hemolinfa	36	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	Cas, Elas, Lip, Fosf, Ami
Hemolinfa	37	<i>Vibrio</i> sp.	+	Cas, Gel, Fosf, Ami
Hepatopâncreas	73	<i>Enterobacter</i> sp.	+	Elas, Cel
Hepatopâncreas	79	<i>Vibrio</i> sp.	+	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
Microbiota do I.R	113	<i>Photobacterium</i> sp.	-	Cas, Lip, Fosf, Ami, Cel
Microbiota do I.R	118	<i>Photobacterium</i> sp.	-	Cas, Gel, Ami
Microbiota do I.T	152	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	Cas, Gel, Lip, Ami, Cel
<i>Panulirus laevicauda</i>				
Hemolinfa	18	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	Cas, Gel, Lip,
Hemolinfa	20	<i>Vibrio</i> sp.	-	Cas, Gel, Lip, Fosf, Ami
Hepatopâncreas	54	<i>Bacillus</i> sp.	+	Cas, Gel, Elas, Cel
Hepatopâncreas	55	<i>Bacillus</i> sp.	-	Cas, Gel, Elas, Lip, Ami, Cel
Microbiota do I.R	92	<i>Vibrio</i> sp.	+	Cas, Gel, Fosf, Ami
Microbiota do I.R	93	<i>Shewanella</i> sp.	+	Cas, Ami
Microbiota do I.T	132	<i>Vibrio</i> sp.	+	Cas, Lip, Fosf, Ami, Cel
Microbiota do I.T	136	<i>Shewanella</i> sp.	+	Cas, Gel, Lip,

Fonte: AUTORA, 2023.

Cas= caseinase, Gel= gelatinase, Elas= elastase, Lip= lipase, Fosf= fosfolipase, Ami= amilase, Cel=quitinase

Zhang *et al.* (2018) identificaram a microbiota da hemolinfa de crustáceos e verificaram que esse estrato abrigava como grupos predominantes *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Vibrio*, microrganismos com potenciais patogênicos.

No entanto, estudos sugerem que alguns desses microrganismos hemolinfáticos indígenas podem competir com microrganismos “invasores” estimulando moléculas e células imunes a gerar imunidade ao hospedeiro (SCHMITT *et al.*, 2012; DESRIAC *et al.*, 2014).

Lein *et al.* (2022) ao realizar uma revisão intitulada “*Gastrointestinal Microbiota of Spiny Lobster: A Review*”, perceberam haver microrganismos gastrointestinais comuns nas diversas espécies de lagostas, sendo eles: *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Vibrio*. Porém, a estrutura e abundância desses microrganismos podem ser “moldadas” dependendo do ambiente.

Esses achados corroboram com os resultados encontrados na revisão sistemática do presente estudo, que além dos gêneros acima descritos, observou a presença de *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Photobacterium* e *Shewanella* como algumas espécies predominantes no microbioma de lagosta.

A adição de diversos probióticos, incluindo os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia* e *Shewanella* foi capaz de melhorar o desempenho de crescimento e eficiência dos índices de digestão. Além de aprimorar os parâmetros imunológicos e resistência a alguns patógenos em diferentes lagostins (ALVANOU *et al.*, 2023).

Xu *et al.* (2021) ao estudarem o efeito probiótico de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, isoladas de indivíduos saudáveis de *P. clarkii* e adicionadas à dieta, constataram resultados promissores ao descobrir o aumento das atividades enzimáticas digestivas intestinais após adição desse probiótico.

Os probióticos são capazes de erradicar agentes patogênicos do trato gastrointestinal por meio de competição por nutrientes e locais de adesão (VERSCHUERE *et al.*, 2000). Além disso, eles regulam positivamente as enzimas digestivas melhorando o uso e a digestibilidade dos alimentos (MERRIFIELD *et al.*, 2010), pois influenciam a mudança das bactérias benéficas, que controlam a secreção de enzimas importantes e consequentemente os nutrientes tornam-se mais disponíveis para os organismos (ROHANI *et al.*, 2022)

Desse modo, devido a crescente busca global por produtos sustentáveis e saudáveis, o uso de probióticos é de grande relevância como suplementos dietéticos naturais (ALVANOU *et al.*, 2023), portanto, o conhecimento de bactérias com esse potencial nas lagostas exploradas pela pesca no Ceará faz-se necessário para a busca de possíveis suplementações no desenvolvimento do cultivos desse crustáceos.

8 CONCLUSÃO

O bacterioma encontrado nas lagostas espinhosas estudadas no litoral cearense, *Panulirus argus* (lagosta vermelha) e *Panulirus laevicauda* (lagosta verde), divergiu em abundância e diversidade, considerando a origem anatômica investigada. Nos microbiomas averiguados, os gêneros *Pseudomonas* e *Vibrio* originários de lagostas vermelhas; *Bacillus* e *Vibrio* oriundos das lagostas verdes demonstram potencial biotecnológico para uso probiótico ao expressar uma diversidade de atividades de enzimas digestivas (proteases, lipases, fosfolipases, amilases e celulasas) e produção de exopolissacarídeos. Esses resultados são de extrema importância ecológica e econômica para o Estado do Ceará.

Para uma melhor elucidação do microbioma dessas espécies, sugere-se que uma investigação metagenômica seja realizada, preferencialmente, em diferentes fases de desenvolvimento desse crustáceo e em localizações geográficas distintas, a fim de verificar algumas questões que não puderam ser compreendidas nesse primeiro momento.

REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; KOVACS, A.T.; KUIPERS, O.P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current Opinion Biotechnology**. [s.l], v. 22, p. 172-179, 2011.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**. v. 59, n. 1, p.143-169, 1995.
- ANGELIM, A. L.; COSTA, S. P. Os benefícios do uso de probióticos na aquicultura. **Revista Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC**. Rio Grande do Norte. v. 19, n.1, p. 39, junho, 2017. Disponível: <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2017/06/REVISTA-ABCC-ED-JUNHO-2017.pdf>. Acessado em: 08 set. 2023.
- ALVANOU, M. V.; FEIDANTISIS, K.; STAIKOU, A.; APOSTOLIDIS, A. P.; MICHAELIDIS, B.; GIANTSIS, I. A. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics Utilization in Crayfish Aquaculture and Factors Affecting Gut Microbiota. **Microorganisms**. 11, 1232, 2023. doi.org/10.3390/microorganisms11051232
- BAKER-AUSTIN, C.; TRINANES, J.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; MARTINEZ-URTAZA, J. *Non-cholera vibrios*: the microbial barometer of climate change. **Trends in Microbiology**. 25 (1), 76–84, 2017.
- BARTLETT, S. L.; WOOSTER, G. A.; SOKOLOWSKI, M. S.; DOVE, A. D. M. & BOWSER, P. R. Naturally occurring bacteraemia in American lobsters, *Homarus americanus* Milne-Edwards, in Long Island Sound. **Journal of Fish Diseases**. 31: 19-25, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00855.x
- BASTI, D., BRICKNELL, I., HOYT, K., CHANG, E.S., HALTEMAN, W. & BOUCHARD, D. Factors affecting post-capture survivability of lobster *Homarus americanus*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 90: 153-166, 2010. doi: 10.3354/dao02205
- BATTISON, A. L.; DESPRES, B. M. & GREENWOOD, S. J. Ulcerative enteritis in *Homarus americanus*: Case report and molecular characterization of intestinal aerobic bacteria of apparently healthy lobsters in live storage. **Journal of Invertebrate Pathology**. 99: 129-135, 2008. doi: 10.1016/j.jip.2008.06.013
- BEARDSLEY, C.; MOSS, S.; MALFATTI, F.; AZAM, F. Quantitative role of shrimp fecal bacteria inorganic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 77, n. 1,p. 134-45, 2011.
- BEAZ-HIDALGO, R.; BALBOA, S.; ROMALDE, J. L.; FIGUERAS, M. J. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. **Environmental Microbiology Reports**. 2 (1), 34–43, 2010.
- BEKAVAC, A.; BECK, A.; DRAGICEVIC, P.; DRAGUN, Z.; MAGUIRE, I.; VANKOVIC, D.; FIKET, Z.; GRACAN, R. & HUDINA, S. Disturbance in invasion? Idiopathic necrotizing hepatopancreatitis in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) in Croatia. **Journal of Fish Diseases**. 45: 261-276, 2022. doi: 10.1111/jfd.13552

BENNETT, H. M.; GRIFFIN, M.; FRANCIS-FLOYD, R.; BAKER, S.; CAMUS, A.; PELTON, C. & DILL-OKUBO, J. *Vibrio harveyi* in a Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus*) with hepatopancreas necrosis. **Veterinary Pathology**. 1-6, 2023.
<https://doi.org/10.1177/03009858231164754>. Doi: 10.1177/03009858231164754

BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial chitinases: properties and BI, K., ZHANG, X., YAN, B., GAO, H., GAO, X., SUN, J. Isolation and molecular identification of *Vibrio natriegens* from diseased *Portunus trituberculatus* in China. **Journal of the World Aquaculture Society**. 47 (6), 854–861, 2016.

BOURNE, D. G .; YOUNG, N.; WEBSTER, N.; PAYNE, M.; SALMIN, M.; DEMEL, S. & HALL, M. Microbial community dynamics in a larval aquaculture system of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. **Aquaculture**. 242, 1–4, 20; 31-51, 2004.
 BOURNE, D.; HØJ, L.; WEBSTER, N.; PAYNE, M.; SKINDERSØE, M.; GIVSKOV, M.; HALL, M. Microbiological aspects of phyllosoma rearing of the ornate rock lobster *Panulirus ornatus*. **Aquaculture**. 268 (1–4), 274–287, 2007.

BRASIL. Plano de Gestão para o Uso Sustentável de Lagostas no Brasil: *Panulirus argus* (Latreille, 1804) e *Panulirus laeviscauda* (Latreille, 1817) / José Dias Neto, Organizador. Brasília: Ibama, 2008.

BRASIL. COMEX STAT - Portal para acesso gratuito às estatísticas de comércio, 2021.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, DF: MPA, 2011.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. Disponível em:
www.gov.br/mpa/pt-br/assuntos/noticias/pescadores-de-lagosta-em-estado-de-emergencia.
 Acessado em: 5 de setembro de 2023.

BRASIL. Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 221, de 8 de junho de 2021, dispõe sobre as regras de monitoramento e controle da pesca, do transporte, do processamento, do armazenamento e da comercialização da lagosta vermelha (*Panulirus argus*), lagosta verde (*Panulirus laeviscauda*) e lagosta pintada (*Panulirus echinatus*). Disponível em:
www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2021/P_sap_mapa_221_2021_e_stabelece_regras_ordenamento_monitoramento_pesca_lagostas.pdf. Acessado em: 5 de setembro de 2023.

BROWN, P.B. Physiological adaptations in the gastrointestinal tract of crayfish. **American Zoologist**. 35, 20–27, 1995.

BURGENTS, J. E.; BURNETT, L. E.; STABB, E.V.; BURNETT, K.G. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp. *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**. 29 (8), 681–691, 2005.

CAI, M.; HUI, W.; DENG, X.; WANG, A.; HU, Y.; LIU, B.; CHEN, K.; LIU, F.; TIAN, H.; GU, X.; LI, H. & LI, J. Dietary *Haematococcus pluvialis* promotes growth of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) via positive regulation of the gut microbial co-occurrence network. **Aquaculture**. 551:737900, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737900>

- CAI, W.; ARIAS, C. R. Biofilm Formation on Aquaculture Substrates by Selected Bacterial Fish Pathogens, **Journal of Aquatic Animal Health**. [s.l], v. 29, p. 95-104, 2017.
- CASTEX, M., DANIELS, C., CHIM, L. Probiotic applications in crustaceans. **Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics**. 290–327, 2014.
- CAVALCANTE, P. P. L.; FURTADO-NETO, M. A. A.; COSTA, J. M. Ordenamento da pesca da lagosta: uma experiência desordenada. Fortaleza: MPA: UFC, 2011.
- CAVICCHIOLI, R. Microbial ecology of antarctic aquatic systems. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p.691-706, 2015.
- CAWTHORN, R. J. Diseases of American lobsters (*Homarus americanus*): a review. **Journal of Invertebrate Pathology**. 106 (1), 71–78, 2011.
- CECCALDI, H. Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture. **Ifremer**. 9, 26, 243-259, 1989. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1486/>
- CELIS-GUERRERO, L. E.; GARCÍA-CARREÑO, F. L & NAVARRETE DEL TORO, A. M. Characterization of Proteases in the Digestive System of Spiny Lobster (*Panulirus interruptus*). **Marine Biotechnology**. 6, 262–269, 2004. DOI: 10.1007/s10126-003-0032-6
- CHEN, L.; XU, J.; WAN, W.; XU, Z.; HU, R.; ZHANG, Y.; ZHENG, J. & GU, Z. The Microbiome Structure of a Rice-Crayfish Integrated Breeding Model and Its Association with Crayfish Growth and Water Quality. **Microbiology Spectrum**. 10: 2, 2022.
- CHEN, X.; FAN, L.; QIU, L.; DONG, X.; WANG, Q.; HU, G.; MENG, S.; LI, D. & CHEN, J. Metagenomics Analysis Reveals Compositional and Functional Differences in the Gut Microbiota of Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*, Grown on Two Different Culture Environments. **Frontiers in Microbiology**. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735190>
- CHENG, H.; DAI, Y.; RUAN, X.; DUAN, X.; ZHANG, C.; LI, L.; HUANG, F.; SHAN, J.; LIANG, K.; JIA, X.; WANG, Q. & ZHAO, H. Effects of nanoplastic exposure on the immunity and metabolism of red crayfish (*Cherax quadricarinatus*) based on high-throughput sequencing. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 245:114114, 2022.
- CHENG, W.; WANG, L. U.; CHEN, J. C. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**. 250 (3–4), 592–601, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.j.ecoenv.2022.114114>
- CHISTOSERDOV, A.; SMOLOWITZ, R.; MIRASOL, F. & HSU, A. Culture-dependent characterization of the microbial community associated with epizootic shell disease lesions in American lobster, *Homarus americanus*. **Journal of Shellfish Research**. 24:741–747, 2005. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[741:CCOTMC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[741:CCOTMC]2.0.CO;2)
- CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M. AND BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. (s.l), v.22, p. 996-1006, 1985.

CRUZ IZQUIERDO, R. C. Metodologias de amostragem para avaliação das populações de lagosta: plataforma continental do Brasil. Fortaleza: **UFC/LABOMAR/NAVE: UH/CIM**, 2011.

CRUZ, R.; BAISRE, J. A.; DÍAZ, E.; BRITO, R.; GARCÍA, C.; BLANCO, W.; CARRODEGAS, C. Atlas biológico-pesquero de la langosta en el archipiélago cubano. **Revista de Investigaciones Pesqueras y Revista Mar y Pesca**. Publicación Especial. La Habana, 125p., 1987.

CUÉLLAR-ANJEL, J.; CORTEEL, M.; GALLI, L.; ALDAY-SANZ, V.; HASSON, K.W. Principal shrimp infectious diseases, diagnosis and management. In: Alday-Sanz, V. (Ed.), **The Shrimp Book**. Nottingham University Press, UK, pp. 517–622, 2014.

DAI, J.; CHEN, T.; GUO, X.; DAI, Z.; HE, Z. & HU, Y. Evaluation of fish meal replacement by *Clostridium autoethanogenum* protein in diets for juvenile red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Aquaculture**. 570:739379, 2023.

DANIELS, C.L.; MERRIFIELD, D.L.; BOOTHROYD, D.P.; DAVIES, S.J.; FACTOR, JR.; ARNOLD, K.E. Effect of dietary *Bacillus* spp. and *Mannan oligosaccharides* (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus*) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. **Aquaculture**. 304:49–57, 2010.

DESRIAC F, LE CHEVALIER P, BRILLET B, LEGUERINEL I, THUILLIER B, PAILLARD C, FLEURY Y. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. **FEMS Microbiology Letters**. 350:107–116, 2014. doi: 10.1111/1574-6968.12308

DIAS NETO, J.; DIAS, J. F. O. O uso da biodiversidade aquática no Brasil: uma avaliação com foco na pesca. Brasília: Ibama, 288p. 2015.

DIAS-NETO, J. Avaliação da execução do plano de gestão para o uso sustentável de lagostas no Brasil. Brasília: Ibama, 2017. 62 p. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/gestao_pesqueira/publicacoes/2017-avaliacao-da-execucao-do-plano-de-gestao-lagostas.pdf > Acesso em 03 de novembro de 2021.

DIGGLES, B. K.; MOSS, G. A.; CARSON, J.; ANDERSON, C. D. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 43 (2), 127–137, 2000.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**. 15:167–193, 2002.

DRAGICEVIC, P.; BIELEN, A.; PETRIC, I.; VUK, M.; ZUCKO, J. & HUDINA, S. Microbiome of the Successful Freshwater Invader, the Signal Crayfish, and Its Changes along the Invasion Range. **Microbiology Spectrum**. 9, 2021. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00389-21>

DUARTE, L. F. A.; SEVERINO-RODRIGUES, E. & GASALHA, M. A. Contextualização da pesca mundial de lagostas e características de comercialização de *Scyllarides* spp. e

Panulirus spp. na baixada santista, estado de São Paulo, BRASIL. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 37, p. 235-246. 2011.

EGERTON, S.; CULLOTY, S.; WHOOLEY, J.; STANTON, C.; ROSS, R.P. The gut microbiota of marine fish. **Frontiers in Microbiology**. 9, 873, 2018.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>.

ESAKKIRAJ, P.; MELEPPAT, B.; LAKRA, A. K.; AYYANNA, R.; ARUL, V. Cloning, expression, characterization and application of protease produced by *Bacillus cereus* PMW8. **RSC Advances**. 6(45):38611–38616, 2016.

EVANS, L. H. Rock lobster autopsy manual. Report No. 1740672763, **Curtin University of Technology**. Western Australia, 2003.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Fisheries Statistical Collections fact sheets. Global Production, 2022.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture – Meeting the Sustainable Development Goals. Rome, 210p. 2018.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The state of world fisheries and aquaculture: contributing to food security and nutrition for all. Rome, 2016.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Integrating inland capture fisheries into the United Nations 2030 Agenda for Sustainable Development: Harare. Rome: FAO, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc0323en>.

FIGUEIREDO, M. S. R. B & ANDERSON, A. J. “Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (Paleomonidae, Potunidae and Penaeidae) feeding in the natural habitat”. **Aquaculture Research**. vol. 40, n°.3, pp.282-291, 2009.

FIGUEIREDO, M., KRICKER, J. A. & ANDERSON, A. J. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**. 21, 334–344, 2001.

FIGUEIREDO, M., KRICKER, J. A. & ANDERSON, A. J. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). **Journal of Crustacean Biology**. 21, 334–344, 2001.

FIGUEIREDO, M.; MICHALSKI, J. M.; RUSSEL, R. G.; SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. **Infection and immunity**. 65:3112-7, 1997.

FLEGEL. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**. p. 166–172, 2012.

FONTELES-FILHO, A. A. The state of the lobster fishery in Northeast Brazil. In: PHILLIPS, B. F; KITAKA, J. (Org.). Spiny lobster: fisheries and culture. 2nd ed. Oxford: **Fishing News Books**. p. 121-134, 2000.

FONTELES-FILHO, A. A.; GUIMARÃES, M. S. S. Diagnóstico da situação econômica da indústria lagosteira no estado do Ceará. **Arquivo de Ciências do Mar**. Fortaleza, v. 33, n. 1-2, p. 5-15, 2000.

FONTELES-FILHO, A.A. Oceanografia, biologia e dinâmica populacional de recursos pesqueiros. Fortaleza: **Expressão Gráfica e editora**. 2011.

FORBES, B.; SAHM, D.; WEISSFELD, A. Diagnóstico microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. **Editorial Panamericana SA Argentina**, 2009.

FOYSAL, M. J. Host habitat shapes the core gut bacteria of decapod crustaceans: A meta-analysis. **Heliyon**. 9:e16511, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16511>

FOYSAL, M. J.; DAO, T. T. T.; FOTEDAR, R.; GUPTA, S. K.; TAY, A. & CHAKLADER, M.R. Sources of protein diet differentially stimulate the gut and water microbiota under freshwater crayfish, marron (*Cherax cainii*, Austin 2002) culture. **Environmental Microbiology Reports**. 2022. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13049>.

FRAUNE, S. AND ZIMMER, M. Specificity of the Host Environment Transmitted Mycoplasma-Like Isopods Symbiotes. **Environmental Microbiology**. 10, 2497-2504, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01672.x>

GAO, S.; PAN, L.; HUANG, F.; SONG, M.; TIAN, C.; ZHANG, M. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**. 499, 109–118, 2019.

GATESOUBE, F. J.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; CAHU, C.; QUAZUGUEL, P. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: The effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. **Aquaculture**. 158, 117–127, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00179-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00179-8).

GLASS, H. J. & STARK, J. R. Protein digestion in the European lobster, *Homarus gammarus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 108:2, 225-235, 1994.

GOULDEN, E. F.; HALL, M. R.; BOURNE, D. G.; PEREG, L. L.; HØJ, L. Pathogenicity and infection cycle of *Vibrio owensii* in larviculture of the ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*). **Applied and Environmental Microbiology**. 78 (8), 2841–2849, 2012.

GRZEŚKOWIAK, L.; COLLADO, M.; SALMINEN, S. Evaluation of aggregation abilities between commensal fish bacteria and pathogens. **Aquaculture**. v. 356357, p. 412-414, 2012.

GUILLÉN-WATSON, R.; ARIAS-ANDRES, M.; ROJAS-JIMENEZ, K. & WEHRTMANN, I. S. Microplastics in feed cause sublethal changes in the intestinal microbiota and a non-specific immune response indicator of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae). **Frontiers in Microbiology**. 14:1197312, 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1197312

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**. 2, 95–107, 2004.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: an update, **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. 5, 21–29, 2013.

- HAMMER, H. S., BISHOP, C. D. & WATTS, S. A. Activities of three digestive enzymes during development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). **Journal of Crustacean Biology**. 20, 614–620, 2000.
- HAN, M.; GAO, T.; LIU, G.; ZHU, C.; ZHANG, T.; SUN, M.; LI, J.; JU, F.; SI, Q. & JIANG, Q. The effect of a polystyrene nanoplastic on the intestinal microbes and oxidative stress defense of the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. **Science of the Total Environment**. 833:155722, 2022.
- HANDLINGER, J.; CARSON, J.; RITAR, A. J.; CREAR, B. J.; TAYLOR, D. P.; JOHNSTON, D. In: Disease conditions of cultured phyllosoma larvae and juveniles of the southern rock lobster (*Jasus edwardsii*, Decapoda; Palinuridae). Proceedings of the International Symposium on Lobster Health Management. **Curtin University of Technology, Perth**. Australia, pp. 75–87, 1999.
- HARRIS, L. J.; OWENS, L. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 38, p.11-22, 1999.
- HARRIS, J. M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. **Microbiology Ecology**. v. 25, p.195-231, 1993.
- HENDERSON, R. J. & MILLAR, R. M. Characterization of lipolytic activity associated with a *Vibrio* species of bacterium isolated from fish intestines. **Journal of Marine Biotechnology**. 6(3):168-73, 1998. PMID: 9701639.
- HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. & SÖDERHÄLL, I. Intestinal microbiome in crayfish: Its role upon growth and disease presentation. **Developmental and Comparative Immunology**. 145:104703, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104703>
- HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.; ZAMORA-BRISEÑO, J. A.; SODERHALL, K. & SODERHALL, I. Gut microbiome alterations in the crustacean *Pacifastacus leniusculus* exposed to environmental concentrations of antibiotics and effects on susceptibility to bacteria challenges. **Developmental and Comparative Immunology**. 126, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104181>
- HOLT, C.C.; VAN DER GIEZEN, M.; DANIELS, C.L.; STENTIFORD, G.D.; BASS, D. Spatial and temporal axes impact ecology of the gut microbiome in juvenile European lobster (*Homarus gammarus*). **Isme Journal**. 14:531–543, 2020; <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0546-1>
- HOLTHUIS, L.B. FAO SPECIES CATALOGUE An Annotated and illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries Known to Date. **Fao Fisheries Synopsis**. v. 13, n.125, p. 292, 1991.
- HUANG, Q.; ZHU, Y.; YU, J.; FANG, L.; LI, Y.; WANG, M.; LIU, J.; YAN, P.; XIA, J.; LIU, G.; YANG, X.; ZENG, J.; GUO, L. & RUAN, G. Effects of sulfated β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, antioxidant ability, nonspecific immunity, and intestinal flora of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Fish and Shellfish Immunology**. 127:891–900, 2022.

HUANG, X.; LI, M.; HUANG, Y.; YANG, H.; GENG, Y.; OUYANG, P.; CHEN, D.; YIN, L.; YANG, S.; JIANG, J.; LUO, W. & HE, Z. Microbiome analysis reveals microecological advantages of emerging ditchless rice-crayfish co-culture mode. **Frontiers in Microbiology**. 13:892026, 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.892026

HUGH, R. & E, LEIFSON. O significado taxonômico do metabolismo fermentativo versus oxidativo de carboidratos por vários bastonetes gram-negativos. **Journal of Bacteriology**. 66:24–26, 1953.

ITOI, S.; OKAMURA, T.; KOYAMA, Y.; SUGITA, H. Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of japanese coastal fishes. **Canadian Journal of Microbiology**. 52, 1158–1163. 2007. <https://doi.org/10.1139/w06-082>

JAYASREE, L.; JANAKIRAM, P.; MADHAVI, R. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **Journal World Aquaculture Society**. 37 (4), 523–532, 2006.

JIRAVANICHPAISAL, P.; ROOS, S.; EDSMAN, L.; LIU, H. & SODERHALL, K. 2009. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 101:56–66, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.002>

JOHNSON, C. N.; BARNES, S.; OGLE, J.; GRIMES, D. J.; CHANG, Y. J.; PEACOCK, A. D. & KLINE, L. Microbial community analysis of water, foregut, and hindgut during growth of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in closed-system aquaculture. **Journal World Aquaculture Society**. v. 39, n. 2, p. 251-258, 2008.

JUNG, J.; GILLEVET, P. M.; SIKAROODI, M.; J. ANDREWS, J.; SONG, B. & SHIELDS, J. D. Comparative study of the hemolymph microbiome between live and recently dead American lobsters *Homarus americanus*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 143:147–158, 2021. <https://doi.org/10.3354/dao03568>

KADENBACH, B. Regulation of mitochondrial respiration and ATP synthesis via cytochrome *c* oxidase. **Rendiconti Lincei Scienze fisiche e Naturali**. 29:421–435, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0710-y>

KALPANA, B. J.; AARTHY, S.; PANDIAN, S. K. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 167(6):1778–1794, 2012.

KAMO, T.; AKAZAWA, H.; SUDA, W.; SAGA-KAMO, A.; SHIMIZU, Y.; YAGIY, H.; LIU, Q. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. **PLOS ONE**. 12, e0174099, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174099>.

KENNEDY, B., VENUGOPAL, M. N., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I., Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in the hatchery system. **Aquaculture**. 261 (4), 1156–1167, 2006.

KUMAR, A.G.; BASKAR, B.; SANTHANAKUMAR, J.; VINITHKUMAR, N.V.; VIJAYAKUMARAN, M.; KIRUBAGARAN, R. Diversity and functional properties of

intestinal microbial flora of the spiny lobster *Panulirus versicolor* (Latreille, 1804). **Journal of the Marine Biological Association of India**. 52, 282–285, 2010.

KUMAR, T. S.; VIDYA, R.; KUMAR, S.; ALAVANDI, S. V.; VIJAYAN, K. K. Zoea-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. **Aquaculture**. 479, 759–767, 2017.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. **John Wiley and Sons**. 115-175, 1991.

LAWLEY, T D.; WALKER, A W. Intestinal colonization resistance. **Immunology**. 138:1–11, 2013.

LECLERCQ, S.; MATAMOROS, S.; CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; JAMAR, F.; STÄRKEL, P.; WINDEY, K.; TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F.; VERBEKE, K.; DE TIMARY, P.; DELZENNE, N. M. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**. 111(42):E4485-93, 2014. doi: 10.1073/pnas.1415174111.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**. v.191, p.121-131, 2000.

LEIN, E. Y.; LAL, M. T. M.; MARAN, B. A. V.; CH'NG, C. L.; HAMASAKI, K.; SANO, M. & TUZAN, A. D. Gastrointestinal Microbiota of Spiny Lobster: A Review. **Fishes**. 7(3), 108, 2022. <https://doi.org/10.3390/fishes7030108>

LEVY, C. E. Manual de Microbiologia Clínica para controle de infecções em serviços de saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2004.

LEZUTEKONG, J. N.; NIKHANJ, A.; OUDIT, G.Y. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in cardiovascular disease. **Clinical Science**. 132, 901–904, 2018. <https://doi.org/10.1042/cs20180172>.

LI, M; WANG, J.; DENG, H.; LI, L.; HUANG, X.; CHEN, D.; OUYANG, P.; GENG, Y.; YANG, S.; YIN, L.; LUO, W. & JIANG, J. The Damage of the Crayfish (*Procambarus clarkii*) Digestive Organs Caused by *Citrobacter Freundii* Is Associated With the Disturbance of Intestinal Microbiota and Disruption of Intestinal-Liver Axis Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 12:940576, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.940576.

LIMA, A. de S. *Vibrio* em camarão e na água de três fazendas de carcinicultura do Ceará. 2007. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2007.

LINTON, S. M.; ALLARDYCE, B. J.; HAGEN, W.; WENCKE, P.; SABOROWSKI, R. Food utilization and digestive ability of aquatic and semi-terrestrial crayfishes, *Cherax destructor* and *Engaeus sericatus* (Astacidae, Parastacidae). **Journal of Comparative Physiology B**. vol. 179, n° 4, pp. 493-507, 2009.

LIU, P. C.; LEE, K. K; CHEN, S. N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Letter in Applied Microbiology**. v.22, p. 413-416, 1996.

LIU, S.; QI, C., JIA, Y.; GU, Z. & LI, E. Growth and intestinal health of the red claw

crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared under different salinities. **Aquaculture**. 524, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735256>

LUCENA-FRÉDOU, F.; EDUARDO, L. N.; LIRA, A. S.; PELAGE, L. PASSARINE, R. & FREDOU, T. Atividade pesqueira artesanal no Nordeste do Brasil. In: VIANA, D. de L.; OLIVEIRA, J. E. L.; HAZIN, F. H. V. & SOUZA, M. A. C. Ciências do mar: dos oceanos do mundo ao nordeste do Brasil: bioecologia, pesca e aquicultura: 1. ed. **Olinda: Via Design Publicações**. v.2, 2021.

MANCUSO, M.; COSTANZO, M.; MARICCHIOLO, G.; GRISTINA, M.; ZACCONE, R.; CUCCU, D.; GENOVESE, L. Characterization of chitinolytic bacteria and histological aspects of Shell Disease Syndrome in European spiny lobster (*Palinurus elephas*) (Fabricius 1787). **Journal of Invertebrate Pathology**. 104, 242-244. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.009>

MATHEW, A.; JOSEPH, I. Characterization of functionally diverse intestinal bacterial flora of *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758) along the southwest coast of India. **Journal of the Marine Biological Association of India**. 61, 38–43, 2019.

MELO, P. A. M. C.; OTSUKA, A. Y.; GREGO, C. K. S.; ESKINAZI-LEÇA, E. Ciências do Mar: uma visão sobre o Nordeste do Brasil. **Ed. Via Design Publicações**, p.42-65, 2021.

MENEZES, F. G. R. Diversidade de *Vibrio* spp. em estuários no estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura. Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. **Universidade Federal do Ceará**, ano de obtenção: 2005.

MENEZES, M. F. Alimentação de lagostas do gênero *Panulirus* White, na plataforma continental do estado do Ceará, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, VI, 1989, Teresina. **Anais. Teresina: Associação dos Engenheiros de Pesca do Estado do Piauí**. pp.67-80, 1991.

MERES, N. J.; AJUZIE, C. C.; SIKAROODI, M.; VEMULAPALLI, M.; SHIELDS, J. D. & GILLEVET, P. M. Dysbiosis In Epizootic Shell Disease Of The American Lobster (*Homarus Americanus*). **Journal Of Shellfish Research**. 31(2), 463-472. 10.2983/035.031.0206, 2012.

MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T. M.; BØGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGØ, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**. 302, 1–18, 2010.

MEZITI, A.; MENTE.; KORMAS, K. A. Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. **Systematic and Applied Microbiology**. 35:473–82, 2012.

MEZITI, A.; RAMETTE A.; MENTE, E.; KORMAS, K. R. Temporal shifts of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) gut bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**. 74:472–84, 2010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39149-7>.

MOHAMAD, N.; AMAL, M. N. A.; YASIN, I. S. M.; SAAD, M. Z.; SHAQINAH, N. N.; AL-SAARI, N.; MINO, S.; SAWABE, T. Vibriosis in cultured marine fishes: a review. **Aquaculture**. 512, 734289, 2019.

MOSS, S. M.; LEAMASTER, B.R.; SWEENWT, J. N. Relative abundance and species composition of Gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. **Journal of World Aquaculture Society**. v. 31, n.2, p.255-263, 2000.

MUNIZ, T. S. Ouro do mar: do surgimento da indústria da pesca da lagosta no Brasil à condição de pescador artesanal na história no tempo presente (1955 – 2000): uma narrativa sócio-histórico marítima. Dissertação (Mestrado em História) – **Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, p.133, 2005.

MUÑOZ, M., VANDENBULCKE, F., GARNIER, J., GUEGUEN, Y., BULET, P., SAULNIER, D., BACHÈRE, E., Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. **Cellular and Molecular Life Sciences – CMLS**. 61 (7–8), 961–972, 2004.

NAVES, P. L. F.; PINTO SANTANA, D.; LEÃO RIBEIRO, E.; SEVERO MENEZES, A. C. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. [S. l.], v. 12, n. 2, p. 229–233, 2013. DOI: 10.9771/cmbio.v12i2.6953. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/6953>. Acesso em: 10 maio. 2022.

NÓBREGA, M. F de.; LESSA, R. P. Descrição e composição das capturas da frota pesqueira artesanal da região nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**. v.40, n.2, p.64-74, 2007.

NOGA, E.J., SMOLOWITZ, R., KHOO, L.H. Pathology of shell disease in the blue crab, *Callinectes sapidus Rathbun*, (Decapoda: Portunidae). **Journal of Fish Diseases**. Fortaleza, 23 (6), 389–399, 2000.

OCEANA. Avaliação de estoque da lagosta-vermelha (*Panulirus argus*). **Oceana Brasil**, Brasília. 28 p, 2020.

OGIERMAN, M. A.; FALLARINO, A.; RIESS, T.; WILLIAMS, S. G.; ATTRIDGE, S. R.; MANNING, P.A. Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon lipAB and a protease gene downstream of the hly region. **Journal Bacteriology**. 179:7072-80, 1997.

OLIVEIRA, A. V. S. ANÁLISE DO PROCESSO DE VERIFICAÇÃO DA PESCARIA DE LAGOSTAS NA COMUNIDADE DE REDONDA, ICAPUÍ - C. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2018.

OLIVEIRA, S. J. Microbiologia Veterinária, Guia Bacteriológico Prático. **Canoas: ULBRA**, 2ª Edição, 2000.

OOI, M. C; GOULDEN, E.F; SMITH, G.G; BRIDLE, A.R. Haemolymph microbiome of the cultured spiny lobster *Panulirus ornatus* at different temperatures. **Scientific Reports**. 9:1677, 2019.

OOI, M. C.; GOULDEN, E. F.; SMITH, G. G.; NOWAK, B. F. & BRIDLE, A. R. Developmental and gut-related changes to microbiomes of the cultured juvenile spiny lobster *Panulirus ornatus*. **FEMS Microbiology Ecology**. 93, 2017.

<https://doi.org/10.1093/femsec/fix159>

OXLEY, A. P. A.; SHIPTON, W.; OWENS, L.; MCKAY, D. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. **Journal of applied microbiology**. v. 93, p. 214-223, 2002.

PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L. & RESENDE, L.M. Avanços na composição da Methodi Ordinatio para revisão sistemática de literatura. **Ciência da Informação**, 46, (2):161-187, 2017.

PAGANI, R. N.; KOVALESKI, J. L. & RESENDE, L.M. Methodi Ordinatio: a proposed methodology to select and rank relevant scientific papers encompassing the impact factor, number of citation, and year of publication. **Scientometrics**. 105(3):2109–2135, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11192-015-1744-x>

PALM, N.W.; DEZOETE, M.R.; FLAVELL, R.A. Immune-microbiota interactions in health and disease. **Clinical Immunology**. 159, 122–127, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.05.014>.

PANDEY, P. K.; BHARTI, V.; KUMAR, K. Biofilm in aquaculture production. **Journal of Microbiology Research**. [s.l], v.8, p.1434-1443, 2014.

PAVASOVIC, A.; ANDERSON, A. J.; MATHER, P. B.; RICHARDSON, N. A. “Effect of a variety of animal, plant and single cell-based feed ingredients on diet digestibility and digestive enzyme activity in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868),” **Aquaculture**. v. 272, n.1-4, pp. 564-572, 2007.

PERERA, E. & SIMON, C. Digestive physiology of spiny lobsters: implications for formulated diet development. **Reviews Aquaculture**. 6, 1–19, 2015. <https://doi.org/10.1111/raq.12066>.

PÉREZ, T.; BALCÁZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; HALAIHEL, N.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; MÚEZQUIZ, J.A.; ZAMORA-BRISEÑO, *et al.* Journal of Invertebrate Pathology 176 (2020) 107457 7J.L. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. **Mucosal Immunology**. 3, 355–360, 2010 <https://doi.org/10.1038/mi.2010.12>.

PORTER, L.; BUTLER IV, M.; REEVES, R. H. Normal bacterial flora of the spiny lobster *Panulirus argus* and its possible role in shell disease. **Marine and Freshwater Research**. 52 (8), 1401–1405, 2001.

PREFEITURA DE ICAPUÍ. Secretaria de Desenvolvimento, Trabalho, Agricultura, Meio Ambiente e Pesca. Relatório 2019: Pesca e Aquicultura. Icapuí: **Secretaria de Desenvolvimento, Trabalho, Agricultura, Meio Ambiente e Pesca**, 2019.

QIAO, F.; LIU, Y.; SUN, Y.; WANG, X.; CHEN, K.; LI, T. Y.; LI, E.; ZHANG, M. L. Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. **Aquaculture Nutrition**. 22, 2016. DOI: 10.1111/anu.12412.

QUINN, R. A.; CAWTHORN, R. J.; SUMMERFIELD, R. L.; SMOLOWITZ, R.; CHISTOSERDOV, A. Y. Bacterial communities associated with lesions of two forms of shell

diseases in the American lobster (*homarus americanus*, Milne Edwards) from Atlantic Canada. **Canadian Journal of Microbiology**. 59, 389-390. 2013.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0679>

RADHAKRISHNAN, E. V.; KIZHAKUDAN, J. K. Health Management in Lobster Aquaculture. In: Lobsters: Biology. **Fisheries and Aquaculture Springer**, Singapore, p. 571-601, 2019.

RAHMAN, F.; ISMIATI, I.; NURHASANAH, A. Distribusi Bakteri Penghasil Enzim Ekstraseluler Pada Saluran Pencernaan Lobster Mutiara (*Panulirus ornatus*). **Jurnal Sains Teknologi dan Lingkungan**. 5, 71-82, 2019.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. M.; HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of *Vibrio* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 88:589-92, 1993.

RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; CARPIO, Y.; RAMOS, L.; PONS, T.; FARNÓS, O.; IGLESIAS, C.; SÁNCHEZ DE MELO, I.; RAMOS, Y.; PENDÓN, C.; ESTRADA, M.P. & BOLÍVAR, J. New aspects concerning the characterization and the relationship with the immune response in vivo of the spiny lobster *Panulirus argus* nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**. 25, 396-406, 2011.

RODRÍGUEZ-VIERA, L.; ALPÍZAR-PEDRAZA, D.; MANCERA, J. M. PEREIRA, E. Toward a More Comprehensive View of α -Amylase across Decapods Crustaceans. **Biology**. 22;10(10):947, 2021. doi: 10.3390/biology10100947.

ROHANI, M. F.; ISLAM, S. M.; HOSSAIN, M. K.; FERDOUS, Z.; SIDDIK, M. A.; NURUZZAMAN, M.; PADENIYA, U.; BROWN, C.; SHAHJAHAN, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. **Fish Shellfish Immunology**. 120, 569–589, 2022,

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

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

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A.R. Sequenciamento de DNA com inibidores de terminação em cadeia. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**. 1977;74(12):5463-7. DOI:10.1073/pnas.74.12.5463. PMID: 271968

SANTANA, J. V. M.; NEVES, S. D. S.; SARAIVA, S. Z. R.; ADAMS, C.; CRUZ, R. Current management and externalities in lobster fisheries exploitation on the continental shelf of Ceará, Brazil. **Arquivo de Ciências do Mar**. Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 05- 18, 2015.

SANTOS, W. Análise da Balança Comercial de Pescado 2019 – Parte 2 (item exportação). Disponível em: [www.seafoodbrasil.com.br/análise da Balança Comercial de Pescado 2019 – Parte 2](http://www.seafoodbrasil.com.br/análise-da-Balança-Comercial-de-Pescado-2019-Parte-2) - **Seafood Brasil**, 2019. Acessado em: 16/06/2021.

- SCHMITT, P.; ROSA, R.; DUPERTHUY, M.; DE LORGERIL, J.; BACHÈRE, E. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. **Frontiers in Microbiology**. 3:160, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00160.
- SCHRYVER, P.; DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? **PLOS Pathogens**. 10(4), 2014.
- SCOTT, J. R.; THUNE, R. L. Bacterial flora of hemolymph from red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* (Girard), from commercial ponds. **Aquaculture**. 58, 161-165, 1986.
- SEMOVA, I.; CARTEN, J.D.; STOMBAUGH, J.; MACKEY, L. C.; KNIGHT, R.; FARBER, S. A.; RAWLS, J. F. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. **Cell Host Microbe**. 12, 277-288, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.003>.
- SHIELDS, J. D. Diseases of spiny lobsters: a review. **Journal of Invertebrate Pathology**. 106 (1), 79–91, 2011.
- SILVA, K. C. A.; BOTELHO, K. B.; CINTRA, I. H. A.; ARAGÃO, J. A. N. Parâmetros reprodutivos da lagosta-vermelha *Panulirus argus* (Latreille, 1804), na costa norte do Brasil. **Boletim Técnico Científico do CEPNOR**. Belém, PA, v. 8, n. 1, p. 27 – 39, 2008.
- SOARES, C. N. C. & PERET, A. C. Tamanho médio de primeira maturação da lagosta *Panulirus argus* (Latreille), no litoral do estado do Ceará, Brasil. **Arquivo de Ciências do Mar**. Fortaleza, v. 31, n. 1-2, p. 5-16, 1998a.
- SOARES, C. N. C. & PERET, A. C. Tamanho médio de primeira maturação da lagosta *Panulirus laevicauda* (Latreille), no litoral do estado do Ceará, Brasil. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 31, n. 1-2, p. 17-27, 1998b.
- SOONTHORNCHAI, W.; CHAIYAPECHARA, S.; JARAYABHAND, P.; SODERHALL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Interaction of *Vibrio* spp. with the Inner Surface of the Digestive Tract of *Penaeus monodon*. **PLOS One**, 10(8):e0135783. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0135783.
- SOTO-RODRÍGUEZ, S. A.; SIMOES, N.; ROQUE, A.; GIL, B. G. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. **Aquaculture**. 258 (1-4), 109-115, 2006.
- STALEY, J. T.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R. & GARRITY, G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria*. 2th ed. New York: **Springer**. v. 2, part B, p.1388, 2005.
- STECHER, B.; HARDT, W. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. **Current Opinion in Microbiology**. v. 14, n. 1, p. 82-91, 2011. DOI: 10.1016/j.mib.2010.10.003.
- STOCK, C. A.; JOHN, J.G.; RYKACZEWSKI, R. R.; ASCH, R.G.; CHEUNG, W. W. L.; DUNNE, J. P.; FRIEDLAND, K. D.; LAM, V. W. Y.; SARMIENTO, J. L.; WATSON, R. A.

Reconciling fisheries catch and ocean productivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**. 114(8):E1441-E1449. 2017. doi: 10.1073/pnas.1610238114.

SUGITA, H.; UEDA, R.; BERGER, L.R.; DEGUCHI, Y. Microflora in the gut of Japanese coastal crustacea. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 53, 1647-1655, 1987.

SULLIVAN, T. J.; NEIGEL, J. E. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. **Journal of Invertebrate Pathology**. 151, 82-90, 2018.

TALL, B. D.; FALL, S.; PEREIRA, M. R.; RAMOS-VALLE, M.; CURTIS, S. K.; KOTHARY, M. H.; CHU, D. M. T.; MONDAY, S. R.; KORNEGAY, L.; DONKAR, T.; PRINCE, D.; THUNBERG, R. L.; SHANGRAW, K. A.; HANES, D. E.; KHAMBATY, F.M.; LAMPEL, K. A.; BIER, J. W.; BAYER, R. C. Characterization of *Vibrio fluvialis-like* strains implicated in limp lobster disease. **Applied and Environmental Microbiology**. 69 (12), 7435–7446, 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G. & KUMAR, S. *Molecular Biology and Evolution*, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>. Acessado: 12 de agosto de 2023.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TIETJEN, M. “You are what you eat”: How diet can influence the gut microbiota of marine invertebrates, School of Marine Science and Engineering, Faculty of Science and the Environment, Plymouth University, Drake Circus, Plymouth, Devon, PL4 8AA. **The Plymouth Student Scientist**. 7, (2), 203-211, 2014.

TIRLONI, E.; STELLA, S.; GENNARI, M.; COLOMBO, F. & BERNARDI, C. American Lobsters (*Homarus Americanus*) not Surviving During Air Transport: Evaluation of Microbial Spoilage. **Italian Journal Food Safety**. 2; 5(2):5620, 2016 doi: 10.4081/ijfs.2016.5620. PMID: 27800442; PMCID: PMC5076735.

TOURINHO, J. L.; SOLÉ-CAVA, A. M & LAZOSKI, C. Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*. **Marine Biology**. [S.l.], v. 159, n. 9, p. 1897-1906, 2012.

TOUTAIN, C. M.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Molecular basis of biofilm development by *Pseudomonads*. In: Ghannoum, M., O'Toole, G.A. (Eds.), *Bacterial Biofilms*. **ASM Press**. Washington, DC, pp. 43-63, 2004.

TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; HERRERA, R. R.; *et al.* Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Springer plus**. v. 3:280, 2014. doi: 10.1186/2193-1801-3-280. eCollection.

UEDA, R.; SUGITA, H.; DEGUCHI, Y. The intestinal microflora of the Japanese spiny lobster and other coastal animals. **Crustaceana**. 68, 170–173, 1995.

- URAKAWA, H., RIVERA, I. N. Aquatic environment. In: THOMPSON, F.L., AUSTIN, B., SWINGS, J. (Eds.), *The Biology of Vibrios*. **American Society for Microbiology**, Washington D.C., p. 175-189, 2006.
- VALENTE, C. de S. & WAN, A. H. L. *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. **Journal of Invertebrate Pathology**. 181(2021): 107527, 2021.
- VASCONCELOS, M.; DIEGUES, A.C. & SALES, R. R. de. Alguns aspectos relevantes relacionados à pesca artesanal costeira nacional. São Paulo: **NUPAUB**, Universidade de São Paulo, 2007.
- VAUGHN, S. N. & JACKSON, C. R. Evaluating Methods of Preserving Aquatic Invertebrates for Microbiome Analysis. **Microorganisms**. 10: 811, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040811>
- VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M. & MUDER, R. R. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**. 35:570-5, 2002.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 64, 655–671, 2000.
- VEZZULLI, L.; COLWELL, R. R. & PRUZZO, C. Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. **Microbial Ecology**. 65:(4), 817-825, 2013.
- VIEIRA, R. H. S. F & TÔRRES, R. C. O. Contagem Padrão em Placas (CPP) de microrganismos aeróbios viáveis, p.211-217, in: Vieira, R.H.S.F (ed.), *Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado – teoria e prática*. **Varela**. p. 380, São Paulo, 2004.
- VIEIRA, R. H. S. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MARQUES, L. C.; MARTINS, P. C. C.; MONTEIRO, C. M. & CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp. E suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, 33:107-112, 2000.
- VOGT, G. Functional anatomy. In: *Biology of Freshwater Crayfish* (Holdrich, D.M. ed.), p. 105-107. **Blackwell Science**, New York, NY, 2002.
- WAN, J.; XI, Q.; TANG, J.; LIU, T.; LIU, C.; LI, H.; GU, X.; SHEN, M.; ZHANG, M.; FANG, J. & MENG, X. Effects of Pelleted and Extruded Feed on Growth Performance, Intestinal Histology and Microbiota of Juvenile Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). **Animals**. 12, 2252, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12172252>
- WANG, X. W. & WANG, J. X. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. **Molecular Immunology**. 68, 404-411, 2015.
- WANG, Y.; WANG, C.; CHEN, Y.; ZHANG, D.; ZHAO, M.; LI, H. & GUO, P. Microbiome Analysis Reveals Microecological Balance in the Emerging Rice-Crayfish Integrated Breeding Mode. **Frontiers in Microbiology**. 12, 2021.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669570>

WAŚKIEWICZ, A. & IRZYKOWSKA, L. *Flavobacterium* spp. Characteristics, Occurrence, and Toxicity. **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. 1, 938-942, 2014.

WHITTEN, M. M. A.; DAVIES, C. E.; KIM, A.; TLUSTY, M.; WOOTTON, E. C.; CHISTOSERDOV, A. & ROWLEY, A. F. Cuticles of European and American lobsters harbor diverse bacterial species and differ in disease susceptibility. **Microbiology open**. 3(3):395-409. doi: 10.1002/mbo3.174, 2014.

WU, Z.; ZHANG, Q.; ZHANG, T.; CHEN, J.; WANG, S.; HAO, J.; LIN, Y. & LI, A. Association of the microbiota dysbiosis in the hepatopancreas of farmed crayfish (*Procambarus clarkii*) with disease outbreaks. **Aquaculture**. 536, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736492>

XAVIER, R.; SOARES, M. C.; SILVA, S. M.; BANHA, F.; GAMA, M.; RIBEIRO, L.; ANASTACIO, P. & CARDOSO, S. C. Environment and host-related factors modulate gut and carapace bacterial diversity of the invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Hydrobiologia**. 848:4045-4057, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04623-9>

XUE, M.; JIANG, N.; FAN, Y.; YANG, T.; LI, M.; LIU, W.; LI, Y.; LI, B.; ZENG, L. & ZHOU, Y. White spot syndrome virus (WSSV) infection alters gut histopathology and microbiota composition in crayfish (*Procambarus clarkii*). **Aquaculture Reports**. 22:101006, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101006>

XU, L.; YUAN, J.; CHEN, X.; ZHANG, S.; XIE, M.; CHEN, C.; WU, Z. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the digestive enzyme activity, immune, intestinal flora and WSSV resistance of *Procambarus clarkii*. **Aquaculture**. 540, 736748, 2021.

YILDIZ, F. H.; VISICK, K. L. Vibrio biofilms: so much the same yet so different. **Trends Microbiology**. 17(3):109-18, 2009. doi: 10.1016/j.tim.2008.12.004. Epub 2009 Feb 21. PMID: 19231189; PMCID: PMC2729562.

YONGE, C. M. Studies on the comparative physiology of digestion: II. The mechanism of feeding, digestion, and assimilation in *Nephrops norvegicus*. **Journal Experimental Biology**. 1: 343-389, 1924.

ZAMORA-BRISEÑO, J. A.; CERQUEDA-GARCÍA, D.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, I.M.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; HUCHÍN-MIAN, J. P.; BRIONES-FOURZÁN, P.; LOZANO-ÁLVAREZ, E. & RODRÍGUEZ-CANUL, R. Alterations in the gut-associated microbiota of juvenile Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) infected with PaV1. **Journal of Invertebrate Pathology**. 176:107457, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107457>

ZHA, H.; JEFFS, A.; DONG, Y.; LEWIS, G. Potential virulence factors of bacteria associated with tail fan necrosis in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. **Journal of Fish Diseases**. 41 (5), 817-828, 2018.

- ZHA, H.; LEWIS, G.; ALFARO, A.; WANG, S.; DONG, Y.; GRANDIOSA, R.; JEFFS, A. immune status of the spiny lobster *Jasus edwardsii* with tail fan necrosis. **Diseases of Aquatic Organisms**. 126, 229-238. 2017. <https://doi.org/10.3354/dao03176>
- ZHANG, L.; ZHOU, Y.; SONG, Z.; LIANG, H.; ZHONG, S.; YU, Y.; LIU, T.; SHA, H.; HE, L.; GAN, J. Mercury Induced Tissue Damage, Redox Metabolism, Ion Transport, Apoptosis, and Intestinal Microbiota Change in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*): Application of Multi-Omics Analysis in Risk Assessment of Hg, **Antioxidants**. 11, 1944, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11101944>
- ZHANG, X.; SUN, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, M.; LI, S. Hemolymph Microbiomes of Three Aquatic Invertebrates as Revealed by a New Cell Extraction Method. **Applied and Environmental Microbiology**. 2;84(8):e02824-17, 2018. doi: 10.1128/AEM.02824-17.
- ZHANG, Y.; LI, Z.; TIAN, X.; XU, P.; SUN, K. & REN, N. Acute toxic effects of microcystin-LR on crayfish (*Procambarus clarkii*): Insights from antioxidant system, histopathology and intestinal flora. **Environmental Science and Pollution Research**. 30:56608-56619, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26171-6>
- ZHANG, Y.; LI, Z.; ZHANG, Y.; SUN, K.; REN, N. & LI, M. Acute toxic effects of diclofenac exposure on freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*): Insights from hepatopancreatic pathology, molecular regulation and intestinal microbiota, **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 244:114068, 2022.
- ZHENG, J.; JIA, Y.; LI, F.; CHI, M.; CHENG, S.; LIU, S.; JIANG, W.; LIU, Y. Changes in the gene expression and gut microbiome to the infection of decapod iridescent virus 1 in *Cherax quadricarinatus*. **Fish and Shellfish Immunology**. 132:108451, 2023.
- ZHENG, Y., YU, M., LIU, J., QIAO, Y., WANG, L., LI, Z., ZHANG, X.H., YU, M. Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. **Frontiers in Microbiology**. 8, 1362, 2017.
- ZHOU, K.M.; ZHOU, F.; HUANG, J. H.; YANG, Q. B.; JIANG, S.; QIU, L. H.; YANG, L.; ZHU, C. Y.; JIANG, S. Characterization and expression analysis of a chitinase gene (PmChi-4) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogen infection and ambient ammonia nitrogen stress, **Fish Shellfish Immunol**. 62, 31–40, 2017.
- ZHU, X.; JI, L.; CHENG, M.; WEI, H.; WANG, Z. & NING, K. Sustainability of the rice-crayfish co-culture aquaculture model: microbiome profiles based on multi-kingdom analyses. **Environmental Microbiome**. 17:27, 2022. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00422-4>
- ZOKAEIFAR, H.; BALCÁZAR, J. L.; SAAD, C. R.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K.; ARSHAD, A. & NEJAT, N. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunology** 33(4):683-9, 2012.

APÊNDICE A - DECLARAÇÃO DE ACEITAÇÃO DE ARTIGO

CRUSTACEANA

INTERNATIONAL JOURNAL OF CRUSTACEAN RESEARCH

Published by KONINKLIJKE BRILL ACADEMIC PUBLISHERS N.V., LEIDEN, NETHERLANDS

TO WHOM IT MAY CONCERN

<i>Managing Editor:</i>	J.C. von Vaupel Klein
<i>Associate Editor:</i>	C.H.M. Franssen
<i>Other members Board of Editors:</i>	
K. Baba	E. Macpherson
J.A. Bazzaz	K. Martens
N.L. Bruce	P.K.L. Ng
Mrs. M. Charmantier-Doreau	S. Nishida
J.A. Coetzee	L.M. Parde-Saats
Mrs. D. Debye	V. Sbordoni
S. De Grave	H.-K. Schminke
B. Dirksen	F.R. Schram
G.A. Fragkiadakis	Mrs. M. Thessalou-Legaki
Mrs. S. Fratini	M. Thiel
Mrs. D.P.M. Galassi	W.C. Valenti
R.C. Gallego	H.P. Wagner
R.G. Harrell	X.-G. Wu
S. Harzsch	

Bilthoven, September 22nd, 2023

STATEMENT OF ACCEPTANCE

This is to certify that the manuscript:

A.V. DA S. OLIVEIRA, J. DE L. VIEIRA, H.D. MAIA, J. GAETA, O.V. DE SOUSA, J.L.S. DA SILVA & F.G.R. DE MENEZES, "Diversity of symbiotic bacteria in the digestive and circulatory systems of lobster and crayfish: important connections for efficient aquaculture. A systematic review."

has been accepted for publication in *CRUSTACEANA – International Journal of Crustacean Research*;

and will be published in the course of 2023, i.e., in one of the forthcoming issues of Volume 96;

and such as a regular research paper.

Thus duly signed at Bilthoven, on behalf of the Publisher and the Board of Editors,



Dr. J.C. von Vaupel Klein,
Managing Editor

DR. J.C. VON VAUPEL-KLEIN

CRUSTACEANA