

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**Isolamento e identificação de bactérias do trato  
digestório do camarão marinho (*Litopenaeus*  
*vannamei*) cultivado em sistema de bioflocos**

**Carla Ferreira Soares**

**BELO HORIZONTE**

**2018**

**Carla Ferreira Soares**

**Isolamento e identificação de bactérias do trato digestório do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema de bioflocos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Prof. Orientador: Kleber Campos Miranda Filho

Coorientadores: Cintia Labussière Nakayama

Marcelo Resende de Souza

**BELO HORIZONTE**

**2018**


S676i Soares, Carla Ferreira, 1974-  
Isolamento e identificação de bactérias do trato digestório do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema de bioflocos / Carla Ferreira Soares. – 2018.  
126 p. : il.

Orientador: Kleber Campos Miranda Filho  
Coorientadores: Cintia Labussière Nakayama, Marcelo Resende de Souza  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Camarão – Criação – Teses. 2. Produção animal – Teses. 3. Microbiota gastrointestinal – Teses. 4. Bactéria – Identificação – Teses. I. Miranda Filho, Kleber Campos. II. Nakayama, Cintia Labussière. III. Souza, Marcelo Resende de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

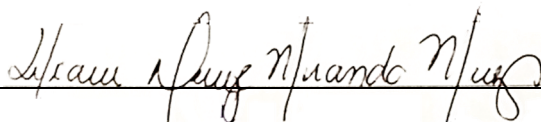
CDD – 639.543

Tese defendida e aprovada em 24 de janeiro de 2018 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:

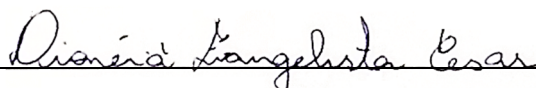


Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho

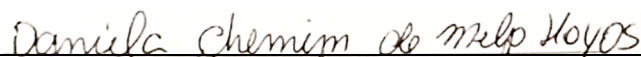
(Orientador)



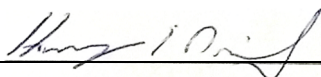
Dra. Liliae Denize Miranda Menezes



Prof. Dra. Dionéia Evangelista Cesar



Profa. Dra. Daniela Chemim de Melo



Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

"A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional".

Autor Desconhecido

*“Mesmo dentro da luta, a vitória de um indivíduo é fruto do trabalho de um time”*

Eduardo Almeida

## *Agradecimentos*

---

A gratidão de quem recebe um benefício é sempre menor que o prazer daquele que o faz  
(Machado de Assis)

Agradeço a Deus, não apenas pela conquista de mais um sonho, mas por mostrar-me que as dificuldades encontradas no caminho são bênçãos, pois olho para o lado e vejo as várias mãos que me apoiaram e juntas escrevemos mais uma parte da minha história.

Ao professor Marcelo, pela generosidade. Não há como expressar em palavras a minha gratidão pelos ensinamentos, dedicação, carinho, compreensão e amizade. Espero honrar o que aprendi seguindo seu exemplo.

Ao professor Kleber pela convivência, pelos ensinamentos, apoio na condução deste trabalho e compreensão nos momentos difíceis.

Aos professores que me incentivaram, orientaram e contribuíram de alguma maneira na execução deste projeto, especialmente Jacques Nicoli, Henrique, Lilian, Monique, Eduardo Turra, Israel, Edgar, Cintia, Paula e Daniela.

À professora Cláudia Penna pelos conselhos, orientações e sobretudo pelo ombro amigo nas horas difíceis.

Agradeço a valiosa e dedicada colaboração do Rommel, Felipe Melgaço, Felipe Machado, Ana Cláudia (e como é boa nisso!), Samantha, Marcela e Érica que tanto me ajudaram na função de “extrair o TGI dos camarões”. E aos amigos Naiara e Ranier que participaram e construíram comigo em cada etapa desta conquista.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente João, Léo e Daniel pela convivência e cooperação.

Ao sorriso acolhedor e alto astral da Gabriella Borba, que tornaram a rotina e dificuldades analíticas mais amenas. Claro que à sua paciência e disponibilidade para realizar às análises!

A todos os professores e funcionários do DTIPOA, em especial a professora Cléia, Maura, César, Cosme e Miltinho, pelo conhecimento, paciência e colaboração.

Aos laboratórios Aquacen (Professor Henrique César Pereira Figueiredo) e de Nutrição Animal pela grande colaboração tornando possível a realização deste trabalho.

Aos proprietários da carcinicultura, Daniel e Marcelo, pela fundamental participação e colaboração neste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa.

---

## SUMÁRIO

---

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
<b>2.1.</b>	<b>Panorama da carcinicultura mundial e brasileira</b>	18
<b>2.2.</b>	<b>O camarão branco do Pacífico, <i>Litopenaeus vannamei</i></b>	21
2.2.1.	Ciclo de vida dos camarões peneídeos	23
2.2.2.	Sistema digestivo dos camarões peneídeos	26
2.2.3.	Doenças dos camarões peneídeos	29
<b>2.3.</b>	<b>Sistema de bioflocos aplicado à carcinicultura</b>	31
<b>2.4.</b>	<b>Microbiota bacteriana em ambientes aquáticos de criação de camarão</b>	37
2.4.1.	Bactérias heterotróficas	38
2.4.2.	<i>Vibrio</i> spp.	39
<b>2.5.</b>	<b>Microbiota do trato gastrintestinal dos camarões peneídeos</b>	41
<b>2.6.</b>	<b>Uso de probióticos na carcinicultura</b>	45
<b>2.7.</b>	<b>Aplicação da espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na identificação de bactérias</b>	47
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	50
<b>3.1.</b>	<b>Local</b>	50
<b>3.2.</b>	<b>Material biológico e instalações</b>	50
<b>3.3.</b>	<b>Fertilização orgânica</b>	51
<b>3.4.</b>	<b>Monitoramento da qualidade da água do tanque de criação</b>	52
<b>3.5.</b>	<b>Coleta de amostras</b>	52
<b>3.6.</b>	<b>Análises laboratoriais</b>	54
3.6.1.	Análises microbiológicas	54
3.6.1.1.	Preparo das amostras de água, rações e produto comercial contendo probióticos	54
3.6.1.2.	Coleta e preparo das amostras do trato gastrintestinal dos camarões	55
3.6.1.3.	Isolamento, enumeração e identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) de bactérias do trato gastrintestinal dos camarões, da água do sistema de criação, das rações e do produto comercial contendo probiótico	56

3.6.1.3.1.	Enumeração de bactérias heterotróficas aeróbias marinhas	57
3.6.1.3.2.	Enumeração de bactérias heterotróficas totais	57
3.6.1.3.3.	Enumeração de <i>Vibrio</i> spp.	58
3.6.1.3.4.	Enumeração de bactérias ácido-láticas	58
3.6.1.3.5.	Enumeração de enterobactérias	58
3.6.1.3.6.	Enumeração de micro-organismos aeróbios	59
3.6.1.3.7.	Isolamento e seleção das colônias para identificação por espectrometria de massa	59
3.6.1.3.8.	Identificação das bactérias por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS)	60
3.6.1.4.	Pesquisa de doenças infecciosas de camarões	60
3.6.1.5.	Análise bromatológica das rações	61
3.6.1.6.	Análise estatística	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>4.1.</b>	<b>Análise da qualidade da água dos tanques de criação dos camarões</b>	<b>63</b>
<b>4.2.</b>	<b>Composição bromatológica das rações fornecidas aos camarões</b>	<b>68</b>
<b>4.3.</b>	<b>Enumeração de bactérias nas amostras de água</b>	<b>70</b>
<b>4.4.</b>	<b>Microbiota do trato gastrintestinal de camarões em diferentes fases de criação</b>	<b>75</b>
<b>4.5.</b>	<b>Microbiota nas diferentes porções do trato gastrintestinal dos camarões</b>	<b>82</b>
<b>4.6</b>	<b>Identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) de bactérias isoladas das amostras de água e trato gastrintestinal do camarão <i>L. vannamei</i></b>	<b>85</b>
<b>4.7</b>	<b>Diversidade e composição das amostras de água e do trato gastrintestinal de camarões</b>	<b>92</b>
<b>4.8.</b>	<b>Pesquisa de doenças infecciosas de camarões</b>	<b>101</b>
<b>4.9.</b>	<b>Avaliação microbiológica das rações e do produto comercial contendo probióticos</b>	<b>101</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>106</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Médias ( $\bar{x}$ ), desvios-padrão, coeficientes de variação (CV) e valores mínimos e máximos dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques, durante a criação de camarões <i>L. vannamei</i> em sistema de bioflocos	64
Tabela 2.	Composição nutricional das rações utilizadas nas diferentes fases da criação do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> , em sistema de bioflocos, com base nos níveis de garantia (NG) declarados nos rótulos e nos valores determinados nas análises laboratoriais	68
Tabela 3.	Resultados da enumeração de bactérias presentes nas amostras de água do poço, água do transporte das PL de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> e dos tanques em sistema de bioflocos, nas diferentes fases de criação	71
Tabela 4.	Médias ( $\bar{x}$ ), coeficientes de variação (CV) e intervalos de variação dos resultados da enumeração de bactérias heterotróficas totais e <i>Vibrio</i> spp. presentes no trato gastrointestinal de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> criados em sistema de bioflocos, em diferentes fases de criação	76
Tabela 5.	Mediana, médias ( $\bar{x}$ ), coeficientes de variação (CV) e valores mínimos e máximos dos resultados da enumeração de enterobactérias e bactérias ácido-láticas presentes no trato gastrointestinal de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> criados em sistema de bioflocos, em diferentes fases de criação	81
Tabela 6.	Médias ( $\bar{x}$ ), coeficientes de variação (CV) e valores mínimos e máximos dos resultados da enumeração de bactérias presentes nas diferentes	83
Tabela 7.	Contagens de bactérias totais e bactérias ácido-láticas nas rações utilizadas nas diferentes fases da criação do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> e no produto comercial contendo probiótico adicionado à água	102

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1.	Micro-organismos identificados por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), isolados de amostras de água e trato gastrointestinal de camarão, em diferentes fases de criação e porções de trato gastrointestinal, de acordo com o meio de cultura	86
-----------	---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Produção da carcinicultura brasileira (t) entre os anos de 1995 a 2015	20
Figura 2.	Exemplar juvenil do camarão da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	21
Figura 3.	Distribuição natural da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	22
Figura 4.	Ciclo de vida dos camarões peneídeos	24
Figura 5.	Anatomia do sistema digestivo de um camarão peneídeo	26
Figura 6.	Reação química de oxidação da amônia a nitrato	33
Figura 7.	Ciclo de nitrogênio em sistemas de bioflocos	36
Figura 8.	Distribuição específica de representantes da família Vibrionaceae em ambientes aquáticos	39
Figura 9.	Representação esquemática do mecanismo de funcionamento de MALDI-TOF MS	48
Figura 10.	Cronograma de coleta de amostras realizado em função da troca da ração fornecida aos camarões, criados em sistema de bioflocos	53
Figura 11.	Representação esquemática da divisão do trato gastrintestinal do camarão <i>L. vannamei</i> realizada para análises microbiológicas	56
Figura 12.	Temperaturas mínimas e máximas registrada entre 20 de junho e 13 de julho de 2017 na estação de Sete Lagoas, - MG	65
Figura 13.	Frequência de distribuição de espécies de <i>Vibrio</i> em amostras de água e trato gastrintestinal de camarões <i>L. vannamei</i> , em diferentes fases de criação em sistema de bioflocos	91
Figura 14.	Frequência de distribuição de filós bacterianos em amostras de água e trato gastrintestinal de camarões <i>L. vannamei</i> , em diferentes fases de criação em sistema de bioflocos	92
Figura 15.	Frequência de distribuição de gêneros bacterianos em amostras de água e trato gastrintestinal de camarões <i>L. vannamei</i> , em diferentes fases de criação em sistema de bioflocos	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Partes por mil equivalente a g/kg
ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
AHPND	Necrose Hepatopancreática Aguda
AM	Ágar Marinho
AOAC	<i>Official Methods of Analysis</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AQUACEN	Laboratório Nacional de Referência para Doenças de Animais Aquáticos
BHI	Infusão cérebro coração
C	carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
DZOO	Departamento de Zootecnia
EV	Escola de Veterinária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
g	grama
IHHNV	Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa
IMNV	Mionecrose Infecciosa
KCl	Cloreto de potássio
kg	quilograma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
L	litro
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MC	Ágar MacConKey
mg	miligrama
MRS	Ágar <i>Man-Rogosa-Sharpe</i>
N	nitrogênio
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NH <sub>3</sub>	amônia
NHP	Hepatopancreatite Necrosante
nm	nanômetro
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrato
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
PL	Pós-larva
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	fosfato
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RTqPCR	Reação de transcrição reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SPF	livres de patógenos específicos ( <i>Specific Pathogen Free</i> –SPF)
t	tonelada

TCBS	Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSV	Síndrome Taura
UFC	Unidade Formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
WSSV	Síndrome da Mancha Branca
YHV	Doença da Cabeça Amarela

## RESUMO

*Litopenaeus vannamei* é a principal espécie de camarão produzida comercialmente no mundo. O sistema de criação de camarões marinhos em bioflocos é uma alternativa aos sistemas convencionais pelo desenvolvimento de uma comunidade microbiana heterotrófica capaz de manter a qualidade de água e disponibilizar proteína microbiana como alimento. Nos animais aquáticos, acredita-se que a comunidade microbiana do trato gastrointestinal (TGI) seja influenciada pelo ambiente de criação, mas difere da microbiota do ambiente, podendo ser modificada por outros fatores, como a fase de desenvolvimento do animal. Neste estudo, foi avaliada a microbiota do TGI do camarão *L. vannamei* em cinco fases ao longo de um ciclo de produção: dez dias de pós-larva (PL<sub>10</sub>) e em quatro idades no sistema de bioflocos, após adaptação às diferentes rações de cada fase (CR1, CR2, CR3 e CR4). As contagens bacterianas da água do sistema de criação e do conteúdo de diferentes porções do TGI dos camarões foram comparadas. Utilizou-se metodologia dependente de cultivo em diferentes meios de cultura para a enumeração e o isolamento dos micro-organismos, seguida de identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF). A microbiota do TGI apresentou maiores contagens de micro-organismos do que as amostras de água. O filo Proteobacteria foi dominante na água do sistema de criação e nas amostras obtidas do sistema digestivo dos camarões, sendo *Vibrio* o gênero predominante. As médias das contagens de bactérias heterotróficas e de *Vibrio* spp. diferiram ( $p < 0,05$ ) entre CR1 e CR4, sugerindo um aumento da densidade microbiana no TGI com o aumento da idade do animal. Não houve uma variação na riqueza da microbiota do TGI dos camarões nas diferentes fases de criação, mas a composição da microbiota modificou-se: alguns gêneros ocorreram exclusivamente em uma determinada fase (*Enterobacter* verificado somente em CR1 e CR2). *Acinetobacter* e *Kocuria* foram identificados exclusivamente na microbiota do TGI da fase PL<sub>10</sub>, associada a outro ambiente de criação, demonstrando que este influencia a microbiota do TGI dos camarões. As comunidades bacterianas das diferentes porções do TGI dos camarões foram semelhantes em relação à composição de gêneros, constatando-se médias menores ( $p < 0,05$ ) de contagens de micro-organismos na porção anterior, comparada ao intestino médio. Os resultados demonstram que a comunidade bacteriana do TGI de *L. vannamei* é dinâmica, sendo influenciada pela fase de desenvolvimento do animal, pela porção do sistema digestivo e pelo meio ambiente no qual o animal é criado.

Palavras chave: *Litopenaeus vannamei*, microbiota gastrointestinal, bioflocos, fases de desenvolvimento

## ABSTRACT

*Litopenaeus vannamei* is the main commercially produced shrimp species in the world. The system of marine shrimp farming in bioflocs is an alternative to conventional systems by developing a heterotrophic microbial community capable of maintaining water quality and providing microbial protein as food. In aquatic animals, it is believed that the microbial community of the gastrointestinal tract (GIT) is influenced by the raising environment, but differs from the microbiota from the environment, and can be modified by other factors, such as the development stage of the animal. In this study, the microbiota of the gut of the *L. vannamei* shrimp was evaluated in five stages during a production cycle: ten days post-larvae (PL<sub>10</sub>) and four ages in the biofloc system, after adaptation to the different rations of each phase (CR1, CR2, CR3 and CR4). The bacterial water counts of the raising system and of the contents of different portions of the GIT of the shrimps were compared. Culture-dependent methodology was carried out using different culture media for enumeration and isolation of the microorganisms, followed by identification by mass spectrometry (MALDI-TOF). The GIT microbiota had higher counts of microorganisms than the water samples. Proteobacteria phylum was dominant in the water of the raising system and in the samples obtained from the digestive system of the prawns, being *Vibrio* the predominant genus. The mean counts of heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. differed ( $p < 0.05$ ) between CR1 and CR4, suggesting an increase in microbial density in GIT with increasing age of the animal. There was no change in the microbiota richness of the shrimp gut in the different raising phases, but the composition of the microbiota was modified: some genera occurred exclusively at a given stage (*Enterobacter* was verified only in CR1 and CR2). *Acinetobacter* and *Kocuria* were exclusively identified in the PL<sub>10</sub> microbiota associated to another raising environment, demonstrating that it influences the shrimp GIT microbiota. The bacterial communities of the different portions of the GIT of the shrimp were similar in relation to the composition of genders, with lower ( $p < 0.05$ ) mean counts of microorganisms in the anterior portion, compared to the medium intestine. The results demonstrate that the bacterial community of the *L. vannamei* GIT is dynamic, and is influenced by the stage of development of the animal, the portion of the digestive system and the environment in which the animal is raised.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, gastrointestinal microbiota, biofloc, development stages

## 1. INTRODUÇÃO

O trato gastrintestinal dos animais constitui um ecossistema complexo que abriga uma comunidade microbiana diversa. A influência desta microbiota na modulação do sistema imune (Smith *et al.*, 2013), na resistência à colonização por outros micro-organismos (Charlie *et al.*, 2013) e na nutrição dos hospedeiros animais tem sido intensivamente estudada em muitos modelos de organismos vertebrados (Laycock *et al.*, 2012). A composição da comunidade microbiana é hospedeiro-específica, evoluindo ao longo da vida do indivíduo e sendo suscetível a modificações. Sendo assim, a caracterização da microbiota intestinal dos animais tem sido o cerne para o entendimento das interações entre hospedeiros e micro-organismos, funcionalidades metabólicas no hospedeiro e o relacionamento com a saúde animal. Essas funções benéficas atribuídas à microbiota têm também despertado o interesse da aquicultura. Entretanto, o conhecimento sobre a ecologia microbiana do trato gastrintestinal das espécies aquáticas e suas interações ainda é limitado, sobretudo em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.

O camarão branco do Pacífico é a principal espécie de camarão produzida comercialmente no mundo. A alta adaptabilidade às condições climáticas devido à rusticidade, rapidez no crescimento e ampla faixa de tolerância à salinidade são características que justificam a preferência dos produtores de camarão por essa espécie e proporcionaram a expansão da carcinicultura brasileira. O desafio desse setor é expandir, tendo por base a sustentabilidade técnica, socioeconômica e ambiental, visando a minimização dos impactos socioambientais (Tahim, 2008). Para enfrentar esse desafio, é imprescindível que ocorram mudanças nos processos produtivos, com adoção de tecnologias menos degradantes, com redução do uso de recursos hídricos, emissão de efluentes e da disseminação de doenças. Entre as tecnologias que tiveram o seu desenvolvimento baseado nesses conceitos destaca-se a criação de camarões em meio heterotrófico, também denominado de sistema de bioflocos (Krummenauer, *et al.*, 2012). O sistema de bioflocos é formado por agregados microbianos que mantêm a qualidade da água utilizada na criação dos camarões e podem servir como fonte de alimento ao animal, contribuindo para a redução dos custos de produção (Emerenciano *et al.*, 2013).

Como há evidências de que o ambiente de criação influencia a composição da microbiota do trato gastrintestinal dos organismos aquáticos (Sullam *et al.*, 2012; Chaiyapechara *et al.*, 2012;

Rungrassamee *et al.*, 2014) e que a comunidade microbiana intestinal de vários animais é influenciada por hábitos alimentares de seus hospedeiros (Meziti *et al.*, 2012), a microbiota gastrintestinal dos animais criados em sistema de bioflocos pode estar relacionada à microbiota presente na água desse sistema de criação. Entretanto, apesar de ser influenciada pelo ambiente de criação, existem também evidências de que a comunidade bacteriana do trato gastrintestinal dos camarões difere da microbiota do ambiente que os circunda. As alterações na comunidade bacteriana gastrintestinal dos camarões podem associar-se às diferentes fases de desenvolvimento dos animais, decorrentes das alterações fisiológicas do sistema digestivo (Harris, 1993) e às diferentes regiões anatômicas de trato gastrintestinal, resultante das diferenças morfológicas e funcionais de cada uma delas (Johnson *et al.*, 2008). As modificações da composição, quantitativa e qualitativa, do ecossistema gastrintestinal dos animais podem resultar em uma menor imunidade, aumento do risco de colonização por micro-organismos patogênicos e desordens gastrintestinais (Zoetendal *et al.*, 2004). Por isso, existe um grande interesse na determinação da diversidade e estrutura microbiana gastrintestinal dos camarões.

Os métodos para o estudo da diversidade da microbiota gastrintestinal envolvem técnicas dependentes e independentes de cultivo. Devido a impossibilidade de fornecer condições similares às encontradas no ambiente natural, os métodos moleculares vêm sendo intensamente utilizados para a identificação e caracterização de bactérias, em abordagens independentes de cultivo (Tonini *et al.*, 2011). No entanto, os métodos de cultivo, que possibilitam a obtenção de culturas bacterianas puras, são fundamentais para a caracterização funcional definitiva das bactérias e a definição de suas atividades biológicas nas interações bactéria-hospedeiro e interações entre as bactérias, associadas à saúde ou determinantes de doenças do hospedeiro (Lau *et al.*, 2016; Rettedal *et al.*, 2014).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a comunidade bacteriana do trato gastrintestinal do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, criado em sistema de bioflocos, comparando as diferentes fases de criação, bem como as diferentes porções do trato gastrintestinal dos animais. Utilizou-se metodologia dependente de cultivo, com a adoção de diferentes meios de cultura para a enumeração e o isolamento dos micro-organismos, seguida de identificação por espectrometria de massa por ionização e desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Panorama da carcinicultura mundial e brasileira

A carcinicultura, produção de crustáceos em ambientes confinados, originou-se no sudoeste do continente asiático, com a finalidade de subsistência. Por muitos séculos a atividade manteve as características artesanais (Carvalho *et al.*, 2005). O principal obstáculo ao desenvolvimento do setor foi a reprodução em cativeiro (Chamberlain e Gervais, 1984). Os primeiros avanços tecnológicos ocorreram no Japão, na década de 1930, quando Motosaku Fujinaga iniciou trabalhos de larvicultura com o camarão *Marsupenaeus japonicus* e obteve desovas em laboratório (Chamberlain, 2011). Posteriormente, o desenvolvimento de técnicas para a indução da maturação sexual das fêmeas (King, 1948; Caillouet, 1972; Chamberlain e Gervais, 1984) e a reprodução, em cativeiro, do ciclo de vida completo dos camarões possibilitou a obtenção de pós-larvas e viabilizou a produção comercial de camarões marinhos em larga escala (Aquacop, 1979; Carvalho *et al.*, 2005). O processo de produção adotado na carcinicultura compreende basicamente duas fases: a larvicultura, produção de pós-larvas em laboratórios especializados, e a engorda, que consiste no crescimento dos animais até a obtenção de índices comercializáveis (Carvalho *et al.*, 2005).

Embora a carcinicultura tenha uma história recente em relação aos demais segmentos da aquicultura foi uma das atividades que mais se expandiu no mundo nas últimas décadas. A importância da carcinicultura para o atendimento à crescente demanda mundial por camarões pode ser melhor avaliada ao se analisar os dados reportados pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura). A produção mundial do setor, entre os anos de 1995 (928.329 t) e 2015 (4.875.793 t), apresentou um incremento de 425,23%, comparado com a produção extrativista que teve, entre 1995 (2.644.056 t) e 2015 (3.439.902 t), um aumento de 30,10% (FAO, 2017a; FAO, 2017b). Naturalmente, pode-se constatar que a produção de camarão advinda da aquicultura representou 58,63% da produção mundial de camarões, em 2015.

Sem dúvidas, a criação de peixes é o segmento mais importante da aquicultura, em termos quantitativos, representando 67,76% do total de 76.599.902 t de animais aquáticos produzidos

no mundo em 2015 (FAO, 2017a). Nesse mesmo ano, a carcinicultura representou 6,36% da produção de animais aquáticos (FAO, 2017b). No entanto, no mercado mundial, o camarão criado em cativeiro é uma das principais *commodities* e que, fomentado em bases sustentáveis, amplia a oferta e fortalece o comércio internacional. Em 2015, esse crustáceo foi responsável por 15,81% do valor total dos produtos de pescado comercializados internacionalmente (FAO, 2017a; FAO, 2017b).

A produção mundial de camarão proveniente da aquicultura concentra-se nos países das costas tropicais dos continentes asiático e americano. Em 2015, 99,78% do total de camarões provenientes da carcinicultura foram originários desses continentes, com destaque para o maior produtor mundial, a China – representando 38,82% dessa produção - seguida por Indonésia (12,20%), Vietnã (11,28%), Índia (10,27%) e Tailândia (6,05%). O continente americano contribuiu com 14,82% da produção mundial, destacando-se como principais produtores o Equador (8,26%), o México (2,67%) e o Brasil (1,43%) (FAO, 2017b).

No Brasil, na década de 1990, a carcinicultura foi impulsionada com o domínio, pelos laboratórios brasileiros, das tecnologias relacionadas à reprodução e produção de pós-larvas da espécie exótica de camarão procedente do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* - que demonstrou alta adaptabilidade às condições climáticas brasileiras - introduzida no país uma década antes (Guerrelhas, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; Natori *et al.*, 2011). A auto-suficiência na produção de pós-larvas desta espécie de camarão possibilitou a formação de plantéis sem a dependência de importações de animais, que também representavam riscos de introdução de doenças (Carvalho *et al.*, 2005; Natori *et al.*, 2011). De 1998 a 2003, a carcinicultura brasileira cresceu em ritmo acelerado (figura 1), atingindo a marca de 90.190 toneladas de camarão, em 2003 (FAO, 2017b).

Em 2004, um conjunto de fatores associados à variação cambial e valorização do Real em relação ao dólar, ao impacto negativo da aplicação da Lei *Antidumping* dos Estados Unidos contra o camarão de vários países - entre eles o do Brasil - e às enfermidades, particularmente a Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV), disseminadas pela intensificação dos sistemas produtivos, ocasionou o declínio da produção e da produtividade da carcinicultura brasileira (Rocha e Rocha, 2011). Ajustes setoriais internos foram necessários para orientar e reorganizar a produção da carcinicultura brasileira que se direcionou quase totalmente para o mercado nacional, uma vez que os efeitos da crise descrita, a partir de 2004, afetaram a competitividade

do produto brasileiro no mercado internacional, reduzindo drasticamente as exportações (ABCC, 2013). Além dos problemas descritos que culminaram com a diminuição das exportações, o setor ainda enfrentou a ocorrência de surtos de doenças e enfermidades, dificuldades para obtenção de licenças ambientais e a falta de investimentos e de políticas específicas por parte do governo brasileiro para fomentar o desenvolvimento da carcinicultura que impeliram uma estagnação da produção brasileira de camarão por mais de uma década (figura 1) (ABCC, 2013; ACEB, 2014).

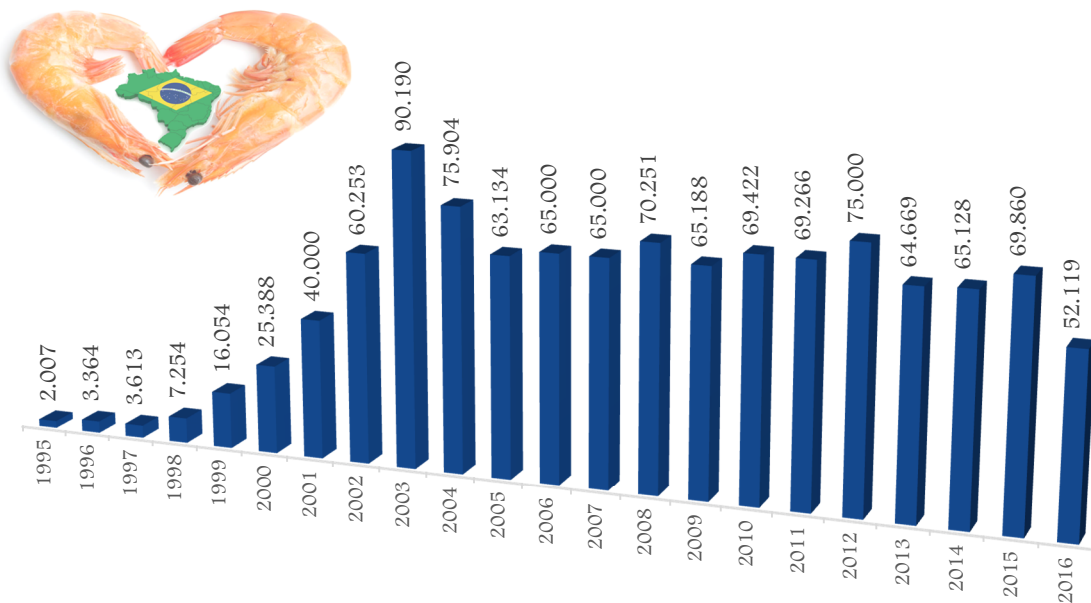


FIGURA 1. Produção da carcinicultura brasileira (t) entre os anos de 1995 e 2016

Fonte: IBGE, 2016; FAO, 2017b

No ano de 2016, a produção brasileira de camarão apresentou uma redução de 25,39% em comparação com a produção de 2015 (IBGE, 2016; FAO, 2017b). O declínio da produção de camarões foi associado ao vírus da mancha branca, que atingiu as criações de camarões da região nordeste, causando alta mortalidade e prejuízos econômicos significativos aos carcinicultores (IBGE, 2016). Mesmo com o declínio na produção, a criação de camarões, no ano de 2016, alcançou um valor de produção de R\$ 889 milhões, representando um percentual de 19,3% do valor da produção da aquicultura brasileira (IBGE, 2016).

O nordeste brasileiro é a principal região produtora de camarão no país. Mesmo com a redução na produção, esta região foi responsável por 99,2% da produção nacional de camarão em 2016.

Os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, historicamente, são os maiores produtores e, juntos, detiveram 76,9% de 52.118,7 toneladas de camarões produzidos pelo país em 2016. O estado do Ceará foi o maior produtor nacional de camarões, respondendo por 48,8% do total da produção no ano de 2016 (IBGE, 2017). O camarão *L. vannamei* é criado em toda a extensão costeira deste estado, assumindo importância social crescente na região Nordeste, promovendo a geração de empregos e redução do êxodo rural (ABCC, 2013).

O camarão *L. vannamei* não alterou somente o cenário da carcinicultura brasileira. Em 2015, a produção mundial do camarão branco do Pacífico ultrapassou 3,8 milhões de toneladas, se tornando a espécie de camarão criada em cativeiro majoritariamente produzida no mundo (FAO, 2017a).

## 2.2. O camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*

O camarão marinho - *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (figura 2) - é uma espécie de crustáceo pertencente à ordem Decapoda, que inclui lagostas e camarões, e à família Penaeidae (Pérez-Farfante e Kensley, 1997). Popularmente, pode ser denominado de camarão branco, camarão pata branca, camarão branco do Pacífico, camarão cinza e ainda *whiteleg shrimp* (em inglês), *crevette pattes blanches* (em francês), *camarón patiblanco* (em espanhol) e *west coast white shrimp* (nos Estados Unidos) (Holthuis, 1980).

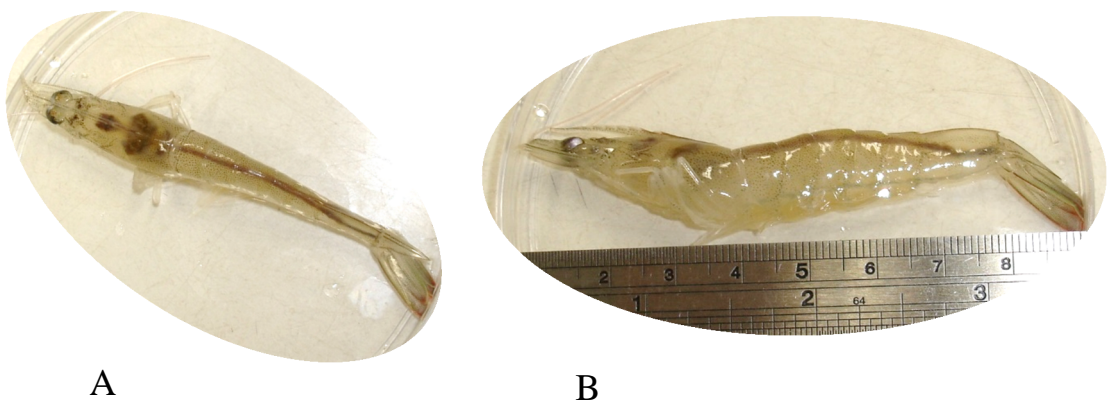


FIGURA 2. Exemplar juvenil do camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*

(A) vista dorsal, (B) vista lateral

Fonte: Arquivo pessoal

Essa espécie de camarão se distribui naturalmente ao longo da costa ocidental do Pacífico, do México - na Província de Sonora - até o Peru, ao sul de Tumbes (figura 3), onde as temperaturas da água normalmente são superiores a 20°C ao longo do ano (FAO, 2006).



FIGURA 3. Distribuição natural da espécie *Litopenaeus vannamei*

Fonte: Adaptado de [www.google.com.br/maps/](http://www.google.com.br/maps/)

Até o final da década de 1990, o camarão *L. vannamei* era produzido exclusivamente nas Américas, com pouca participação na produção mundial – 13,48% (91.698 t) (Rocha e Rocha, 2011). Em 1998, a produção desse camarão passou a representar 20,35% (200.636 t) da produção mundial advinda da carcinicultura. No ano 2000, essa espécie foi introduzida no continente asiático (Liao e Chien, 2011; Liu *et al*, 2014) e, em 2015, a Ásia foi responsável pela produção de 81,37% de 3.879.786 t de camarões *L. vannamei* produzidos no mundo, destacando-se como os maiores produtores dessa espécie nesse continente a China (41,87%), a Índia (10,73%), a Indonésia (10,56%), o Vietnã (8,20%) e a Tailândia (7,22%) (FAO, 2017b).

O camarão branco do Pacífico participou com 52,79% da produção mundial desse setor em 2015 (FAO, 2017a), portanto, mais da metade do camarão consumido mundialmente é *L. vannamei*. No Brasil, essa espécie de camarão tem uma importância econômica ainda maior, representando quase a totalidade (99,86%) dos camarões comercialmente produzidos no país (BRASIL, 2013).

Os atributos biológicos do camarão *L. vannamei* lhe conferem melhor capacidade de adaptação e produção. Como uma eficiente osmorreguladora, essa espécie é eurialina - apresentando tolerância a uma ampla variação de salinidade, entre 1‰ a 50‰ (Li *et al.*, 2007), que associada às características de rusticidade e rapidez no crescimento justificam a preferência dos produtores pela espécie (Ponce-Palafox *et al.*, 1997; Liao e Chien, 2011). Apesar de a espécie de camarão *L. vannamei* ser considerada de tamanho médio, com peso em torno de 12g, obteve uma boa aceitação nos mercados americano e europeu (Coelho 2005), que preferencialmente consomem camarões com maior tamanho (camarões pesando individualmente em torno de 25g) (Carvalho *et al.*, 2005). De uma maneira geral, o tamanho individual dos camarões provenientes de sistemas de criação, ofertados ao mercado, tem diminuído. Embora o tamanho do camarão seja um fator determinante do preço do produto e se tenha a opção de prolongar o ciclo de produção para a obtenção de indivíduos com pesos mais elevados, os custos com a alimentação e os riscos com a ocorrência de enfermidades aumentam sobremaneira. Por isso, os carcinicultores tem optado pela redução do tempo de criação a fim de se obter um maior número de ciclos de produção por ano e, dessa maneira também evitar possíveis perdas econômicas com as enfermidades. Essa tendência mercadológica impulsionou a produção e a comercialização de espécies de menor porte, como é *L. vannamei* (Carvalho *et al.*, 2005).

### **2.2.1. Ciclo de vida dos camarões peneídeos**

No ambiente natural, os camarões adultos da espécie *L. vannamei* migram para águas oceânicas onde completam o seu desenvolvimento e maturação sexual. O acasalamento e a desova dos camarões peneídeos ocorrem em mar aberto, em zonas profundas (Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2001). Os ovos são liberados no período noturno e eclodem entre 12 e 18 horas após a desova, originando as larvas. Essas larvas passam por três estágios distintos: naupliar, zoea ou protozoea e misis (Treece e Yates, 1988).

O ciclo larval pelágico de *L. vannamei* apresenta seis estágios de náuplios (N1 a N6), três estágios de zoea (Z1 a Z3) e três estágios de misis (M1 a M3) (Kitani, 1986). Além das mudanças morfológicas verificadas entre os estágios larvais, ocorre também alteração no comportamento alimentar. No estágio naupliar, as larvas se nutrem apenas das reservas de vitelo, passando a ingerir fitoplâncton (algas unicelulares) e, em seguida, zooplâncton. A partir do estágio de misis, os camarões se tornam aptos a consumir uma grande variedade de

organismos (Treece e Yates, 1988; Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2001). Subsequente ao estágio de misis, as larvas se transformam em pós-larvas (PL) - anatômica e fisiologicamente semelhantes ao indivíduo adulto. Nessa fase, o camarão deixa de ser planctônico e adota o ciclo de vida bentônico, migrando para o fundo e enterrando-se ativamente na areia durante o dia. É também na fase de pós-larva que ocorre a migração para as zonas estuarinas e outros *habitat* costeiros, onde os camarões terminam o seu desenvolvimento, passando a ser denominados de juvenis (Treece e Yates, 1988). Esses ecossistemas frequentemente sofrem mudanças repentinas na salinidade da água decorrentes da influência de marés e da descarga fluvial, mas apresentam grande disponibilidade de nutrientes (Schwochow e Zanboni, 2007). Os camarões juvenis são descritos como onívoros, embora alguns demonstrem maior tendência a serem carnívoros ou herbívoros (Tzuc *et al.*, 2014), e permanecem nas zonas costeiras até atingirem maior tamanho e aproximarem-se da maturidade sexual, quando retornam ao mar aberto, em busca de águas oceânicas, mais estáveis em relação à salinidade e à temperatura, para se reproduzirem (Treece e Yates, 1988, Treece, 2000, Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2001). Os camarões adultos não retornam às zonas estuárias, o que explica porque os camarões maiores são capturados exclusivamente em mar aberto (Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2001). A figura 4 apresenta o esquema do ciclo de vida dos camarões peneídeos.

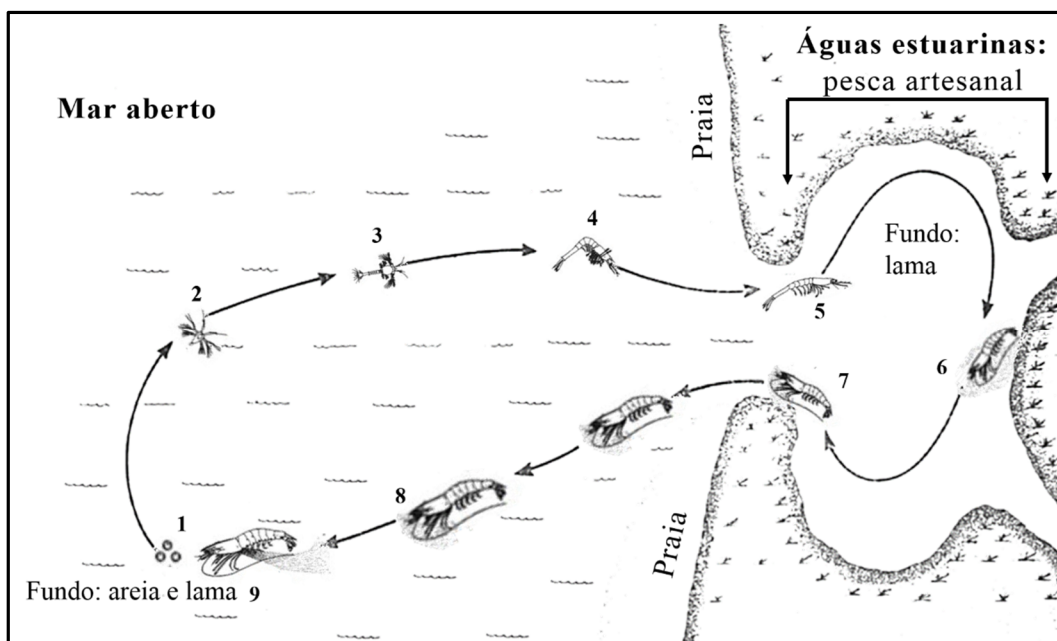


FIGURA 4. Ciclo de vida dos camarões peneídeos

Os números correspondem às fases de desenvolvimento: (1) ovos; (2) náuplio; (3) zoea; (4) misis; (5) pós-larva; (6) juvenil; (7) juvenil próximo à maturidade sexual; (8) adulto; (9) adulto em reprodução.

Fonte: Adaptado de Neiva *et al.*, 1971.

A reprodução do ciclo de vida dos camarões peneídeos em condições de laboratório foi determinante para a expansão da criação comercial de camarões marinhos (Treece, 2000), que compreende basicamente duas fases: a larvicultura e a engorda (Santos *et al.*, 2016; ShEST, 2018). A larvicultura é realizada em laboratórios comerciais especializados que executam a reprodução dos animais para obtenção de larvas que são comercializadas, com maior frequência, no estágio de pós-larvas (Treece, 2000). Por sua vez, os laboratórios de produção de pós-larvas são divididos em setores: a maturação, setor responsável pelo acasalamento e desova, e o berçário, setor que mantém os náuplios recém eclodidos até o estágio de pós-larvas (ShEST, 2018). Nem sempre um laboratório de produção de pós-larvas desenvolve a reprodução e produção das pós-larvas para a comercialização em suas próprias instalações. Os laboratórios de pós-larvas podem possuir apenas o setor de berçário, adquirindo náuplios de outros laboratórios (Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2001). No entanto, Barbieri Jr e Ostrensky Neto, (2001) ressaltam que esse procedimento não possibilita um controle de qualidade rigoroso das pós-larvas produzidas, sendo por isso pouco adotado.

Os estabelecimentos que se dedicam à engorda do camarão *L. vannamei* adquirem as pós-larvas das larviculturas e criam os camarões até alcançarem o peso ideal para a comercialização, geralmente em torno de 12g (Santos *et al.*, 2016). Os estabelecimentos de engorda usualmente adotam um sistema de criação de camarão denominado bifásico constituído por tanques berçários de pequeno porte, empregados na recepção e na criação inicial das pós-larvas, e por viveiros de grande porte ou tanques maiores destinados ao crescimento e à engorda dos camarões (Barbieri Jr e Ostrensky Neto, 2001).

Durante as diferentes fases de vida, os camarões constantemente entram em contato com as bactérias do ambiente (Chaiyapechara *et al.*, 2012), no entanto, os processos envolvidos na aquisição e subsequente estabelecimento de comunidades microbianas intestinais são complexos, envolvendo a sucessão de populações microbianas (Yasuda e Kitao, 1980) dentro de regiões específicas do intestino, além de interações entre micro-organismos e hospedeiro (Hooper e Macpherson, 2010). Existem evidências de que a comunidade microbiana das diferentes regiões anatômicas de trato gastrointestinal de camarões seja variável (Johnson *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Sistema digestivo dos camarões peneídeos

O sistema digestivo do camarão peneídeo *L. vannamei*, de maneira geral, segue os mesmos padrões morfológicos e fisiológicos dos crustáceos decapodas. Pode ser compreendido essencialmente como um tubo interno que se inicia no esôfago e termina no ânus, (Icely e Nott, 1992), revestido por células regionalmente especializadas para a realização de diferentes funções (McGraw e Curtis, 2013). O sistema digestivo do camarão marinho é dividido em três partes funcionalmente distintas: intestino anterior (*foregut*), intestino médio (*midgut*) e intestino posterior (*hindgut*) (figura 5).

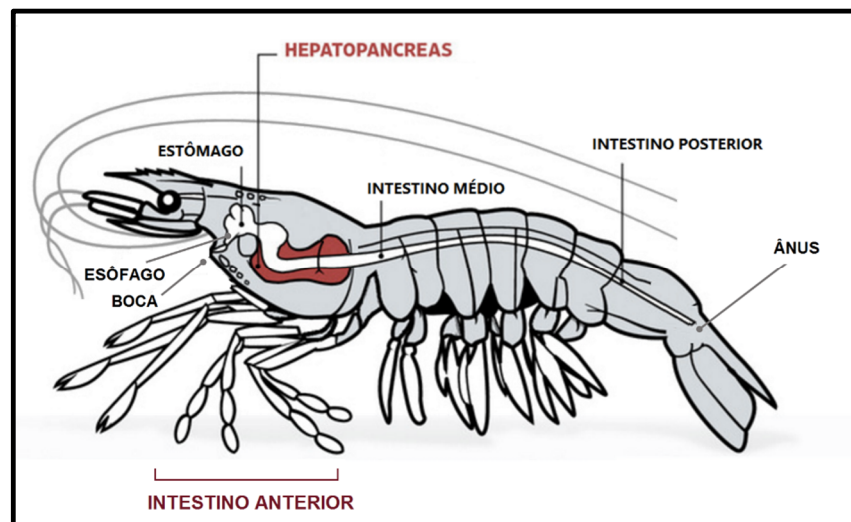


FIGURA 5. Anatomia do sistema digestivo de um camarão peneídeo

Fonte: Adaptado de [www.wsj.com/articles/SB10001424127887323998604578565201120674008](http://www.wsj.com/articles/SB10001424127887323998604578565201120674008).

O intestino anterior é formado pelo estômago, que se conecta ao esôfago e ao hepatopâncreas. O esôfago une a boca ao estômago e, por possuir paredes revestidas com glândulas tegumentares responsáveis pela secreção de muco, facilita a propulsão do alimento para o estômago (Ceccaldi, 1989; McGraw e Curtis, 2013). O estômago dos crustáceos decapodas é revestido internamente por uma cutícula de quitina e proteína, formando estruturas especializadas responsáveis pela digestão mecânica dos alimentos ingeridos. Dois compartimentos podem ser distintos no estômago: uma câmara cardíaca e uma câmara menor, situada posterior e ventralmente à câmara cardíaca, denominada câmara ou saco pilórico (Ceccaldi, 1989, McGraw e Curtis, 2013). A câmara cardíaca é um grande saco elástico, cuja função é a estocagem e o processamento dos alimentos. A estrutura interna da câmara cardíaca varia entre as espécies de crustáceos decapodas, sendo que na maioria é revestido com inúmeros

ossículos calcificados que atuam na digestão mecânica como verdadeiros moedores. Nas paredes da câmara cardíaca existem canais que direcionam o alimento para a região posterior da câmara onde se localiza o moinho gástrico (Felgenhauer, 1992). Os cortes do moinho gástrico esmagam e misturam o alimento com enzimas digestivas provenientes do hepatopâncreas (Icely e Nott, 1992).

As contrações rítmicas dos músculos do intestino anterior propulsionam os alimentos moídos e triturados para a região pilórica (Heinzel, 1988), nessa região existem filtros que retêm partículas grandes, de forma que apenas a digesta líquida é direcionada para o hepatopâncreas. Qualquer alimento que não tenha sido adequadamente triturado é empurrado de volta à câmara cardíaca e ao moinho gástrico para ser novamente processado. Portanto, à câmara pilórica pode-se atribuir a função de classificação dos alimentos, selecionando aqueles que terão acesso ao intestino médio (Heinzel, 1988; Heinzel *et al*, 1993). O bombeamento rítmico do saco pilórico também atua na propulsão do alimento para o intestino médio (Icely e Nott, 1992).

O intestino médio inicia-se na junção com o saco pilórico (ceco anterior do intestino médio), correspondendo à região da junção da carapaça com o abdômen, e termina no ceco posterior do intestino médio. As paredes do intestino médio são revestidas com epitélio colunar alto com borda apical (luminal) bem desenvolvida contendo microvilosidades que permitem o movimento de íons e de água, desempenhando um importante papel na osmorregulação (Mantel e Farmer, 1983). Ductos surgem na junção do intestino médio com o saco pilórico e se ramificam como túbulos em fundo cego dentro do hepatopâncreas. Cada túbulo em fundo cego constitui um lóbulo hepatopancreático, que é considerada uma unidade morfofuncional do hepatopâncreas (Gibson e Barker, 1979).

O hepatopâncreas recebe diferentes denominações, entre elas, fígado, pâncreas, glândula do intestino médio, glândula gástrica, glândula digestiva, órgão digestivo e glândula intestinal média (Gibson e Barker, 1979). Nos crustáceos decapodas, o hepatopâncreas é um órgão bem desenvolvido que ocupa a maior parte do cefalotórax (Gibson e Barker, 1979), podendo se estender até o abdômen (Ceccaldi, 1989). O hepatopâncreas é responsável por muitas funções metabólicas como a síntese e secreção de enzimas digestivas, absorção de nutrientes, metabolismo de lipídios e carboidratos, mobilização de reservas estocadas durante o período entre muda e catabolismo de compostos orgânicos (Gibson e Barker, 1979; Ceccaldi, 1989;

Icely e Nott, 1992). O órgão apresenta cores variáveis dependendo principalmente das reservas estocadas: marrom, vermelho, amarelo, azul ou marrom-amarelado (Ceccaldi, 1989).

O hepatopâncreas é formado por um par de glândulas ocupando ambos os lados do estômago. Cada metade do hepatopâncreas abre-se para o tubo digestivo por meio de ductos. Cada ducto libera no estômago as secreções produzidas pela glândula e enche-se com o material digerido, que deve ser absorvido (Ceccaldi, 1989). Somente conteúdo líquido e partículas com tamanho inferior a 100nm têm acesso ao hepatopâncreas. A maioria dos nutrientes são absorvidos no hepatopâncreas, embora também possam ser absorvidos diretamente através das paredes do intestino médio (Houlihan *et al.* 1990; Mente *et al.* 2003).

O intestino posterior inicia-se após o intestino médio, inclui o reto e o ânus. Os movimentos peristálticos rítmicos do intestino posterior expõem o material fecal para o ambiente (Icely e Nott, 1992). Acredita-se que, como ocorre em outros artrópodes, o intestino posterior possa também estar envolvido na absorção e transporte ativo de íons (Ceccaldi, 1989).

Os intestinos anterior e posterior dos camarões são revestidos internamente por uma cutícula composta de quitina e proteína, com características semelhantes ao tegumento dos artrópodes, que é removida em cada muda, com a ecdise. Essa cutícula atua como uma barreira física protetora da mucosa intestinal (Ceccaldi, 1989, McGraw e Curtis, 2013). A mucosa do intestino médio não é recoberta por essa cutícula de quitina, mas é protegida por uma matriz semipermeável, não permanente, denominada membrana peritrófica (Lovett e Felder, 1989).

A membrana peritrófica é uma estrutura única dos invertebrados, que reveste o intestino médio e se move com a digesta ao longo do canal digestivo (Wang e Granados, 2001) comportando-se como um invólucro do material fecal (Martin *et al.*, 2006). O alimento digerido é empacotado pela membrana peritrófica por meio de ondas de contração peristálticas e antiperistálticas, para posteriormente ser expulso para o exterior (Simões *et al.*, 2002).

A membrana peritrófica também é composta de quitina e proteínas (Wang e Granados, 2001; Martin *et al.*, 2006) e dentre as funções atribuídas à ela citam-se a proteção contra abrasão mecânica do intestino médio, estabelecimento de barreira à penetração de patógenos e regulação de enzimas digestivas e nutrientes (Martin *et al.*, 2006). De acordo com Lovett e

Felder (1990), a membrana peritrófica permite a separação do material fecal e enzimas da água que é introduzida no lúmen intestinal através do anus.

De acordo com Simões *et al.* (2002), as regiões consideradas mais propícias para a colonização bacteriana em camarões *L. vannamei* são os cecos anteriores e laterais, uma vez que o revestimento dos intestinos anterior e posterior se desprendem a cada ecdise e o tempo de passagem do alimento pelo intestino médio é curto, de modo que, as bactérias são excretadas antes que consigam aumentar a população e estão envolvidas pela membrana peritrófica, isolando a digesta da mucosa intestinal (Lovett e Felder, 1990). Desta forma, as bactérias que sobrevivem ao processo de digestão e permanecem no material fecal serão expulsas para o exterior promovendo a distribuição de micro-organismos no meio aquático e a água advinda do meio externo, através do anus, constitui uma fonte de bactérias para o ambiente intestinal (Simões *et al.*, 2002). Portanto, a comunidade bacteriana presente na água do sistema de criação influencia a microbiota do trato gastrintestinal dos camarões (Cardona *et al.*, 2016).

Em qualquer sistema aquático, parâmetros ambientais como temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido desempenham um papel primordial na proliferação de bactérias (Sung *et al.*, 2001; Phuoc *et al.*, 2009). Associado a isso, um desequilíbrio das condições ambientais do sistema de criação dos camarões pode comprometer o estado de saúde dos animais, decorrente do estresse proporcionado. Nessas circunstâncias, os indivíduos são mais susceptíveis aos agentes potencialmente patogênicos, culminando com a ocorrência de enfermidades (Nunes e Martins, 2002). Portanto, as enfermidades são desencadeadas quando há uma combinação de fatores envolvendo o ambiente de criação, agentes patogênicos e hospedeiros (Sung *et al.*, 2001; Phuoc *et al.*, 2009).

### **2.2.3. Doenças dos camarões peneídeos**

As doenças constituem um importante fator limitante na produção de camarões em todo o mundo, sendo os vírus os agentes etiológicos das doenças de maior importância econômica para a carcinicultura, relacionadas às mais elevadas taxas de mortalidade e perdas de produção (Flegel *et al.*, 2004; Ganjoo, 2015). As bactérias estão também envolvidas em importantes enfermidades que acometem os camarões, sendo as principais responsáveis pela mortalidade na larvicultura (Gomez-Gil *et al.*, 2000). As bactérias patogênicas para o camarão predominam no ambiente marinho e também constituem a maior parte das bactérias associadas à microbiota

gastrintestinal desses animais, sejam eles provenientes da natureza ou criados em sistemas comerciais. Sendo assim, elas são consideradas patógenos oportunistas, pois as alterações ecológicas que acarretam condições estressantes ou influenciam fatores imunológicos e/ou nutricionais para os camarões podem desencadear as infecções (Feijó, 2009). Por isso, a microbiota gastrointestinal associada ao camarão e ao ambiente no qual eles são criados tem sido bastante pesquisada (Yasuda e Kitao, 1980; Moss *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2001; Shakibazadeh *et al.* 2009). As espécies de vibrios estão entre os mais importantes patógenos bacterianos dos camarões criados em cativeiro (Egidius, 1987; Sung *et al.*, 2001; Ganesh *et al.*, 2010).

O monitoramento sanitário é premissa básica na prevenção de doenças e na carcinicultura isso não é diferente. O ingresso de animais no sistema produtivo é a principal origem dos problemas sanitários (Lotz, 1997). A introdução de patógenos em um plantel está comumente associada à aquisição de pós-larvas portadoras assintomáticas, que não apresentam sinais clínicos de enfermidades. Portanto, a aquisição de animais livres de patógenos é interessante, sendo o controle sanitário e a certificação sanitária na comercialização dos animais importantes ferramentas para que os fornecedores assegurem a saúde das pós-larvas vendidas e para se estabelecer análises de risco de disseminação de doenças (Figueiredo e Leal, 2008). Além disso, o registro zootécnico e a construção de um histórico das atividades de manejo com implementação de práticas de biossegurança são fundamentais para a propriedade, pois sanitariamente facilitam a compreensão de alterações nos índices zootécnicos e viabilizam o rastreamento das causas (Pereira, 2010). Ressalta-se ainda que é de extrema importância para o êxito da atividade carcinícola o monitoramento da sanidade dos espécimes no sistema de criação, por meio de técnicas laboratoriais, para obtenção de informações sobre a presença ou não de doenças (Lotz, 1997) durante todo o ciclo de produção (Figueiredo e Leal, 2008). A implementação desses procedimentos diagnósticos permitem um controle criterioso do estado de saúde dos camarões, excluindo os efeitos negativos dos patógenos sobre a produção e o desempenho dos animais (Lenoch, 2004).

Para o monitoramento da presença de doenças que afetam os camarões marinhos e registro da ocorrência de surtos em diferentes partes do mundo, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) publica anualmente uma lista de doenças de notificação obrigatória para crustáceos, entre outros grupos de animais. A ocorrência ou suspeita de quaisquer das doenças elencadas na Lista de Doenças de Notificação Obrigatória deve ser notificada aos órgãos oficiais do país. As informações geradas fornecem subsídios para elaboração de relatórios encaminhados à OIE e

para o estabelecimento de estratégias de vigilância, controle e erradicação, assegurando a saúde animal e pública (Lenoch, 2004). A Lista de Doenças de Notificação Obrigatória à OIE, que acometem os camarões, em vigor para o ano de 2018, contempla a Necrose Hepatopancreática Aguda (do inglês *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* – AHPND), Doença da Cabeça Amarela (do inglês *Infection with Yellow Head Virus* – YHV, genótipo 1), Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa (do inglês *Infectious Hypodermal and Haematopietic Necrosis* - IHHNV), Mionecrose Infecciosa (do inglês *Infectious Myonecrosis* – IMNV), Hepatopancreatite Necrosante (do inglês *Necrotising Hepatopancreatitis* – NHP), Síndrome Taura (do inglês *Taura Syndrome* – TSV), Síndrome da Mancha Branca (do inglês *White Spot Disease* – WSSV) e Doença da Cauda Branca (do inglês *White Tail Disease*) (OIE, 2018). Dentre as doenças listadas, apenas três delas nunca foram relatadas no Brasil: Doença da Cauda Branca (que acomete o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*), Doença da Cabeça Amarela e Necrose Hepatopancreática Aguda (OIE, 2018). De uma maneira geral, essas doenças são de fácil disseminação entre os animais, de difícil controle por medidas terapêuticas, determinam perdas econômicas significativas, têm restrição de áreas geográficas, mas são passíveis de serem erradicadas (Lenoch, 2004; Figueiredo e Leal, 2008).

Aliado ao surgimento de doenças, a intensificação dos sistemas de criação dos camarões demandou o consumo de grandes volumes de água limpa resultando em intensa geração de efluentes pela falta de tratamento dos resíduos gerados, fazendo com que a carcinicultura enfrentasse relevantes problemas ambientais (Tahim, 2008; Natori *et al.*, 2011). Na busca por soluções sustentáveis, passou-se a adotar a produção de camarões em sistemas fechados, entre os quais o sistema de bioflocos (Avnimelech, 2012; Krummenauer *et al.*, 2012; Emerenciano *et al.*, 2013).

### **2.3. Sistema de bioflocos aplicado à carcinicultura**

O sistema de bioflocos adotado para a produção de camarões marinhos caracteriza-se como um sistema de criação superintensivo que utiliza aeração intensa (Schryver *et al.*, 2008), água com baixas salinidades e com reduzida troca de água, podendo ser instalado em propriedades distantes das regiões litorâneas (Appelbaum *et al.*, 2002; Decamp *et al.*, 2003). Como a troca de água dos tanques onde os camarões são mantidos é limitada, os resíduos orgânicos gerados na produção (as fezes, os exoesqueletos e as sobras de ração) se acumulam na água. Sob agitação e intensa aeração, a matéria orgânica acumulada forma partículas que permanecem em

suspensão na coluna d'água, constituindo o substrato necessário para o desenvolvimento de uma comunidade microbiana, que dará origem aos bioflocos (Avnimelech, 2003; Kubitza, 2011).

Portanto, as bactérias, protozoários, rotíferos, fungos, oligoquetos e outros micro-organismos (predominando uma microbiota heterotrófica aeróbia), além de microalgas, sobras de ração, fezes dos animais, exoesqueletos e outros materiais orgânicos agregam-se em pequenas partículas, denominadas bioflocos, agregados microbianos ou simplesmente flocos (Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009; Ballester *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2010; Kubitza, 2011; Ray, 2012). A aeração contínua do sistema propicia o desenvolvimento de bactérias responsáveis pela assimilação do nitrogênio amoniacal presente na água do tanque em biomassa bacteriana (Hargreaves, 2006).

Nos sistemas de produção de camarões, sobretudo naqueles em que se utilizam elevadas densidades de estocagem, ocorre uma grande liberação de compostos nitrogenados na água, provenientes principalmente da excreção dos animais e da decomposição da matéria orgânica. A amônia é o principal produto da excreção dos organismos aquáticos e da desaminação das proteínas constituintes da ração (Avnimelech, 1999; Queiroz e Boeira, 2007), que, em sua forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), é tóxica para a maioria das espécies de interesse comercial, em concentrações que variam de 0,6 a 2,0 mg/L (Queiroz e Boeira, 2007). O acúmulo de amônia na água dos tanques de criação afeta o desempenho zootécnico dos animais, podendo ocasionar altas taxas de mortalidade. Por isso, em sistemas convencionais, também denominados sistemas de água clara, utilizam-se altas taxas de renovação de água para remover estes compostos tóxicos e manter a qualidade da água (Avnimelech, 2003).

No sistema de bioflocos, a manutenção da qualidade da água é baseada na remoção de nitrogênio amoniacal para a formação de biomassa microbiana por um processo essencialmente heterotrófico, embora, também ocorram nesse sistema dois outros processos, em maior ou menor grau, dependendo das condições de produção e manejo aplicadas ao sistema (Ebeling *et al.*, 2006; Hargreaves, 2006; Xu *et al.*, 2016). Os organismos autotróficos são capazes de utilizar material inorgânico para sintetizar a matéria orgânica necessária ao seu desenvolvimento. Os organismos que utilizam a energia luminosa para produzir energia química e fixar o carbono em compostos orgânicos são denominados de fotoautotróficos (Santos, 2018). O processo fotoautotrófico é realizado pelas microalgas no início da formação do sistema de bioflocos,

perdendo importância no processo de ciclagem do nitrogênio ao longo do cultivo, pois a formação dos flocos diminui a transparência da água impedindo a passagem de luminosidade e consequentemente o desenvolvimento desse grupo de organismos (Lara *et al.*, 2013). No sistema de bioflocos, o processo quimioautotrófico – que se caracteriza pela obtenção de energia a partir da oxidação de substâncias inorgânicas, como a amônia e o nitrito – é realizado pelas bactérias nitrificantes. Devido ao lento desenvolvimento desse grupo bacteriano, pequenas quantidades de biomassa são produzidas tornando a remoção do nitrogênio amoniacal da água pouco eficiente no início da formação do sistema de bioflocos (Ebeling *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2013). No processo heterotrófico, os organismos necessitam do material orgânico previamente formado para a obtenção de energia (Santos, 2018), sendo o nitrogênio amoniacal removido do sistema de criação de camarões para a síntese de proteína microbiana, ou seja, os compostos nitrogenados são convertidos em biomassa microbiana (Lara *et al.*, 2013). De acordo com Ebeling *et al.* (2006), com a adequação da relação carbono:nitrogênio, as bactérias heterotróficas apresentam uma taxa de multiplicação muito maior que as bactérias nitrificantes e, além disso, o rendimento de biomassa microbiana das bactérias heterotróficas por unidade de substrato é dez vezes maior que o rendimento de biomassa das bactérias nitrificantes (Ebeling *et al.*, 2006; Hargreaves, 2006).

As bactérias nitrificantes quimioautotróficas utilizam o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fonte de carbono e promovem a oxidação da amônia presente na água a nitrito e, em seguida, a nitrato, como representado na figura 6. O nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é menos tóxico aos animais e, ainda, atua como um agente oxidante, prevenindo o desenvolvimento de condições anaeróbias (Avnimelech, 2003; Ebeling *et al.*, 2006; Pérez-Rostro *et al.*, 2014). A nitrificação é um processo essencialmente aeróbio, ocorrendo na coluna d'água e na superfície do sedimento, onde há disponibilidade de oxigênio (Pereira e Mercante, 2005).

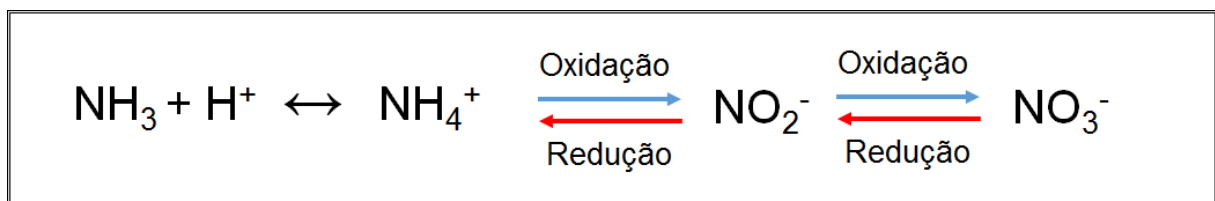


FIGURA 6. Reação química de oxidação da amônia a nitrato

Fonte: Adaptado de Ebeling *et al.*, 2006.

As bactérias nitrificantes apresentam um desenvolvimento muito lento, decorrente da maneira com que obtêm energia - conversão química da amônia a nitrito e do nitrito a nitrato. Assim, se a formação dos bioflocos ocorrer naturalmente na água do sistema de criação, a comunidade microbiana em formação no sistema de bioflocos não seria capaz de assimilar eficientemente os compostos nitrogenados e, como a troca de água nesse sistema é reduzida, poderia ocorrer o acúmulo de amônia em concentrações tóxicas ou letais para os animais (Avnimelech *et al.*, 1986; Krummenauer *et al.*, 2012).

Então, visando estimular o rápido desenvolvimento das bactérias heterotróficas no sistema de bioflocos, vários autores (Avnimelech, 1999; Chamberlain *et al.*, 2001; Avnimelech, 2003; Azim e Little, 2008; Schryver *et al.*, 2008; Avnimelech, 2009) sugeriram a adição de fontes ricas em carbono orgânico - amido, melaço, farelos de trigo e arroz, farinha de mandioca, entre outros. Ressalta-se que na presença de carbono orgânico, as bactérias nitrificantes são suplantadas pelas bactérias heterotróficas, devido à baixa taxa de crescimento que os micro-organismos nitrificantes apresentam (Kindaichi *et al.*, 2004). De acordo com Avnimelech (2003), quando há disponibilidade de carbono, as bactérias heterotróficas utilizam o nitrogênio disponível na água para produzir proteína necessária para o seu crescimento celular e multiplicação. Cerca de 20 a 25g de carbono são necessários para converter 1g de nitrogênio em proteína microbiana (Avnimelech, 1999). Sendo assim, a capacidade das bactérias heterotróficas sintetizarem proteínas microbianas a partir do carbono orgânico e do nitrogênio inorgânico depende de uma adequada relação carbono:nitrogênio (C:N). Proporções balanceadas de carbono:nitrogênio foram estudadas por vários autores, na busca de uma relação ideal para o sistema de bioflocos (Schneider *et al.*, 2006; Wasielesky *et al.*, 2006; Ballester *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016). Para estimular o rápido crescimento de bactérias heterotróficas no sistema de bioflocos, tem sido mais comumente indicada uma relação carbono:nitrogênio variando entre 15:1 e 20:1 (Chamberlain *et al.*, 2001; Avnimelech, 1999; Avnimelech, 2009; Xu *et al.*, 2016).

Uma outra importante maneira de remover da água do sistema de criação o excesso de nitrogênio é a desnitrificação, processo no qual o nitrato originado na nitrificação é reduzido a nitrogênio (N<sub>2</sub>) e liberado para a atmosfera na forma de gás (Pereira e Mercante, 2005), uma vez que o N<sub>2</sub> possui baixa solubilidade em água (Bitton, 2005). A maioria das bactérias desnitrificantes são heterotróficas, cuja diversidade de micro-organismos observada varia em função do tipo de operação do sistema (Bitton, 2005; Oliveira, 2012).

O processo de desnitrificação ocorre principalmente em condições anaeróbias, que nos ecossistemas aquáticos podem ser verificadas nos sedimentos (Pereira e Mercante, 2005), situação que não é proporcionada no sistema de bioflocos pela intensa aeração. No entanto, de acordo com Bitton (2005), apesar da presença de oxigênio poder inibir a desnitrificação, o processo acontece dentro de flocos, independentemente dos níveis relativamente altos de oxigênio na água. Associado a isso, como na desnitrificação heterotrófica há necessidade da adição de uma fonte de carbono para a desnitrificação de altas concentrações de nitrogênio amoniacal (Oliveira, 2012), no sistema de bioflocos, a manipulação da relação carbono:nitrogênio favorece também a formação de agregados microbianos predominantemente heterotróficos que transformam compostos nitrogenados potencialmente tóxicos em biomassa microbiana, realizando a reciclagem dos compostos nitrogenados no sistema e melhorando conseqüentemente a qualidade da água dos tanques de criação (Avnimelech, 1999; Ebeling *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013).

Sendo assim, o sistema de bioflocos adotado, sobretudo na carcinicultura marinha, pode ser definido como um sistema que utiliza pouca ou nenhuma troca de água, com aeração intensa, povoado com altas densidades de camarões e fertilizado com fontes ricas em carbono para estimular o desenvolvimento de uma comunidade bacteriana predominantemente heterotrófica, que tem capacidade de assimilar os compostos nitrogenados presentes na água e transformá-los em proteína microbiana (Avnimelech *et al.*, 1994; Avnimelech, 1999; McIntosh *et al.*, 2000; Avnimelech, 2003; Burford *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2006). Considerando as características citadas, o sistema de bioflocos também é conhecido por outras terminologias, tais como: *Activated Suspension Technique* (AST), *Active Suspension Pond* (ASP) e *Zero exchange, aerobic, heterotrophic* (ZEAH) (McIntosh, 2000; McNeil, 2000; Wasielesky *et al.*, 2006; Avnimelech, 2007; Schryver *et al.*, 2008).

As bactérias dos bioflocos, além de manterem a qualidade da água utilizada na produção dos organismos aquáticos, removem o nitrogênio amoniacal presente na água e o disponibilizam como fonte de alimento para espécies aquáticas onívoras, como o camarão, na forma de proteína microbiana (Burford *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2010; Ray, 2012; Emerenciano *et al.*, 2013). O consumo dos flocos microbianos pelos camarões pode contribuir para nutrição destes animais (McNeil, 2000; Burford *et al.*, 2004a; Burford *et al.*, 2004b; Schryver *et al.*, 2008) promovendo o processo de reciclagem de nutrientes dentro do sistema e, conseqüentemente, aumentando a eficiência de utilização do alimento (Burford *et al.*, 2003;

Hargreaves, 2006; Schneider *et al.*, 2006; Wasielesky *et al.*, 2006, Crab *et al.*, 2007). A reciclagem do nitrogênio no sistema de bioflocos é apresentada na figura 7.

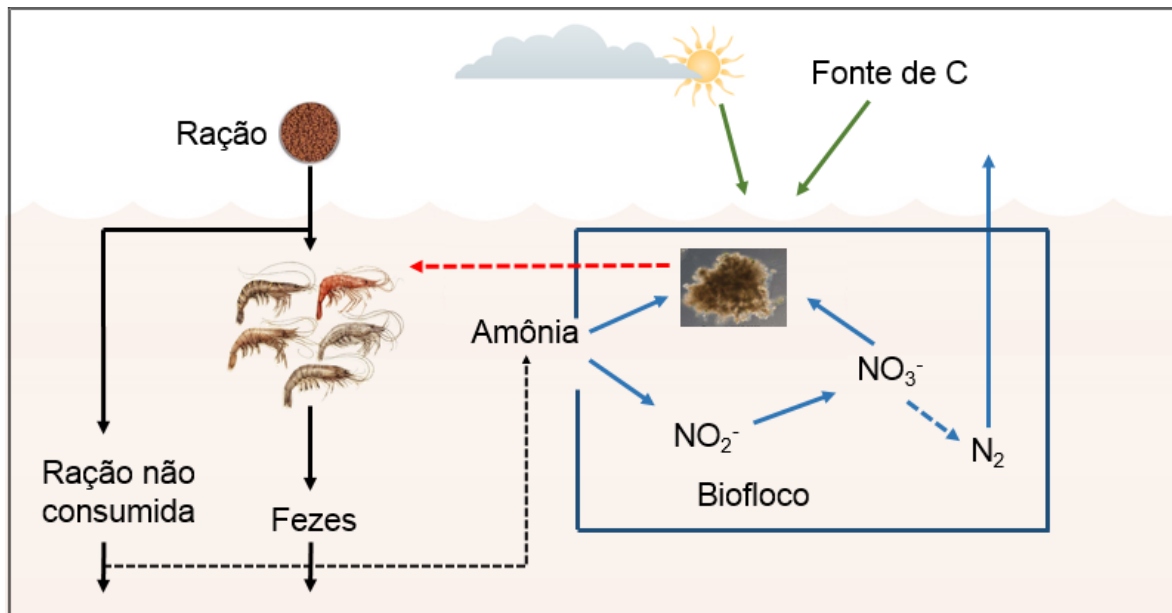


FIGURA 7. Ciclo de nitrogênio em sistemas de bioflocos. A adição de uma fonte de carbono, juntamente com os compostos nitrogenados (oriundos das excretas dos animais e da decomposição da ração não consumida), favorece a formação de bioflocos, que são consumidos pelos animais criados no sistema.

Fonte: Adaptado de Crab *et al.*, 2007.

Por ser um sistema que utiliza uma baixa taxa de renovação de água, há uma significativa redução nas constantes incorporações de água ao sistema de bioflocos, minimizando assim os riscos de contaminações químicas, físicas e/ou biológicas associados aos processos de captação, tratamento, neutralização e distribuição de água até as unidades de criação. Por outro lado, a baixa taxa de renovação de água nesse sistema também evita o descarte de grandes volumes de efluentes, que podem carrear elevada quantidade de matéria-orgânica e possíveis patógenos para o meio ambiente (Lorenzo, 2016). Dessa forma, o controle dos pontos críticos na entrada e saída da água no sistema de bioflocos é mais fácil de ser executado, tornando a produção dos animais aquáticos mais segura (Appelbaum *et al.*, 2002; Wasielesky *et al.*, 2006; Lorenzo, 2016). O sistema de bioflocos oferece ainda outras vantagens: utiliza menor volume de água, menos de 1% dos 20 a 64m<sup>3</sup> gastos para a produção de 1kg de camarão no sistema convencional, com água clara (Krummenauer *et al.*, 2013) e permite a utilização da água de um ciclo de produção anterior para formação dos bioflocos nas produções subsequentes, com a vantagem de estabilizar as comunidades microbianas mais rapidamente, resultando na obtenção de

melhores índices zootécnicos (Krummenauer *et al.*, 2014). Outra importante vantagem das criações de camarão que utilizam o sistema de bioflocos é a possibilidade de serem instaladas em regiões afastadas da costa marítima, principalmente para a criação do camarão *L. vannamei*, pela característica eurialina da espécie (Ray, 2012; Emerenciano *et al.*, 2013). No entanto, os mecanismos específicos pelos quais ocorre o desenvolvimento e estabilização do sistema de bioflocos e os micro-organismos envolvidos no processo ainda não foram completamente caracterizados (Bentzon-Tilia *et al.*, 2016).

#### **2.4. Microbiota bacteriana em ambientes aquáticos de criação de camarão**

A comunidade microbiana associada ao ambiente que circunda os animais aquáticos pode exercer efeitos benéficos, não apenas melhorando a qualidade da água (Burford, 2003, Ganesh *et al.*, 2010), mas também diminuindo a ocorrência de doenças, pela redução das bactérias patogênicas (Defoirdt *et al.*, 2008; Ganesh *et al.*, 2010). Essa microbiota aquática é dinâmica sofrendo variações em função de fatores ambientais (Tang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016) e, por sua vez, exerce forte influência sobre a microbiota bacteriana gastrintestinal dos camarões, alterando a nutrição, o sistema imunológico e a resistência à doença desses animais (Cornejo-Granados *et al.*, 2017).

Em relação ao sistema de bioflocos, existe pouca informação disponível sobre a composição e estrutura da complexa comunidade microbiana que forma o floco e sobre a interação dessa microbiota aquática com a microbiota do trato gastrintestinal dos camarões criados nesse sistema (Cardona *et al.*, 2016). Poucos trabalhos quantificaram bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. (Aguilera-Rivera *et al.*, 2014; Ekasari *et al.*, 2014) e objetivaram a caracterização da comunidade bacteriana que compõe o sistema de bioflocos (Cardona *et al.*, 2016), informações que podem auxiliar na manipulação desse sistema visando a saúde dos camarões e a obtenção de uma melhor qualidade de água.

### 2.4.1. Bactérias heterotróficas

As bactérias heterotróficas, diferentemente das bactérias autotróficas, são incapazes de sintetizar substâncias orgânicas a partir de substâncias inorgânicas, por isso necessitam absorver uma fonte orgânica de carbono para a obtenção de energia e síntese das biomoléculas de que precisam (Lara *et al.*, 2013; Santos, 2018). As bactérias heterotróficas estão amplamente distribuídas em todos os ambientes, incluindo o ambiente aquático (Allen *et al.*, 2004). A sobrevivência e a proliferação desse grupo bacteriano no ambiente aquático dependem da disponibilidade de nutrientes (matéria orgânica), concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e pH favoráveis (Allen *et al.*, 2002). Não somente no sistema de bioflocos, mas também no ambiente marinho, as bactérias heterotróficas estão relacionadas à remoção do nitrogênio por meio da sua incorporação na biomassa bacteriana, representadas pelas reações de oxidação da amônia a nitrato via nitrito (nitrificação), seguida pela desnitrificação, que reduz o nitrato a nitrogênio gasoso. Esses processos neutralizam a eutrofização natural do ambiente aquático e o nível de compostos nitrogenados tóxicos nos tanques de criação (Bothe *et al.*, 2000).

Os procedimentos utilizados para mensurar as bactérias heterotróficas a partir de amostras de água, em meios de cultura, são referidos como métodos de contagem de micro-organismos heterotróficos em placas, que envolvem uma ampla variedade de condições de cultivo. Apesar disso, apenas uma pequena fração ou sub-população de bactérias heterotróficas metabolicamente ativas, presentes nas amostras de água, pode ser detectada em qualquer conjunto de condições de cultivo (Bartram *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2004). As bactérias heterotróficas podem apresentar metabolismo aeróbico ou anaeróbico e vários são os tipos bacterianos que compõem o grupo de bactérias heterotróficas, como as bactérias Gram negativo pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Moraxella* e *Serratia*, e as bactérias Gram positivo dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Allen *et al.*, 2004; Bitton, 2005; Amanidaz *et al.*, 2015). De acordo com Ganesh *et al.* (2010), as bactérias Gram negativo foram dominantes nas águas das lagoas de criação do camarão *P. monodon*.

Estudos realizados por Thompson *et al.* (2004b), baseados em métodos independentes de cultivo, revelaram que as espécies de *Vibrio* são consideradas constituintes da microbiota

indígena nos ambientes aquáticos, sendo a comunidade bacteriana heterotrófica da água dos sistemas de criação de camarões dominada por espécies deste gênero (Yasuda e Kitao, 1980; Sharmila *et al.*, 1996). Cardona *et al.* (2016), trabalhando com metodologia independente de cultivo, descreveram que em sistemas de criação de *L. stylirostris* utilizando renovação de água (água clara), *Vibrio* foi mais abundante (0,73%) do que no sistema de bioflocos (0,01%), sugerindo que os camarões dessa espécie, criados nesse último sistema, estariam menos expostos às vibrioses.

#### 2.4.2. *Vibrio* spp.

Pertencentes à classe Gammaproteobacteria, as bactérias do gênero *Vibrio* são Gram negativo, catalase e oxidase positivo. Morfologicamente, caracterizam-se pela forma de bastonetes lineares ou curvos. As espécies desse gênero são móveis, anaeróbias facultativas, mesofílicas e quimiorganotróficas, capazes de realizar metabolismo fermentativo e oxidativo (Thompson *et al.*, 2004a). Várias espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* apresentam elevada tolerância a diferentes níveis de salinidade (Wright *et al.*, 1996), sendo a presença de sódio um requerimento essencial para a maioria delas (Tison e Kelly, 1984; Austin, 2010). As bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* estão amplamente distribuídas em ecossistemas aquáticos (Thompson *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2011; Tall *et al.* 2013), podendo ser encontradas em água doce ou água do mar (Urakawa e Rivera, 2006) (figura 8), comumente associadas aos animais que vivem nesses *habitat* (Heidelberg *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004a).

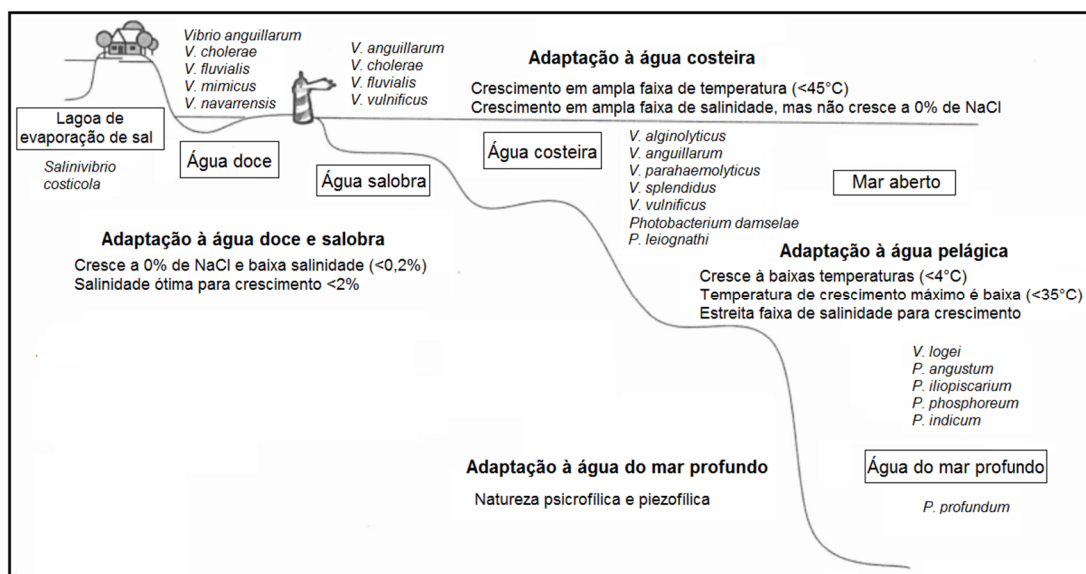


FIGURA 8. Distribuição específica de representantes da família Vibrionaceae em ambientes aquáticos

Fonte: Adaptado de Urakawa e Rivera, 2006.

As espécies de *Vibrio* constituem o principal grupo de bactérias heterotróficas cultiváveis presentes nas águas costeiras (Urakawa e Rivera, 2006), sobretudo nos ambientes ricos em quitina, provenientes de plâncton, crustáceos, insetos ou fungos (Gildemeister *et al.*, 1994). Os víbrios produzem um grande número de proteínas relacionadas à degradação e assimilação da quitina, incluindo enzimas quitinolíticas (Bassler *et al.*, 1991), e proteínas de ligação que possibilitam a adesão do víbrio às superfícies com quitina, como as relatadas em *Vibrio parahaemolyticus* (Gildemeister *et al.*, 1994) e *Vibrio harveyi* (Montgomery e Kirchman, 1993; Montgomery e Kirchman, 1994).

Apesar de as espécies de *Vibrio* serem constituintes da microbiota indígena de camarões selvagens e criados em sistemas comerciais, várias bactérias desse gênero são patogênicas para os organismos marinhos e responsáveis por altas taxas de mortalidade na aquicultura (Egidius, 1987; Vandenberghe *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2001; Oxley *et al.*, 2002, Austin, 2010) enquanto outras espécies de víbrios foram testadas como probióticos (*Vibrio alginolyticus* e *Vibrio fluvialis*) (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006).

Como os víbrios fazem parte da microbiota indígena, tanto do meio ambiente quanto do camarão, e considerando o seu caráter oportunista, esses micro-organismos representam uma fonte potencial permanente de infecção para os animais (Albuquerque *et al.*, 2013). As vibrioses – denominação genérica atribuída às infecções causadas por *Vibrio* spp. – assumem grande importância devido aos prejuízos ocasionados à exploração dos camarões, sobretudo em sistemas de criação intensiva (Elmahdi *et al.*, 2016; Heenatigala e Fernando, 2016), mas também por questões de saúde pública, associada à ingestão do camarão cru ou mal cozido contaminado com espécies de *Vibrio* patogênicas ao homem (Thompson *et al.*, 2004a).

De uma maneira geral, um ambiente estressante para os animais associa-se a uma redução da diversidade da comunidade bacteriana concomitante ao aumento da abundância relativa de determinadas espécies de *Vibrio* e ocorrência de doenças (Sung *et al.*, 2001). A maior diversidade microbiana no sistema de criação de camarões frequentemente reduz a vulnerabilidade dos animais à colonização de bactérias oportunistas, consequentemente reduzindo as bactérias potencialmente patogênicas (Olafsen, 2001). Ganesh *et al.* (2010) registraram surtos de doenças e mortalidade de camarões associadas a altas contagens de bactérias heterotróficas totais e de *V. parahaemolyticus* nas lagoas de criação de camarões.

*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* são relacionados como as principais espécies patogênicas para os camarões, principalmente quando os mecanismos de defesa do animal tornam-se suprimidos (Lightner e Redman, 1998), como ocorre nos sistemas de criação intensivos, onde os animais estão frequentemente expostos a condições de estresse e a altas densidades de estocagem e em água com baixa qualidade. De acordo com Heenatigala e Fernando (2016), as espécies de bactérias oportunistas podem variar de uma área geográfica para outra, entre os diferentes sistemas produtivos dentro de um país, bem como entre diferentes países.

Além de se encontrarem amplamente distribuídas no ambiente marinho, as bactérias do gênero *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2004a) foram identificadas como os principais constituintes da população gastrintestinal bacteriana de camarões peneídeos (Oxley *et al.*, 2002; Shakibazadeh *et al.*, 2009; Chaiyapechara *et al.*, 2012; Rungrassamee *et al.*, 2014). Embora a microbiota intestinal dos camarões sofra influência da microbiota do ambiente aquático, a composição e a estrutura da comunidade microbiana gastrintestinal são determinadas por outros fatores, entre eles pelas alterações do ambiente gastrintestinal que acompanham o desenvolvimento do hospedeiro (Zeng *et al.*, 2017).

## **2.5. Microbiota do trato gastrintestinal dos camarões peneídeos**

Nos animais aquáticos, a colonização bacteriana inicial do trato gastrintestinal é determinada pelo contato com o ambiente (Tzuc *et al.*, 2014). No camarão *L. vannamei*, a colonização do trato gastrintestinal pela microbiota bacteriana inicia-se durante o estágio larval correspondente a fase náuplio 5. Nesse estágio de desenvolvimento, a larva apresenta o poro anal aberto e os movimentos retroperistálticos do intestino permitem a colonização do trato intestinal por bactérias presentes na coluna d'água antes que ocorra a ingestão de alimentos (Simões *et al.*, 2002), pois a abertura da boca somente ocorre após a muda para a fase posterior, Zoea 1 (Lovett e Felder, 1989; Lovett e Felder, 1990; Simões *et al.*, 2002).

O termo microbiota intestinal refere-se ao conjunto de micro-organismos, principalmente bactérias, mas também alguns fungos e protozoários, que normalmente é encontrado no trato intestinal dos animais. A presença de bactérias intestinais em invertebrados aquáticos, incluindo os crustáceos, foi relatada (Harris, 1993; Tang *et al.*, 2010), mas o papel dessas bactérias e os

fatores que afetam a comunidade bacteriana ainda não foram completamente elucidados (Johnson *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2010; Zeng *et al.* 2017).

A composição bacteriana do trato gastrointestinal de camarões tem se mostrado muito semelhante em relação aos filos que a compõem, mas variável em relação aos gêneros e as espécies. Independentemente de outros fatores associados, como fase de desenvolvimento ou ambiente em que os animais foram amostrados, Proteobacteria foi descrito como o filo dominante associado ao trato gastrointestinal do *L. vannamei* (Johnson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017) e de outras espécies de camarão como *P. monodon* (Shakibazadeh *et al.*, 2009; Rungrassamee *et al.*, 2013; Rungrassamee *et al.*, 2014) e *Fenneropenaeus chinensis* (Liu *et al.*, 2011). Apenas Gainza *et al.* (2017) reportaram resultados diferentes para a fase de pós-larva do camarão *L. vannamei*, em que o filo de bactérias não cultiváveis CKC4 foi dominante, seguido do filo Proteobacteria.

Com o advento das metodologias para analisar o DNA ambiental, um grande número de espécies bacterianas foi descrito, no entanto, a única evidência da existência de muitas delas é a sequência do DNA. Um conjunto de sequência de DNA apresentando menos de 75% de similaridade com um filo bacteriano já descrito são agrupadas compondo um filo que recebe a denominação de “filo candidato”, como é o caso do filo CKC4, que não possui nenhum representante cultivável (Schloss *et al.*, 2016; Russell, 2017).

Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria são descritos como os outros filos mais abundantes na microbiota gastrointestinal do camarão *L. vannamei* (Huang *et al.*, 2016; Gainza, *et al.*, 2017, Wen *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017), havendo divergência entre os autores em relação à frequência relativa com que ocorrem. Mas, sem dúvida, as maiores divergências encontradas na literatura se referem aos gêneros que compõem a microbiota gastrointestinal dos camarões. Sha *et al.* (2016) descreveram *Octadecabacter*, *Acinetobacter*, *Demequina* e *Phaeobacter* como os gêneros mais abundantes na microbiota intestinal do *L. vannamei*. *Vibrio* foi descrito por Huang *et al.* (2016) como o gênero mais abundante na fase mais tardia de juvenis de *L. vannamei*, contrariamente ao relatado por Gainza *et al.* (2017) que, para a mesma fase de desenvolvimento dessa espécie de camarão, registraram uma frequência relativa de 0,64% de *Vibrio*. Cornejo-Granados *et al.* (2017) também relataram o gênero *Vibrio* entre os mais abundantes do microbioma do trato gastrointestinal do camarão branco do Pacífico, precedido dos gêneros *Photobacterium*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Contraditoriamente aos demais

resultados apresentados, Zeng *et al.* (2017) não reportaram o gênero *Vibrio* entre os mais abundantes gêneros componentes da microbiota gastrointestinal de *L. vannamei*. Pesquisando a microbiota intestinal de *P. monodon*, Rungrassamee *et al.* (2014) verificaram que os gêneros *Vibrio* e *Photobacterium* foram dominantes nas populações bacterianas intestinais dos animais avaliados. Chaiyapechara *et al.* (2012) também relataram esses dois gêneros citados como dominantes (sugerindo que estão bem adaptados às condições intestinais de *P. monodon*), além dos gêneros *Aeromonas* e *Shewanella*.

Para Zeng *et al.* (2017), a inconsonância entre a presença e a abundância relativa dos gêneros que compõem a microbiota gastrointestinal dos camarões, descritas pelos diferentes autores, refletem os efeitos da dieta, da qualidade de água, da densidade de estocagem e da fase de desenvolvimento do animal, que diferem entre os estudos. Podem ainda resultar das diferentes metodologias utilizadas para estudar a comunidade microbiana. De fato, ao caracterizar a microbiota gastrointestinal de camarões obtidos de diferentes ambientes, Cornejo-Granados *et al.* (2017) constataram que a microbiota intestinal de indivíduos provenientes de um mesmo ambiente apresenta maior semelhança do que a microbiota gastrointestinal de indivíduos de ambientes diferentes. Ainda, de acordo com esses autores, a microbiota intestinal dos camarões criados em um ambiente controlado, como são os sistemas de criação comercial, apresenta uma menor diversidade.

De acordo com Harris (1993), muitos fatores podem influenciar a população bacteriana intestinal em animais aquáticos, entre eles, o ambiente de criação (Oxley *et al.*, 2002; Chaiyapechara *et al.*, 2012, Rungrassamee *et al.*, 2014; Cornejo-Granados *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2017), a dieta (Li *et al.*, 2007; Rungrassamee *et al.* 2013), o revestimento da mucosa intestinal (Dempsey e Kitting, 1987; Gomez-Gil *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2008) e a fase de desenvolvimento dos animais (Rungrassamee *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016, Zeng *et al.*, 2017). Apesar de ser influenciada por diferentes fatores, a microbiota gastrointestinal dos camarões se difere quantitativa e qualitativamente da microbiota do meio ambiente que os circunda. Isso porque o ambiente gastrointestinal do camarão exerce pressão seletiva sobre a microbiota, considerando que possui enzimas necessárias para degradar o alimento ingerido e um menor potencial de oxirredução quando comparada à água do ambiente aquático e, ainda, que existem fatores imunológicos, determinando o estabelecimento de bactérias específicas (Johnson *et al.*, 2008). Diante disso, Chaiyapechara *et al.* (2012), Rungrassamee *et al.* (2014), Zhang *et al.* (2014) e Cardona *et al.* (2016) sugeriram que existe uma população bacteriana

núcleo componente da microbiota do trato gastrointestinal, que é compartilhada por todos os indivíduos.

A diversidade é um parâmetro que permite avaliar a estabilidade da comunidade microbiana. As comunidades bem organizadas e que mantêm um certo grau de diversidade são consideradas estáveis. Se qualquer tipo de estresse for introduzido nesta comunidade, a estabilidade pode ser perturbada e a diversidade microbiana ser alterada. Portanto, a diversidade microbiana pode ser utilizada para monitorar perturbações, sobretudo as perturbações da microbiota intestinal que comprometem a homeostasia do hospedeiro, podendo levar ao desenvolvimento de patologias (Fakruddin e Mannan, 2013).

Tradicionalmente, as populações bacterianas nos intestinos dos animais têm sido caracterizadas por métodos dependentes de cultivo e independentes de cultivo. De acordo com Kunin *et al.* (2008) e Wooley *et al.* (2010), apenas a minoria dos micro-organismos que habitam o trato gastrointestinal é cultivável, sendo raros os micro-organismos que vivem em comunidades simples. Considerando que as espécies interagem entre si e com seus *habitat*, uma cultura de clones – obtida do cultivo em laboratório - não representa a verdadeira situação de uma espécie na natureza. Diferentemente dos métodos clássicos, as análises independentes de cultivo acessam diretamente as comunidades microbianas em seus *habitat* naturais, permitindo que muitas espécies sejam observadas juntas, propiciando assim a caracterização das comunidades bacterianas do trato gastrointestinal e demonstração da dominância de grupos.

O desenvolvimento de pesquisas para aumentar a identificação de espécies bacterianas por meio de cultivo tem sido motivado por estudos, como os desenvolvidos por Wilson e Blichington (1996) e Hugon *et al.* (2013), que sugerem uma sobreposição imperfeita dos resultados obtidos pelos métodos dependentes e independentes de cultivo. As novas abordagens desenvolvidas para o cultivo bacteriano têm revelado que as metodologias independentes de cultivo também apresentam seus vieses na identificação de espécies bacterianas e que abordagens polifásicas para o estudo do microbioma gastrointestinal dos animais são necessárias para aumentar o conhecimento sobre a imensa riqueza de micro-organismos que o trato gastrointestinal dos animais alberga (Goodman *et al.*, 2011; Rettedal *et al.*, 2014; Lagier *et al.*, 2015; Lau *et al.*, 2016). A caracterização da microbiota intestinal de animais tem sido o cerne para o entendimento da relação entre hospedeiros e micro-organismos, sendo a manutenção do

equilíbrio dessa microbiota crucial para a manutenção da saúde do hospedeiro (Sekirov *et al.*, 2010, Gilliland *et al.*, 2012).

Embora as abordagens independentes de cultivo, como a metagenômica e a metatranscriptômica, possam fornecer informações sobre a funcionalidade das comunidades microbianas, ainda é importante isolar e cultivar espécies ou amostras microbianas individuais para se ter uma melhor compreensão da fisiologia das bactérias (Gao *et al.*, 2013). A obtenção de culturas bacterianas puras é fundamental para a caracterização funcional definitiva das bactérias e a definição de suas atividades biológicas nas interações bactéria-hospedeiro e interações entre as bactérias, associadas à saúde ou determinantes de doenças do hospedeiro (Rettendal *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2016). Além disso, somente o isolamento de bactérias permite explorar o potencial terapêutico de produtos bacterianos que afetam o hospedeiro e/ou a comunidade microbiana (Lau *et al.*, 2016).

## **2.6. Uso de probióticos na carcinicultura**

De acordo com Moss (2000), as bactérias intestinais podem fornecer nutrientes essenciais ao hospedeiro, como vitaminas e aminoácidos, e ainda melhorar a capacidade digestiva, pela síntese de enzimas exógenas. A capacidade metabólica desses micro-organismos tem sido objetivo de pesquisas. Neste sentido, Tzuc *et al.* (2014) isolaram e identificaram molecularmente bactérias do sistema digestivo do camarão marinho, *L. vannamei*, capazes de produzir enzimas extracelulares *in vitro* – proteases, amilases, lipases e quitinases – que degradam componentes da dieta dos camarões, com potencialidade para aumentar a digestibilidade dos alimentos, possibilitando a otimização de formulações de rações e redução de custos de produção.

O grupo de micro-organismos que compõe a microbiota dos camarões e desempenha funções benéficas ao hospedeiro tem sido intensamente pesquisado (Alavandi *et al.*, 2004; Schulze *et al.*, 2006; Vieira, 2010; Luis-Villaseñor *et al.*, 2015; Vidal, 2015). Segundo a FAO (2002), os micro-organismos vivos que conferem efeito benéfico ao indivíduo que os consome, em quantidades adequadas, recebem a denominação de probióticos. Para estender a definição de probióticos à aquicultura é importante considerar que alguns fatores são fundamentalmente diferentes em relação aos organismos terrestres. A microbiota gastrintestinal dos organismos aquáticos é influenciada pelo ambiente externo (temperatura da água, salinidade e qualidade da

água dos sistemas de criação) (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2012), principalmente devido ao constante fluxo de água que passa pelo trato digestivo dos animais aquáticos (Gatesoupe, 1999). Diante do exposto, Verschuere *et al.* (2000) sugeriram que micro-organismos vivos com efeitos benéficos sobre o animal - administrados ao hospedeiro ou ao ambiente - que proporcionem um incremento nutricional ou favoreçam a utilização do alimento, melhorem a resistência às doenças e/ou a qualidade do ambiente, fosse a definição de probiótico para a aquicultura. Entretanto, para Gatesoupe (1999), a extensão do conceito de probiótico para aquicultura somente é pertinente quando os micro-organismos administrados na água sobrevivem no trato gastrointestinal dos animais, caso contrário os produtos devem denominar-se biocontroladores – se possuírem atividade antagonista aos agentes patogênicos presentes na água e nos biofilmes formados nas paredes dos tanques de criação - ou biorremediadores, se promoverem apenas a melhoria na qualidade da água. Sendo assim, os biorremediadores e biocontroladores atuam diretamente no ambiente de criação e os efeitos benéficos observados nos animais são indiretos.

Ressalta-se que a utilização de micro-organismos probióticos constitui uma perspectiva extremamente interessante com o aumento da conscientização sobre o uso excessivo de antimicrobianos e os possíveis transtornos à saúde desses aos animais e ao homem (Gaggìa *et al.*, 2010; McFall-Ngaia *et al.*, 2013), auxiliando na prevenção da contaminação ambiental e efeitos adversos à saúde dos consumidores. As bactérias intestinais constituintes da microbiota indígena do hospedeiro são consideradas as mais promissoras candidatas ao desenvolvimento de probióticos, principalmente devido à adaptação às condições do lúmen e adesão ao epitélio (Suárez, 2013).

A maioria dos produtos comerciais contendo probióticos comerciais utilizados na carcinicultura são formulados com bactérias nitrificantes e/ou espécies de bactérias do gênero *Bacillus*. As bactérias nitrificantes possuem nichos ecológicos estritos e não foram detectadas no trato gastrointestinal de camarões. As amostras de *Bacillus* utilizadas como probióticas não são indígenas do trato gastrointestinal de camarões (Gao *et al.*, 2017), embora espécies de *Bacillus* tenham sido isoladas de outros crustáceos (Sharmila *et al.*, 1996). A escolha das amostras de *Bacillus* para serem utilizadas como probióticos fundamenta-se em sua atividade antimicrobiana contra as espécies de *Vibrio* presentes na água do sistema de criação (Moriarty, 1999), melhorando assim a qualidade da água, sem uma relação claramente definida sobre o efeito desses micro-organismos na saúde dos animais, particularmente associado à microbiota

gastrointestinal (Gatesoupe, 1999). De acordo com Ferreira *et al.* (2017), no sistema de bioflocos já existe uma comunidade bacteriana estável estabelecida que auxilia no controle de patógenos, não havendo benefício em se adicionar um probiótico ao sistema.

Gao *et al.* (2017) identificaram que a amostra de *Bacillus pumilus*, isolada de sedimento marinho e utilizada como probiótico, produzia uma substância com atividade antagonista frente a amostras de *Vibrio* spp. capazes de romper a membrana celular, causando lise dessas bactérias patogênicas. Zeng *et al.* (2017), ao caracterizarem a microbiota do trato gastrointestinal de camarões criados em água com adição de espécies de *Bacillus* e *Lactobacillus* como probiótico, encontraram uma abundância relativa muito baixa desses gêneros no trato gastrointestinal dos camarões, de 0,9% e 0,04%, respectivamente, sugerindo que os micro-organismos adicionados como probióticos não conseguiram estabelecer uma grande população na microbiota do camarão.

## **2.7. Aplicação da espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na identificação de bactérias**

É importante ressaltar que, por muito tempo, os métodos utilizados para a identificação das bactérias isoladas em meio de cultura foram baseados nas características morfo-tintoriais, bioquímicas e fisiológicas dos micro-organismos (Amann *et al.*, 1995; Perry e Freydière, 2007; Ignyś *et al.*, 2014). Essas técnicas são laboriosas e, quando comparadas aos métodos moleculares, pouco acuradas, decorrentes das discrepâncias nos resultados obtidos, pois os testes bioquímicos dependem dos processos metabólicos das bactérias (Mimica *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013).

A espectrometria de massa tem sido comumente utilizada em laboratórios de microbiologia, sendo considerada uma técnica promissora na rápida identificação de micro-organismos. Para essa finalidade, os espectrofotômetros do tipo MALDI-TOF MS são os mais comumente utilizados (Lay, 2001; Assis *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013). O MALDI-TOF MS utiliza técnicas mais brandas de ionização que permitem a análise de moléculas de massa molecular elevado como proteínas, peptídeos, oligossacarídeos e oligonucleotídeos, sem a decomposição destes analitos (Lay, 2001).

A sigla MALDI, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, refere-se ao processo de ionização a laser assistida por matriz. A matriz utilizada no processo é um ácido orgânico, como, por exemplo, ácido  $\alpha$ -ciano-cinamínico ou ácido sinapínico, que fornece um próton para o processo de ionização da amostra e, ainda, absorve a energia emitida pelo *laser* para desencadear o processo de dessorção, que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o estado gasoso (Aebersold e Mann, 2003). Em seguida, as moléculas ionizadas são aceleradas por um campo magnético dentro de um tubo com vácuo e separadas em função de suas massas moleculares e suas cargas, obtendo-se assim a medida da relação massa/carga (Emonet *et al.*, 2010). A sigla TOF, do inglês *Time of Flight*, caracteriza o tempo do voo da amostra ionizada no tubo com vácuo, até que atinja o detector (Aebersold e Mann, 2003). Moléculas com diferentes massas e cargas possuem diferentes velocidades de voo. Os resultados são comparados com um banco de dados e, dependendo do espectro de massa obtido, é possível classificar a bactéria em gênero ou espécie (Emonet *et al.*, 2010). A figura 9 apresenta o esquema do mecanismo de funcionamento do MALDI-TOF MS.

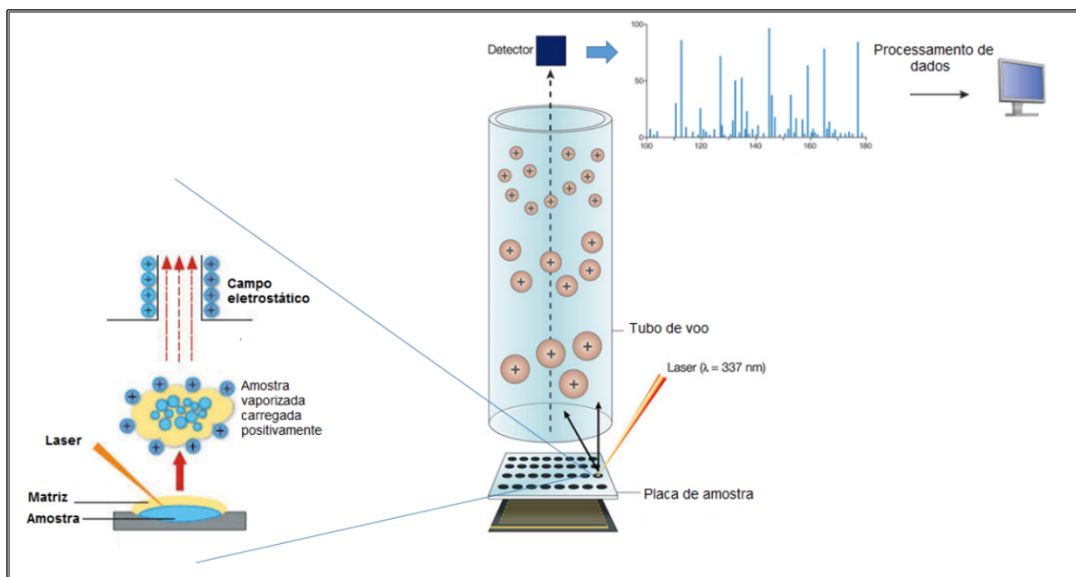


FIGURA 9. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento de MALDI-TOF MS. Uma pequena quantidade da colônia bacteriana é depositada sobre uma placa, juntamente com a solução matriz, ocasionando a ionização da amostra. Em seguida, a placa é inserida no equipamento, no qual o laser dispara pulsos de luz que são absorvidos pela matriz provocando o processo de dessorção da matriz e da amostra. A amostra na fase gasosa e ionizada (representada por círculos com o símbolo +) é acelerada por um campo elétrico em um tubo com vácuo, no qual são separadas em função da relação massa/carga. O tempo que a amostra leva para percorrer a distância entre a placa e o detector é proporcional à massa, de forma que moléculas menores chegam mais rápido ao detector. Há uma transdução do sinal e o espectro de massa é gerado de acordo com a massa das moléculas que estão presentes na amostra.

Fonte: Adaptado de Assis *et al.*, 2011.

A espectrometria de massa aplicada à identificação de micro-organismos analisa células bacterianas intactas, que podem ser retiradas diretamente das colônias cultivadas em placas, sem uma preparação prévia - embora existam outros protocolos de preparação das amostras para a extração das proteínas. Cada espécie bacteriana possui proteínas únicas que são constantemente expressas, produzindo um espectro de proteínas típicas de cada espécie - que funciona como uma impressão digital (*fingerprinting*) - que pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em bancos de dados (Assis *et al.*, 2011). A identificação feita por MALDI-TOF MS é baseada na análise do espectro de proteínas do ribossomo bacteriano, estando, portanto, intimamente relacionada às análises do sequenciamento do gene rRNA 16S (Santos *et al.*, 2013) e bastante conservadas geneticamente por exercer função auxiliar na conformação tridimensional do ribossomo. A quantidade de proteínas ribossomais é muito superior a quantidade dos outros analitos presentes na célula bacteriana (mascarando os sinais por eles emitidos), sobretudo nas células em processo de divisão, nas quais há um grande número de ribossomos (Assis *et al.*, 2011).

A principal vantagem do MALDI-TOF MS é a confiabilidade quanto à identificação das bactérias pela análise do perfil das proteínas ribossomais ao invés da diferenciação física, bioquímica e metabólica e, em comparação com os métodos moleculares, menor tempo necessário para a identificação dos micro-organismos (Santos *et al.*, 2013). O tempo de identificação da amostra, após o cultivo em placas, varia entre 1 a 2 minutos (Emonet *et al.*, 2010; Assis *et al.*, 2011). Por essa razão, a identificação bacteriana utilizando MALDI-TOF MS tem sido mais intensivamente pesquisada associada a micro-organismos patogênicos, sobretudo aqueles envolvidos em enfermidades graves, em que o diagnóstico precoce possibilita a escolha de uma terapêutica antimicrobiana adequada, impactando diretamente no prognóstico do paciente (Emonet *et al.*, 2010; Carbonnelle *et al.*, 2011; Biswas e Rolain, 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local

O estudo foi conduzido em uma unidade de produção comercial de *L. vannamei* localizada no distrito de Estiva, município de Sete Lagoas/MG, Brasil, com latitude de 19°36'58,94" e longitude 44°25'75,08", a aproximadamente 600 km do oceano Atlântico, em altitude de 766m, durante o período de abril a julho de 2017.

Por se tratar de um estudo que utiliza camarões, que são animais invertebrados, não foi necessária a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CETEA/UFMG.

#### 3.2. Material biológico e instalações

As pós-larvas (PL) do camarão *Litopenaeus vannamei*, com 10 dias após a última metamorfose (PL<sub>10</sub>) foram adquiridas de um laboratório comercial (Aquatec Ltda, Canguaretama, RN, Brasil), acompanhadas de atestado de sanidade animal, emitido por Médico Veterinário, relatando que as pós-larvas foram provenientes de estabelecimento no qual não foi constatado nenhum foco de enfermidades de notificação obrigatória nos 90 dias anteriores à aquisição dos animais e que os mesmos não apresentavam sinais clínicos de doenças infectocontagiosas ou parasitárias. O transporte dos animais do laboratório comercial para o sistema de criação ocorreu por via aérea, acondicionados em sacos plásticos contendo 1/3 de água e 2/3 de oxigênio. Os sacos plásticos, por sua vez, foram acondicionados em caixas de papelão revestidas internamente por lâminas de isopor. Após aclimação, 80 mil PL foram estocadas em um tanque-berçário circular construído em estrutura metálica suspensa – com 1m de altura, revestido com manta de policloreto de vinil (PVC) atóxica, com capacidade útil de 25m<sup>3</sup>. Nessa fase, foi fornecida ração comercial extrusada contendo 40% de proteína bruta, indicada para alimentação de camarões na fase pós-larva (R1), *ad libitum*, oito vezes ao dia, durante 35 dias.

Ao término da fase de berçário, os camarões foram transferidos para um tanque de engorda, também em estrutura metálica suspensa – com 1 m de altura, revestido com manta de policloreto

de vinil (PVC) atóxica, com capacidade útil de 100m<sup>3</sup>, construído em formato de *raceway*, com uma divisória central e extremidades arredondadas, com dimensões de 5m de largura por 20m de comprimento. A partir dessa fase, os animais passaram a ser alimentados com ração extrusada comercial, *ad libitum*, quatro vezes ao dia. De acordo com o peso dos animais, mas respeitando-se o intervalo de 35 dias, a ração foi substituída, sendo utilizadas para essa fase três tipos diferentes de ração: R2 (indicada para alimentação de camarões na fase juvenil até 3g, contendo 40% de proteína bruta), R3 (indicada para alimentação de camarões com peso entre 3 a 6g, criados em sistema intensivo de produção, contendo 38% de proteína bruta) e R4 (indicada para camarões com peso superior a 5g, criados em sistema intensivo de produção, contendo 35% de proteína bruta). As rações fornecidas aos animais, com exceção da ração R4, apresentavam em sua composição, de acordo com o fabricante, a presença de *Pediococcus acidilactici* ou *Bacillus* spp. como probiótico, na concentração de 1,5 x 10<sup>9</sup> UFC/kg de ração.

Ambos os tanques estavam abrigados em estufa fechada, recobertos com tela de sombreamento para limitar a incidência da luz solar (50% de inibição da luz). A aeração do sistema foi realizada com injetores Venturi tipo *Nozzle* conectados a bombas centrífugas, dispostos em número de 20 unidades por tanque de engorda, proporcionando também a circulação de água do sistema.

### **3.3. Fertilização orgânica**

O sistema de bioflocos sem renovação de água foi adotado na criação dos camarões em todas as fases do ciclo de produção. Inicialmente, os tanques foram preenchidos com água proveniente de poço profundo, localizado na propriedade, equipado com bomba, sem nenhum tratamento prévio, salinizada artificialmente (25‰). Essa água foi utilizada posteriormente apenas para repor a água dos tanques de criação dos animais perdida pelo processo de evaporação, uma vez que não foram efetuadas trocas de água nos tanques. Para a formação e manutenção dos bioflocos, fertilizações foram realizadas para a conversão do nitrogênio em biomassa bacteriana. A fonte de carbono utilizada foi o açúcar de cana cristal, sendo considerado o teor de carbono do açúcar para o cálculo da quantidade a ser adicionada ao sistema. Nos quatro primeiros dias utilizou-se metodologia proposta por Avnimelech (1999), em que a quantidade de açúcar adicionada foi determinada pelo teor de proteína da ração comercial utilizada para a manutenção da relação C:N em 20:1. Após esse período, as adições da fonte de carbono foram realizadas de acordo com Ebeling *et al.* (2006), empregando-se uma

relação C:N de 6:1 e baseando-se na mensuração da amônia total (N-AT). A adição do açúcar ao sistema, quando necessário, foi feita de forma fracionada, nos horários de 10h, 14h, 18h e 22h. As clarificações do sistema foram realizadas com decantadores, sempre quando o valor de sólidos sedimentáveis (SS) excediam 15mL/L, até que o valor mínimo de 10mL/L fosse atingido.

Além disso, um produto comercial contendo probióticos, indicado para peixes e camarões, composto de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*, com concentração bacteriana total na ordem de  $10^{12}$  UFC/g, segundo informações do fabricante, foi adicionado à água dos tanques de criação. O produto foi utilizado a cada 48h, na concentração de 0,2mg/L de água, de acordo com as recomendações do fabricante.

### **3.4. Monitoramento da qualidade da água do tanque de criação**

Durante o ciclo de produção dos camarões, os parâmetros físico-químicos da água monitorados diariamente foram a temperatura, o oxigênio dissolvido (DO), o pH e a salinidade, com o auxílio de uma sonda multiparâmetros AK88 (AKSO®, Akso Produtos Eletrônicos Ltda., São Leopoldo, RS, Brasil). As variáveis da série nitrogenada, nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e amônia total (N-AT), e o fosfato (P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>) foram determinadas conforme metodologia preconizada por UNESCO (1983), sendo a amônia com frequência diária e os demais parâmetros semanalmente. A alcalinidade foi determinada semanalmente, de acordo como metodologia descrita por APHA (1989). Para a determinação de sólidos sedimentáveis (SS), realizada diariamente, utilizou-se o método do cone de Imhoff, de acordo com a metodologia adaptada por Avnimelech (2007).

### **3.5. Coleta de amostras**

A coleta das amostras de camarão foi definida em função da troca de ração que, por sua vez, baseou-se na fase de criação. Assim, foram coletados camarões das embalagens de transporte (PL<sub>10</sub>) - antes de serem introduzidos no sistema de criação, sete dias após o povoamento do tanque-berçário recebendo a ração R1 e, no tanque de engorda, a cada 15 dias após o início do

fornecimento das rações subsequentes (R2, R3 e R4), conforme esquema apresentado na figura 10, constituindo, portanto, os grupos de camarões PL<sub>10</sub>, CR1, CR2, CR3 e CR4.

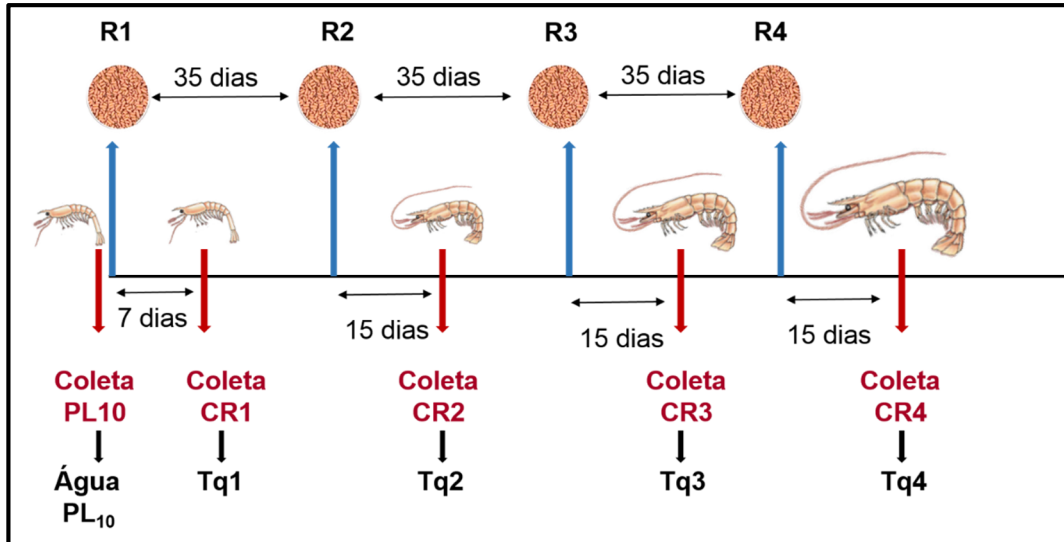


FIGURA 10. Cronograma de coleta de amostras realizado em função da troca da ração fornecida aos camarões, criados em sistema de bioflocos

Aproximadamente 100 animais foram coletados aleatoriamente, diretamente dos tanques de criação, com auxílio de puçás, e transportados vivos, em sacos plásticos contendo água do próprio tanque e oxigênio na proporção de 1/3 de água e 2/3 de oxigênio, para o laboratório de Inspeção de Carnes do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DTIPOA/EV/UFMG).

Também foram coletadas amostras de água do tanque de criação dos camarões, por ocasião da coleta das amostras dos animais, constituindo as amostras Tq1, Tq2, Tq3 e Tq4, além de uma amostra da água utilizada no transporte das pós-larvas (Água PL<sub>10</sub>) (figura 8). Ainda, a cada coleta de camarões, coletou-se uma amostra da água que foi utilizada inicialmente para encher os tanques de criação e, posteriormente, para repor a água dos tanques perdida por evaporação (poço).

As amostras de água foram coletadas em frascos de plástico esterilizados, diretamente do tanque e da embalagem de transporte. As amostras da água do poço foram coletadas da torneira mais próxima da saída do poço, após o acionamento da bomba e abertura da torneira, deixando-se a água escoar por aproximadamente 1 minuto, para eliminação da água estagnada da tubulação.

Após a coleta, as amostras de água foram acondicionadas em caixa isotérmica, contendo gelo reciclável, e foram transportadas imediatamente para processamento das análises microbiológicas.

Amostras das rações que foram fornecidas aos camarões e do produto comercial contendo probióticos, adicionado à água dos tanques de criação dos animais, foram coletadas para análise, em sacos plásticos de primeiro uso.

### **3.6. Análises laboratoriais**

#### **3.6.1. Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas das amostras de água, do trato gastrointestinal dos camarões, das rações e do produto comercial contendo probióticos foram realizadas nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Inspeção de Carnes do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DTIPOA/EV/UFMG).

##### **3.6.1.1. Preparo das amostras de água, rações e produto comercial contendo probióticos**

As amostras de água foram homogeneizadas. Em seguida, uma alíquota de 1mL foi adicionada em tubos contendo 9mL de solução salina tamponada estéril, para a obtenção da diluição  $10^{-1}$ . Para as amostras coletadas dos tanques de criação dos animais foram preparadas diluições decimais até  $10^{-4}$  (ISO 6887-1:2017).

Para as análises das rações foram pesadas 25g da amostra e adicionadas a 225mL de salina peptonada 0,1%, para obtenção de uma diluição  $10^{-1}$ . Após a homogeneização, seguiram-se diluições seriadas em salina peptonada 0,1%, até  $10^{-10}$  (ISO 6887-1:2017). Para as análises do produto comercial contendo probióticos, pesou-se 1g da amostra que foi adicionada em 9mL de salina peptonada 0,1%, para obtenção de uma diluição  $10^{-1}$ . Após a homogeneização, seguiram-se diluições seriadas em salina peptonada 0,1%, até  $10^{-12}$  (modificado de ISO 6887-1:2017).

### 3.6.1.2. Coleta e preparo das amostras do trato gastrintestinal dos camarões

Os animais foram eutanasiados por hipotermia, sendo imersos em água com gelo. Em seguida, a superfície externa dos camarões foi descontaminada com solução de etanol a 70% (v/v) e lavada, com auxílio de uma pisseta, com solução salina tamponada estéril (16g de NaCl, 0,40g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,3g de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  e 0,40g de KCl em 1.000 mL de água destilada).

Para o isolamento das bactérias na fase de pós-larva (PL<sub>10</sub> e R1), animais inteiros foram agrupados para formar uma amostra composta, uma vez que o tamanho reduzido de cada indivíduo inviabilizou a remoção do trato gastrintestinal em condições assépticas. Para que as análises microbiológicas fossem adequadamente executadas, a amostra composta deveria apresentar um peso mínimo de 0,2g, utilizando-se para isso aproximadamente 20 indivíduos, já que o lote de camarões não era homogêneo em relação ao tamanho dos animais. Os animais foram colocados em um frasco esterilizado, contendo uma quantidade conhecida de salina tamponada estéril, a fim de se evitar que a amostra se aderisse à parede do frasco. A quantidade de salina previamente adicionada foi considerada para a determinação do peso da amostra e para se proceder a diluição  $10^{-1}$ . Em seguida, os animais foram macerados utilizando um bastão de vidro estéril e a solução homogeneizada com auxílio de agitador de tubos tipo Vortex (Quimis®, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil). Após a homogeneização, diluições decimais até  $10^{-7}$  foram preparadas com solução salina tamponada estéril. Para a realização das análises microbiológicas, foram preparadas três amostras compostas de cada uma das fases PL<sub>10</sub> e R1.

De cada animal correspondendo a fase CR2 foi removido, assepticamente, o trato gastrintestinal completo. Os tratos gastrintestinais de aproximadamente 15 indivíduos foram agrupados, para formar uma amostra composta, da mesma maneira que descrito anteriormente, a fim de se obter uma diluição  $10^{-1}$ . Em seguida diluições decimais foram preparadas até  $10^{-7}$ . Para a realização das análises microbiológicas, foram preparadas três amostras compostas dos intestinos dos animais da fase R2.

O trato gastrintestinal de cada camarão das fases CR3 e CR4 foi dividido em três segmentos distintos: anterior, correspondendo ao intestino anterior e hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior, como esquematizado na figura 11. Os mesmos segmentos do trato gastrintestinal de aproximadamente 15 camarões foram reunidos para formar uma única

amostra composta de cada um dos segmentos, identificadas como CR3A; CR4A, para a porção anterior, CR3M; CR4M para os intestinos médios e CR3P; CR4P para os intestinos posteriores, de acordo com a fase de coleta do camarão, seguindo a metodologia descrita anteriormente para obter uma diluição  $10^{-1}$  e em seguida diluições decimais até  $10^{-7}$ . Para a realização das análises microbiológicas, foram preparadas três amostras compostas de cada um dos segmentos do intestino dos animais das fases R3 e R4.

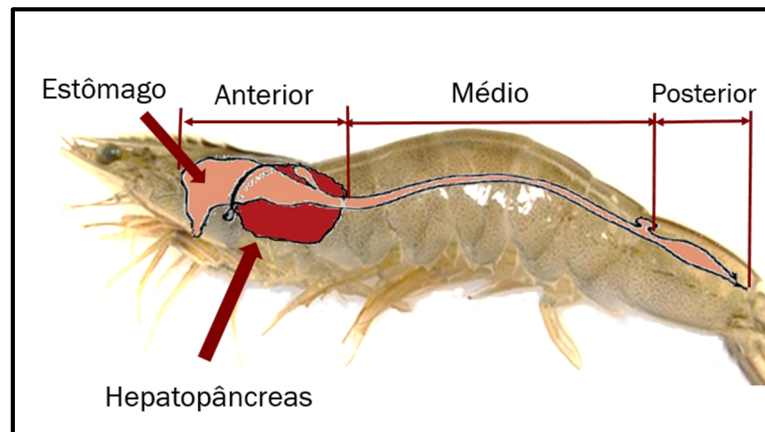


FIGURA 11. Representação esquemática da divisão do trato gastrintestinal do camarão *L. vannamei* realizada para análises microbiológicas

Fonte: Adaptado de Felgenhauer, 1992.

3.6.1.3. Isolamento, enumeração e identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) de bactérias do trato gastrintestinal dos camarões, da água do sistema de criação, das rações e do produto comercial contendo probióticos

Cinco diferentes meios de cultura foram selecionados para a contagem e isolamento de microorganismos presentes no trato gastrintestinal dos camarões e na água do sistema de criação, sendo dois meios não seletivos (Ágar Marinho 2216 Zobell - AM e Ágar Triptona de Soja - TSA) e três meios seletivos (Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose -TCBS, Ágar *Man-Rogosa-Sharpe* - MRS e Ágar MacConKey - MC). O ágar marinho é um meio não seletivo, formulado com o objetivo de mimetizar a composição da água do mar, utilizado para o cultivo de bactérias heterotróficas aeróbias de ambientes marinhos, enquanto o ágar TSA é usado para o cultivo de bactérias oriundas de diversos ambientes como água, solo, fezes, entre outros. O ágar TCBS é um meio de cultura seletivo que proporciona o desenvolvimento de bactérias do

gênero *Vibrio*, enquanto o ágar MRS é um meio seletivo para o desenvolvimento de bactérias ácido-láticas e o ágar MacConkey favorece o isolamento de Enterobacteriaceae e outros bastonetes Gram negativo.

#### 3.6.1.3.1. Enumeração de bactérias heterotróficas aeróbias marinhas

Foi utilizada uma alíquota de 0,1mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  das amostras do trato gastrointestinal;  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  das amostras da água do tanque de criação e  $10^{-1}$  das amostras da água do poço para semear uma placa de Petri contendo Ágar Marinho 2216 Zobell - AM (TMMedia, Titan Biotech Ltd, Rajasthan, Índia). Também foi utilizada uma alíquota de 1mL das amostras da água do poço, sem diluição, para semear três placas com ágar marinho, constituindo a denominada diluição  $10^0$ . Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar (*spread plate*) e em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida, a  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 40 horas, em incubadora B.O.D. 347 CD (FANEM®, FANEM Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e a densidade populacional expressa em unidades formadoras de colônias por mL ou g da amostra (UFC/mL ou g) (modificado de APHA, 2005 e Nurhidayu *et al.*, 2012).

#### 3.6.1.3.2. Enumeração de bactérias heterotróficas totais

Foi utilizada uma alíquota de 0,1mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  das amostras do trato gastrointestinal;  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  das amostras da água do tanque de criação e  $10^{-1}$  das amostras da água do poço para semear uma placa de Petri contendo Ágar Triptona Soja - TSA (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, Inglaterra). Também foi utilizada uma alíquota de 1mL das amostras da água do poço, sem diluição, para semear três placas com ágar TSA, constituindo a denominada diluição  $10^0$ . Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar (*spread plate*) e, em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, em estufa. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e a densidade populacional expressa em unidades formadoras de colônias por mL ou g da amostra (UFC/mL ou g) (modificado de APHA, 2005 e Nurhidayu *et al.*, 2012).

#### 3.6.1.3.3. Enumeração de *Vibrio* spp.

Foi utilizada uma alíquota de 0,1mL das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  das amostras do trato gastrintestinal;  $10^0$  (amostra sem diluição),  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  das amostras da água do tanque de criação e  $10^0$  (amostra sem diluição) e  $10^{-1}$  das amostras da água do poço para semear uma placa de Petri contendo Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose - TCBS (Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, Estados Unidos). Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar (*spread plate*) e, em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas, em estufa. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e a densidade populacional expressa em unidades formadoras de colônias por mL ou g da amostra (UFC/mL ou g) (ISO 21872-1:2017).

#### 3.6.1.3.4. Enumeração de bactérias ácido-láticas

Foi utilizada uma alíquota de 0,1mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  para as amostras de ração,  $10^{-1}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$  para a amostra do produto comercial contendo probióticos,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  das amostras do trato gastrintestinal;  $10^{-1}$  das amostras da água do tanque de criação e das amostras da água do poço para semear uma placa de Petri contendo Ágar de *Man-Rogosa-Sharpe* - MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha) e o meio M17 (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) foi utilizado apenas para as amostras de ração e do produto comercial contendo probióticos. Também foi utilizada uma alíquota de 1mL das amostras da água do tanque de criação e das amostras da água do poço, sem diluição, para semear três placas com ágar MRS, constituindo a denominada diluição  $10^{00}$ . Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar (*spread plate*) e, em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida, em aerobiose, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas, em estufa. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e a densidade populacional expressa em unidades formadoras de colônias por mL ou g da amostra (UFC/mL ou g) (ISO 7889:2003).

#### 3.6.1.3.5. Enumeração de enterobactérias

Foi utilizada uma alíquota de 0,1mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  das amostras do trato gastrintestinal;  $10^{-1}$  das amostras da água do tanque de criação e das amostras da água do poço para semear uma placa de Petri contendo Ágar MacConkey- MC (Difco Laboratories Inc.,

Detroit, Estados Unidos). Também foi utilizada uma alíquota de 1mL das amostras da água do tanque de criação e das amostras da água do poço, sem diluição, para semear três placas contendo Ágar MacConkey, constituindo a denominada diluição  $10^{00}$ . Com auxílio de alça uma de Drigalski, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar (*spread plate*) e em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 a 48 horas, em estufa. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e a densidade populacional expressa em unidades formadoras de colônias por mL ou g da amostra (UFC/mL ou g) (Shakibazadeh *et al.*, 2009).

#### 3.6.1.3.6. Enumeração de micro-organismos aeróbios

Foi utilizada uma alíquota de 0,1mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  para as amostras de ração,  $10^{-1}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$  para a amostra do produto comercial contendo probióticos para semear uma placa de Petri contendo Ágar BHI (BD). Com auxílio de uma alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar (*spread plate*) e, em seguida, as placas foram incubadas em posição invertida, em aerobiose, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas, em estufa. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e a densidade populacional expressa em unidades formadoras de colônias por mL ou g da amostra (UFC/mL ou g) (adaptado de Kent *et al.*, 2016).

#### 3.6.1.3.7. Isolamento e seleção das colônias para identificação por espectrometria de massa

As características morfológicas e de pigmentação das colônias identificadas nas placas dos diferentes meios de cultura utilizados foram registradas. Um tipo representativo de cada colônia com morfologia distinta, de cada amostra, foi selecionado e inoculado em 5mL de caldo Infusão cérebro coração – BHI (BD, Flanklin Lanes, Estados Unidos), para as colônias selecionadas nos meios MRS, MC, TSA e BHI, e em 5mL de caldo BHI adicionado de 1% de NaCl (caldo BHI-NaCl), para as colônias selecionadas nos meios AM e TCBS. Em seguida, os caldos foram incubados, em estufa, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Após o período de incubação, alíquotas dos caldos BHI e BHI-NaCl foram estriadas, com auxílio de alças de níquel-cromo, nas superfícies de ágar BHI (BD, Flanklin Lanes, Estados Unidos) e BHI adicionado de 1% de NaCl (BHI-NaCl), respectivamente, para obtenção de culturas puras. As placas foram incubadas em estufa, a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, as colônias foram e

submetidas à identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser por matriz (MALDI-TOF MS).

#### 3.6.1.3.8. Identificação das bactérias por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser por matriz (MALDI-TOF MS)

A identificação das bactérias isoladas foi realizada no Laboratório Nacional de Referência para Doenças de Animais Aquáticos (AQUACEN) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sediado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DMVP/EV/UFMG).

O material fresco de uma única colônia bacteriana de cada amostra foi transferido, com auxílio de um palito de dente, para uma placa alvo de aço inoxidável. Foram adicionados 1 µL de ácido fórmico a 70% e 1 µL de solução matriz MALDI-TOF MS, constituída por uma solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), ao sedimento bacteriano de cada amostra depositado na placa. Após secar ao ar, a placa foi inserida no espectrômetro de massa FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics). Antes das medições, foi realizada a calibração do equipamento com um padrão de teste bacteriano (*E. coli* DH5 alpha; Bruker Daltonics). Os espectros obtidos foram analisados pelo programa MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Estados Unidos) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana. O algoritmo utilizado pelo MALDI Biotyper confronta os espectros da amostra desconhecida com as amostras de referência contidas no banco de dados de referência. O critério de identificação utilizado foi o recomendado pelo fabricante:  $score \geq 2,000$  indica uma identificação ao nível de espécie,  $< 2,000$  e  $\geq 1,700$  indica uma identificação ao nível de gênero e  $< 1,700$  indica que a identificação não é confiável (Assis *et al.*, 2017).

#### 3.6.1.4. Pesquisa de doenças infecciosas de camarões

A pesquisa de doenças infecciosas de camarões foi realizada no Laboratório Nacional de Referência para Doenças de Animais Aquáticos (AQUACEN) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sediado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DMVP/EV/UFMG).

Nas mesmas fases de criação em que foram coletados os camarões para a realização das análises microbiológicas, foram coletadas amostras de camarões inteiros para a pesquisa de doenças infecciosas que podem acometer o camarão *L. vannamei*. Os camarões foram eutanasiados por hipotermia, sendo imersos em água com gelo. Em seguida, 15 camarões foram acondicionados em frascos de coleta estéreis, fixados em álcool a 95% e remetidos ao laboratório para a pesquisa de doenças infecciosas, à temperatura ambiente.

De cada uma das amostras, DNA e RNA foram extraídos, separadamente. O DNA foi utilizado para a realização das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) para a detecção do vírus da Mancha Branca (WSSV) (OIE, 2012a), do vírus da Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa (IHHNV) (OIE, 2015a) e da doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND) (Nunan *et al.*, 2014; Han *et al.* 2015). O RNA foi utilizado para a realização das técnicas de reação de transcrição reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RTqPCR) para a detecção do vírus causador da mionecrose infecciosa (IMNV) (OIE, 2012b), do vírus causador da síndrome Taura (TSV) (OIE, 2015b), para o vírus da doença da cabeça amarela (YHV) (Dhar *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2008; OIE, 2012c) e para a hepatobactéria causadora da hepatopancreatite necrosante (NHP) (OIE, 2015c).

#### 3.6.1.5. Análise bromatológica das rações

As rações comerciais utilizadas na alimentação dos camarões durante o período de criação foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), seguindo metodologia proposta pela AOAC (2010). As análises foram processadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (DZOO/EV/UFMG). Os valores obtidos com as análises das rações foram comparados aos níveis de garantia especificados nos rótulos dos produtos.

#### 3.6.1.6. Análise estatística

Os dados obtidos com as contagens bacterianas foram analisados para verificar se atendiam as premissas de normalidade, aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os dados que apresentaram distribuição normal - as contagens de bactérias heterotróficas (tanto feitas em ágar marinho quanto em ágar TSA), as contagens de *Vibrio* e os dados referentes às contagens

de bactérias ácido-láticas das fases em que houve divisão dos tratos gastrintestinais em porções foram submetidos à Análise de Variância, utilizando *two-way* ANOVA. O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre os tratamentos, a um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05.

Para os demais dados que não apresentaram distribuição normal, as suas medianas foram submetidas ao teste estatísticos de Kruskal-Wallis, a um nível de significância de ( $\alpha$ ) de 0,05. Para os cálculos estatísticos foi utilizando o programa *GraphPad Prism*, versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise da qualidade da água dos tanques de criação dos camarões

O monitoramento dos parâmetros de qualidade da água é essencial para a manutenção de qualquer sistema adotado para a criação de animais aquáticos. Nos sistemas de criação de camarões utilizando bioflocos sem renovação de água, esse monitoramento torna-se primordial, uma vez que o acúmulo de determinados compostos na água é inevitável e a demanda de oxigênio dissolvido na água é muito maior do que em sistemas convencionais, decorrente não somente da alta densidade de estocagem dos animais, mas também pela demanda da comunidade microbiana presente na água (Godoy *et al.*, 2010). Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos da água dos tanques, berçário e de engorda, são apresentadas na tabela 1.

Concentrações de oxigênio dissolvido superiores a 5mg/L são consideradas ideais por Van Wyk e Scarpa (1999) na criação do camarão branco do Pacífico em sistema de bioflocos. Já para Boyd e Clay (2002), as concentrações de oxigênio dissolvido na água superiores a 4mg/L são consideradas ideais para a criação dessa espécie de camarão, em sistemas de criação intensivo. As concentrações médias de oxigênio dissolvido verificadas nos tanques de criação dos camarões avaliados neste trabalho, exceto na fase R3, foram superiores aos níveis sugeridos por Van Wyk e Scarpa (1999). O nível médio de oxigênio mensurado na fase R3, atendeu o sugerido por Boyd e Clay (2002), tendo-se registrado, nessa fase, valores de oxigênio dissolvido inferiores aos referenciados por esses autores. Apesar disso, durante o período de criação avaliado, não foi registrada mortalidade de animais associadas a esse evento.

De acordo com Ebeling *et al.* (2006), nos sistemas de bioflocos, depois da concentração de oxigênio dissolvido na água, os sólidos em suspensão constituem o segundo fator limitante mais importante para a criação de camarões. O aumento de sólidos dificulta a manutenção da estabilidade química do sistema, acarretando aumento no nível de CO<sub>2</sub> e na demanda bioquímica de oxigênio, além do declínio do pH e da alcalinidade. A oclusão das brânquias dos camarões pelo excesso de partículas é outra consequência da alta concentração de sólidos na

água. Assim, pode até ser necessária a remoção do excesso de sólidos da água dos tanques (Godoy *et al.*, 2010).

TABELA 1. Médias ( $\bar{x}$ ), desvios-padrão, coeficientes de variação (CV) e valores mínimos e máximos dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques, durante a criação de camarões *L. vannamei* em sistema de bioflocos

Parâmetro	Tanque		$\bar{x}$	Valor desejável	Desvio	CV (%)	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	Berçário	R1	29,2	25 - 35	0,91	3,13	27,2	31,9
		R2	29,2		0,59	2,03	28,1	30,6
	Engorda	R3	28,7		0,75	2,61	27,4	30,2
		R4	25,9		1,16	4,48	23,6	27,4
pH	Berçário	R1	7,77	7 - 8,3	0,18	2,36	7,36	8,16
		R2	7,63		0,09	1,18	7,40	7,81
	Engorda	R3	7,59		0,11	1,43	7,37	7,87
		R4	7,64		0,11	1,39	7,35	7,85
Oxigênio Dissolvido OD (mg/L)	Berçário	R1	5,8	> 4	1,41	24,49	4,0	9,8
		R2	5,5		0,95	17,23	4,0	8,4
	Engorda	R3	4,5		0,45	10,05	3,8	6,2
		R4	5,3		0,66	12,47	4,3	6,4
Salinidade (‰)	Berçário	R1	24,7	25	1,13	4,58	19,6	26,0
		R2	26,6		2,35	8,81	24,2	30,7
	Engorda	R3	23,8		0,60	2,51	22,9	24,8
		R4	24,5		0,13	0,54	24,3	24,7
Amônia total N-AT (mg/L)	Berçário	R1	1,4	$\leq 1$	2,25	162,33	0,0	6,0
		R2	0,4		0,54	136,90	0,0	2,0
	Engorda	R3	2,3		1,95	85,00	0,0	5,0
		R4	0,09		0,18	205,86	0,0	0,5
Nitrito N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Berçário	R1	0,0	< 10	0,00	-	0,0	0,0
		R2	0,0		0,00	-	0,0	0,0
	Engorda	R3	1,0		2,24	223,61	0,0	5,0
		R4	0,0		-	-	0,0	0,0
Nitrato N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Berçário	R1	0,0	< 20	0,0	-	0,0	0,0
		R2	0,0		0,0	-	0,0	0,0
	Engorda	R3	0,0		0,0	-	0,0	0,0
		R4	0,0		0,0	-	0,0	0,0
Fosfato P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/L)	Berçário	R1	1,40	0,3 - 3,0	0,85	60,57	0,39	2,5
		R2	1,67		0,53	31,81	0,94	2,50
	Engorda	R3	1,36		1,07	78,74	0,36	2,5
		R4	1,85		-	-	1,85	1,85
Alcalinidade (mg/L)	Berçário	R1	296,4	$\geq 100$	8,20	2,77	278	300
		R2	293,0		11,60	3,96	265	300
	Engorda	R3	279,6		45,62	16,31	198	300
		R4	-		-	-	-	-
Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	Berçário	R1	12,4	$\leq 15$	4,38	35,36	4	21
		R2	10,7		7,00	65,41	2	25
	Engorda	R3	14,0		4,64	33,13	6	27
		R4	21,8		6,42	29,42	9	34

A média dos valores de sólidos sedimentáveis no tanque de engorda na fase R4 (21,8mL/L) foi superior ao limite estabelecido para realizar a clarificação (15mL/L), a estratégia adotada no sistema de produção em questão para a manutenção dos níveis de sólidos sedimentáveis na água dentro do limite preconizado. Essa fase coincidiu com dois eventos: despescas diárias de animais para comercialização e declínio da temperatura ambiente, acarretando redução da temperatura média da água do tanque (25,9°C). No período correspondente a fase R4 foram registradas, na região, as mais baixas temperaturas de todo período avaliado, com mínima de 8°C e máxima de 26°C, de acordo com dados da estação de Sete Lagoas do Instituto Nacional de Metrologia (INMET) (Figura 12). Conseqüentemente, na fase R4 também foram registrados os menores valores de temperaturas da água do tanque para o período avaliado (mínima de 23,6°C e máxima de 27,4°C), uma vez que não havia sistema de aquecimento instalado nos tanques. De acordo com Ponce-Palafox *et al.*, (1997), as melhores taxas de crescimento para *L. vannamei* foram verificadas em águas apresentando valores entre 25°C e 35°C. A taxa metabólica dos crustáceos é diretamente influenciada pela temperatura ambiente, como consequência da inabilidade desses animais em manter a temperatura corpórea e pela dependência térmica das reações enzimáticas, que ocorrem sob estritas variações de temperatura (Randall *et al.*, 2000).

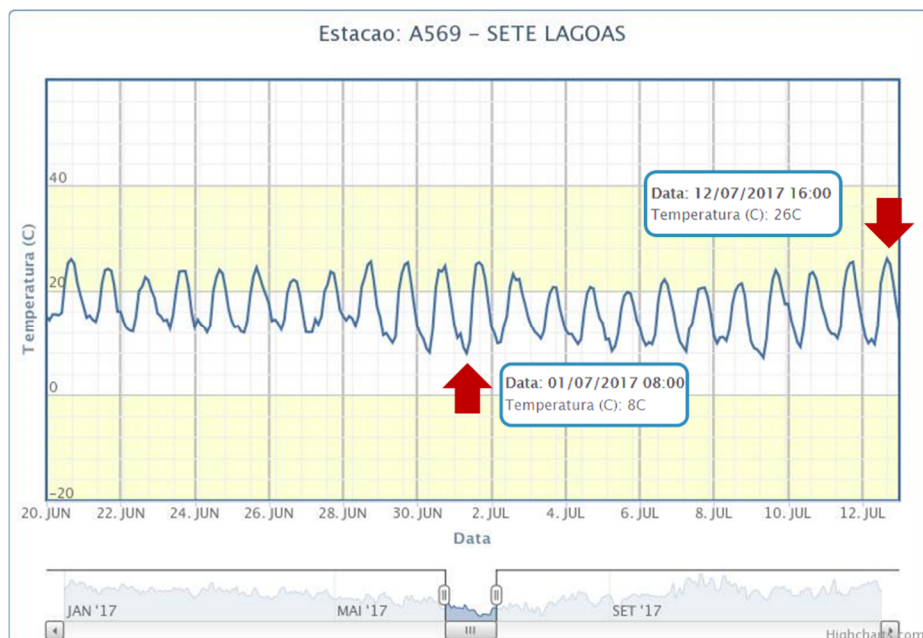


FIGURA 12. Temperaturas mínimas e máximas registrada entre 20 de junho e 13 de julho de 2017 na estação de Sete Lagoas, - MG.

Fonte: INMET, 2017.

A fertilização orgânica, adição de açúcar de cana como fonte de carbono, foi realizada conforme sugerido por Ebeling *et al.*, (2006), adicionando-se 6g de carbono para cada 1g de amônia, ao se verificar uma concentração de amônia total superior a 1,0 mg/L. De acordo com Godoy *et al.* (2010), a formação de bioflocos não é estimulada apenas pela fertilização orgânica, mas por qualquer fonte de matéria orgânica que seja adicionada ao sistema, sendo também essencial controlar a entrada e a qualidade da ração fornecida aos animais. Assim, a redução da densidade de animais no tanque de criação – ocasionada pelas despescas diárias - e as baixas temperaturas da água, que promovem a redução do consumo de alimento, podem ter originado um excesso de matéria orgânica no sistema, resultado do aumento da sobra de ração.

Avnmelech (2009) sugeriu a determinação de sólidos sedimentáveis para monitorar a quantidade de bioflocos nos tanques de criação dos camarões, pela facilidade de realização da análise comparada à determinação de sólidos suspensos totais. No entanto, de acordo com Schryver *et al.* (2008), os resultados dos sólidos sedimentáveis devem ser interpretados com cautela, pois ocorre uma mudança no padrão de decantabilidade dos flocos determinada por fatores como intensidade de aeração, concentração de oxigênio dissolvido, concentração de matéria orgânica, temperatura, pH e composição das espécies bacterianas que formam os flocos. Além disso, Schryver (2012), avaliando o efeito dos sólidos suspensos totais presentes na água do sistema de criação de *L. vannamei*, sugeriu que o aumento dos níveis de sólidos também aumenta o número de bactérias heterotróficas, evitando a variação dos compostos nitrogenados e mantendo a estabilidade do sistema. Considerando que os outros parâmetros avaliados para a verificação da qualidade de água na fase R4 (com exceção da alcalinidade que não foi mensurada nesse período) apresentaram valores apropriados para a criação do camarão *L. vannamei*, as ponderações apontadas por Schryver *et al.* (2008) e Schryver (2012) são pertinentes, necessitando de estudos específicos para estabelecer as relações existentes entre os fatores citados.

Segundo Wasielesky *et al.* (2006), valores de pH da água inferiores a 7 afetam o crescimento do camarão *L. vannamei* do sistema de criação em bioflocos, sendo que valores de pH entre 7 e 8,3 seriam ideais para a criação dessa espécie (Van Wyk e Scarpa, 1999). Em bioflocos, devido à alta taxa de respiração dos animais e da comunidade microbiana, há tendência de o pH manter-se próximo a 7 ou com valores inferiores. Durante o período avaliado, os valores de pH mantiveram-se dentro da faixa recomendada à espécie, mesmo quando os sólidos em suspensão mantiveram-se elevados, ao contrário do relatado por Decamp *et al.* (2003). Em relação à

alcalinidade da água do sistema de criação, Van Wyk e Scarpa (1999) recomendam como ideais valores iguais ou superiores a 100mg/L. Durante o período de criação dos camarões, as médias dos valores da alcalinidade atenderam aos valores recomendados pelos autores citados.

A concentração de amônia apresentou uma grande variação durante o ciclo de produção do camarão no sistema de bioflocos avaliado. Segundo Boyd e Clay (2002), a manutenção da concentração da amônia em valores acima de 5mg/L é prejudicial aos camarões *L. vannamei*. Valores nesse nível prejudicial aos camarões foram registrados nas fases R1 e R3. No entanto as médias da concentração de amônia na água apresentaram valores inferiores. Lin e Chen (2001) determinaram que os níveis de segurança para juvenis de *L. vannamei* em relação à amônia total situam-se entre os valores 3,55 mg/L e 3,95 mg/L. A adição de uma fonte de carbono foi realizada quando a concentração de amônia excedia 1mg/L, como sugerido por Ebeling *et al.*, (2006), para que o nitrogênio amoniacal fosse convertido em biomassa bacteriana. Dessa forma, a adição de açúcar de cana como fonte de carbono foi fundamental no controle da concentração de amônia.

De acordo com Bitton (2005), Ebeling *et al.* (2006) e Oliveira, (2012), a principal via de remoção da amônia do sistema de bioflocos é a sua transformação em biomassa bacteriana. Em sistemas eficientes, com adequada manutenção da relação C:N, as bactérias heterotróficas suplantam as bactérias nitrificantes, responsáveis pela transformação da amônia a nitrito e, em seguida a nitrato, resultando em quantidades insignificativas de compostos nitrogenados na água dos tanques de criação. A avaliação dos resultados das análises dos compostos nitrogenados, apresentados na tabela 1, permite constatar que, com a metodologia utilizada, não se detectou a presença de nitrito e nitrato, exceto na fase R3. Nesse período, também foi registrada a maior média de valores de concentração de amônia e conseqüentemente de nitrito, sugerindo que um desequilíbrio das bactérias heterotróficas com aumento da comunidade bacteriana nitrificante, como relatado por Ebeling *et al.* (2006).

*Litopenaeus vannamei* é uma espécie eurialina, osmorreguladora, capaz de se adaptar a uma ampla faixa de salinidade, habitando águas com salinidades muito próximas de zero às salinidades superiores a 40‰, sendo o ponto isomótico dessa espécie próximo a 25‰ (McGraw *et al.*, 2001). Esses resultados justificam as melhores taxas de crescimento e sobrevivência para *L. vannamei* obtidas quando esses animais foram criados com uma

salinidade de 25‰ (Maicá *et al.*, 2012). As médias de salinidade da água mantiveram-se próximas a esse valor ótimo.

#### 4.2. Composição bromatológica das rações fornecida aos camarões

Os resultados das análises de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB) realizadas nas amostras das rações R1, R2, R3 e R4 fornecidas aos camarões nas fases de berçário e engorda e os níveis de garantia especificados nos rótulos dos produtos (NG), para os mesmos parâmetros, são apresentados na tabela 2.

TABELA 2. Composição nutricional das rações utilizadas nas diferentes fases da criação do camarão *Litopenaeus vannamei*, em sistema de bioflocos, com base nos níveis de garantia (NG) declarados nos rótulos e nos valores determinados nas análises laboratoriais

Parâmetro	R1		R2		R3		R4	
	NG	Análises	NG	Análises	NG	Análises	NG	Análises
MS (%)	≥ 90	92,79	≥ 90	92,83	≥ 90	93,59	≥ 90	91,25
MM (%)	≤ 14	13,09	≤ 14	12,89	≤ 13	13,45	≤ 15	11,77
EE (%)	≥ 7,5	14,01	≥ 7,5	16,32	≥ 7,5	11,94	≥ 9,0	12,03
PB (%)	≥ 40	44,30	≥ 40	42,34	≥ 38	38,28	≥ 35	42,41

A comparação dos resultados das análises das amostras de ração com os respectivos níveis de garantia declarados nos rótulos permite constatar que apenas o resultado da matéria mineral da ração R3 estava em desacordo com o declarado. Nesse caso, o resultado obtido na análise excedeu em somente 3,46% o valor declarado. Adotando-se uma tolerância de 10%, pode-se considerar que todas as rações estavam em conformidade com os níveis de garantia declarados nos rótulos.

Para os camarões peneídeos, a exigência proteica dietética sofre variações em função da espécie de camarão, mas também de acordo com a fase de desenvolvimento na qual o animal se encontra (Shiau, 1998). De acordo com Chen *et al.* (1985), para atender às necessidades associadas à construção e a reparação do tecido muscular, os camarões na fase de pós-larva possuem uma exigência em proteína dietética mais elevada, comparada às fases posteriores. Em anuência com esses autores, Samocha *et al.* (1993) e Velasco *et al.* (2000) sugeriram níveis de proteína bruta variando entre 40% a 55% para atender à exigência proteica de pós-larva do camarão *L.*

*vannamei*. Para essa mesma espécie, Kureshy e Davis (2002) sugeriram uma exigência de proteína bruta máxima de 32% para camarões nas fases juvenil e sub-adulto.

Analisando as informações declaradas nos rótulos das rações e os resultados obtidos na análise para os níveis de proteína bruta (tabela 2), pode-se supor que as rações comerciais fornecidas aos camarões, de acordo com às diferentes fases de desenvolvimento, foram formuladas consoante ao preconizado nas informações apresentadas na literatura citada, exceto pelo resultado obtido para a ração R4. O teor de proteína bruta na ração R4 excedeu em 21,17% o valor mínimo declarado no rótulo.

Sendo a exigência nutricional dos camarões na fase final de criação (CR4) menor, havendo um maior nível proteico (superior à exigência) na ração fornecida (R4) e, ainda, considerando que os camarões assimilam entre 20% a 30% das proteínas disponíveis nos alimentos (Avnimelech, 2003), ocorre uma grande liberação de compostos nitrogenados na água, provenientes principalmente da excreção dos animais e da decomposição da ração não consumida e não assimilada (Avnimelech, 1999; Queiroz e Boeira, 2007). Um maior aporte de compostos nitrogenados aumenta a necessidade de adição de açúcar – fonte de carbono – para neutralizar a amônia gerada (Avnimelech, 1999). No sistema de bioflocos, a manipulação da relação carbono:nitrogênio favorece a formação de agregados microbianos predominantemente heterotróficos que transformam compostos nitrogenados potencialmente tóxicos em biomassa microbiana (Avnimelech, 1999; Ebeling *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013), que podem ser consumidos pelos camarões, constituindo um recurso alimentar complementar para esses animais (Cuzon *et al.*, 2004; Wasielesky *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2007; Crab *et al.*, 2010; Krummenauer *et al.*, 2012; Hargreaves, 2013).

Considerando que, na fase de criação em que os animais estavam recebendo a ração R4, a média dos sólidos sedimentáveis manteve-se em níveis superiores aos desejáveis e os demais parâmetros de avaliação da qualidade da água permaneceram dentro da faixa considerada ideal, acredita-se que, coadunando com as observações de Schryver (2012), houve uma grande formação de flocos microbianos, predominantemente heterotróficos, que não foram consumidos pelos camarões, pelos motivos já descritos. Mesmo não havendo comprometimento da qualidade da água do tanque de criação dos camarões, na fase em que os animais receberam a ração R4 houve um aumento no manejo decorrente da maior demanda por clarificação da água, para manter os sólidos sedimentáveis dentro da faixa de valores esperada.

Uma importante vantagem relacionada à produção de camarões em sistema de bioflocos é a possibilidade de utilização de menores teores de proteína bruta na dieta fornecida aos animais criados nesse sistema, sem comprometimento do desempenho produtivo (Hopkins *et al.*, 1995; Tacon *et al.*, 2002; Avnimelech, 2003; Wasielesk *et al.*, 2006; Azim *et al.*, 2008). Correia *et al.* (2014), ao compararem a redução dos níveis de proteína nas rações do camarão *L. vannamei* produzidos em sistema de bioflocos, verificaram que a qualidade da água do sistema de criação foi melhor ( $p < 0,05$ ) nos tanques onde os animais receberam a dieta com 30% de proteína do que nos tanques onde foi fornecida a dieta com 40% de proteína, sem comprometimento da taxa de crescimento dos animais. Então, torna-se necessário estudar um melhor manejo para a criação de camarões em sistema de bioflocos, considerando que, a proteína é o ingrediente mais caro da dieta (Emerenciano *et al.*, 2012; Jatobá *et al.*, 2014) e que não existem formulações comerciais disponíveis específicas para camarões criados nesse sistema, com níveis reduzidos de proteínas.

### **4.3. Enumeração de bactérias nas amostras de água**

Os resultados da contagem bacteriana nas amostras de água do poço, água do transporte das pós-larvas de camarão *L. vannamei* e da água dos tanques de criação dos camarões, em sistema de bioflocos, nas diferentes fases de criação, são apresentados na tabela 3.

Em cada uma das fases de criação em que foi realizada a coleta dos animais, optou-se pela coleta de uma única amostra simples da água dos tanques, processada em um ponto aleatório do tanque, considerando que a aeração que o sistema de bioflocos demanda proporciona uma adequada circulação da água e manutenção dos flocos em suspensão. Ademais, as análises realizadas nas amostras de água tiveram como propósito a obtenção de informações sobre a composição bacteriana, tanto do ambiente aquático no qual os animais estavam inseridos no momento da coleta e quanto da água utilizada para abastecer o sistema. Por isso, não foi possível realizar inferências estatísticas em relação aos resultados das contagens bacterianas obtidas.

Os maiores valores numéricos para as contagens bacterianas nas amostras de água foram observados na amostra referente à água de transporte das pós-larvas, da larvicultura – no Rio Grande do Norte, até a unidade de produção em Sete Lagoas. Em qualquer sistema aquático, os parâmetros ambientais como a temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido têm grande influência na distribuição das bactérias (Heenatigala e Fernando, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Tabela 3. Resultados da enumeração de bactérias presentes nas amostras de água do poço, água do transporte das PL de camarões *Litopenaeus vannamei* e dos tanques em sistema de bioflocos, nas diferentes fases de criação

Parâmetro microbiológico	Água do poço ( $\bar{x}$ )	Água transporte PL <sub>10</sub>	Tq1	Tq2	Tq3	Tq4
Bactérias heterotróficas totais (UFC/mL) – Ágar marinho	$3,8 \times 10^1$	$9,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$
Bactérias heterotróficas totais (UFC/mL) – TSA	$2,2 \times 10^2$	$3,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$	$5,6 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	$7,3 \times 10^3$
<i>Vibrio</i> spp. (UFC/mL)	<1	$1,1 \times 10^6$	$6,6 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$
Enterobactérias (UFC/mL)	$1,8 \times 10^1$	$1,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$
Bactérias ácido-láticas (UFC/mL)	$1,2 \times 10^1$	$1,7 \times 10^4$	$<1 \times 10^3$	<10	<10	<10

Porém em sistemas de criação intensivos fechados, esses parâmetros ambientais podem ser bem controlados durante todo o período de criação, pela troca de água do sistema. Mesmo quando os fatores ambientais são controlados, a carga bacteriana pode sofrer influência da quantidade de matéria orgânica depositada (Sharmila *et al.*, 1996). Durante o período de transporte, as pós-larvas foram mantidas em sacos plásticos fechados, sem controle dos parâmetros ambientais e sem renovação de água para remoção da matéria orgânica depositada, favorecendo o aumento da população bacteriana presente na água, como pode ser verificado.

Como os camarões foram criados em sistema de bioflocos, que se baseia na fertilização orgânica adicionando-se uma de fonte de carbono para estimular o desenvolvimento de uma microbiota heterotrófica, sem renovação de água (Avnimelech, 2003), obter contagens bacterianas nos tanques de criação numericamente superiores às verificadas na água do poço eram esperadas, principalmente em relação às contagens de *Vibrio* spp. Esse gênero de bactérias abrange um grupo diversificado de espécies marinhas heterotróficas, que é comumente encontrado em águas com salinidade variando entre 5‰ a 25‰ (Kelly, 1982; Motes *et al.*, 1998, Kaspar e Tamplin, 1993; Parvathi *et al.*, 2004; Heenatigala e Fernando, 2016). Ressalta-se que a água dos tanques em que os camarões foram criados sofreu a adição de uma mistura de sais – mimetizando a composição da água do mar, com a finalidade de se alcançar uma salinidade de 25‰, em que, de acordo com Maicá *et al.* (2012), melhores taxas de crescimento e sobrevivência foram registradas durante a criação de juvenis de *L. vannamei*.

De acordo com Allen *et al.* (2004), os métodos que são utilizados para enumerar as bactérias heterotróficas conseguem quantificar somente uma fração ou subpopulação das bactérias heterotróficas presentes na amostra avaliada, por isso, mesmo sendo utilizados meios de cultura classificados como não seletivos, a composição do meio utilizado, associada à temperatura e ao tempo de incubação podem determinar resultados diferentes em relação ao número total de bactérias e as espécies isoladas para uma mesma amostra. Ao analisar os resultados apresentados na tabela 3 pode-se constatar que a enumeração de bactérias heterotróficas totais utilizando o meio de cultura TSA proporcionou valores superiores aos obtidos com a utilização do ágar marinho apenas para as amostras de água do poço. O ágar marinho possui uma concentração de NaCl maior (19,45 g/L) que a concentração de NaCl presente no ágar TSA (5,0 g/L), possivelmente, proporcionando a seleção de bactérias mais adaptadas a elevadas salinidades e, conseqüentemente, contagens bacterianas maiores em amostras provenientes dos tanques de criação dos camarões.

Os resultados das contagens bacterianas nas amostras da água do tanque de criação dos camarões demonstram uma tendência de estabilidade dessa população entre as diferentes fases de criação avaliadas, para todos os tipos bacterianos pesquisados: bactérias heterotróficas totais, *Vibrio*, enterobactérias e bactérias ácido-láticas. Isso pode refletir a pouca variação dos parâmetros físico-químicos associados à qualidade da água do sistema de criação. Segundo Azam e Malfatti (2007), um sistema de criação é um ambiente mais controlado que um ambiente marinho, susceptível a variações naturais de numerosos fatores que, devido à heterogeneidade das fontes de material orgânico, podem determinar drásticas mudanças na comunidade bacteriana em um intervalo de poucos minutos.

Sung *et al.* (2001) avaliaram a água de lagoas de criação de *P. monodon* e registraram contagens de bactérias aeróbias totais entre  $2 \times 10^3$  UFC/mL e  $7 \times 10^5$  UFC/mL. Shakibazadeh *et al.* (2012) avaliaram a água do tanque de criação de *P. monodon* e relataram contagens de bactérias viáveis totais médias de  $2,9 \times 10^4$  UFC/mL. Avaliando a água de lagoas de criação de *L. vannamei*, Yanbo *et al.* (2005) obtiveram contagens de bactérias heterotróficas totais mais elevadas, variando entre  $1,1 \times 10^6$  UFC/mL a  $6,25 \times 10^6$  UFC/mL. As comparações entre as contagens bacterianas da água de diferentes sistemas de criação de camarão devem ser realizadas com cautela, pois a presença de matéria orgânica, geralmente em maior quantidade nas lagoas do que nos tanques de criação, estabelece condições ambientais ideais para a multiplicação microbiana, além de outros fatores ambientais que podem determinar diferenças nas populações microbianas.

Burford *et al.* (2003) e Burford *et al.* (2004b) determinaram, utilizando microscopia de epifluorescência, a contagem bacteriana total em amostras de água de tanque de criação de camarão *L. vannamei* em sistema de bioflocos, mesmo sistema adotado neste estudo, encontrando valores variando de 3,35 células/mL a  $5,42 \times 10^7$  células/mL e 3,64 células/mL a  $5,06 \times 10^7$  células/mL, respectivamente. Entretanto, a estimativa do número de bactérias realizada pelos pesquisadores é distinta da utilizada nesse estudo, considerando células bacterianas viáveis e não viáveis na contagem, indicando uma densidade de bactérias de duas a três ordens de magnitude superior a estimada neste estudo.

Ao contrário do que foi reportado por Shakibazadeh *et al.* (2009), no presente estudo foram isoladas enterobactérias, utilizando o meio de cultura MacConkey, em todas as amostras provenientes da água do tanque de criação dos camarões. O meio de cultura MacConkey não é

comumente utilizado nos estudos relacionadas à comunidade bacteriana da água dos sistemas de criação de camarões e do trato gastrointestinal desses animais, pois, de acordo com Shakibazadeh *et al.* (2009), a presença de enterobactérias associa-se à contaminação, principalmente da fonte de água utilizada para abastecer o sistema de criação.

Não foi relatada, na literatura consultada, a enumeração de bactérias ácido-láticas na água proveniente do sistema de criação dos camarões. Bactérias desse grupo foram isoladas nas amostras de água dos tanques, em contagens muito baixas. Ressalta-se que o produto comercial contendo probióticos adicionado à água dos tanques e a ração fornecida aos camarões especificavam em seus rótulos a presença de bactérias ácido-láticas.

A média das contagens de *Vibrio* relatada por Shakibazadeh *et al.* (2012) nas amostras de água do sistema de criação de *P. monodon* foi de  $1,21 \times 10^5$  UFC/mL. Mendes *et al.* (2009) relataram contagens de *Vibrio* na água do sistema de criação de camarões inferiores às observadas por Shakibazadeh *et al.* (2012) e aos valores registrados durante este estudo, variando entre  $0,1 \times 10^1$  a  $6,2 \times 10^3$  UFC/mL. As amostras de água avaliadas por Mendes *et al.* (2009) foram provenientes de fazendas situadas no litoral, onde os camarões foram criados em viveiros com alta taxa de renovação de água, diferente do sistema de criação de camarões em bioflocos, em que não há renovação de água e do sistema pesquisado por Shakibazadeh *et al.* (2012).

Ganesh *et al.* (2010) associaram a ocorrência de surtos de infecções virais ao aumento da carga bacteriana na água de criação dos camarões, especialmente ao aumento das espécies de vibrios, sugerindo uma maior susceptibilidade dos camarões às doenças virais quando ocorre aumento de membros desse gênero bacteriano na água do sistema de criação. Por isso, esses autores preconizaram que a contagem de espécies de vibrios consideradas patogênicas deva ser inferior a  $10^3$  UFC/mL. Em todas as fases avaliadas neste trabalho, as amostras de água proveniente do sistema de bioflocos no qual estavam sendo criados camarões *L. vannamei*, a contagem de *Vibrio* excedeu o valor recomendado por Ganesh *et al.* (2010), sem que surto de doença fosse identificado.

As espécies de *Vibrio* associam-se ao ambiente e organismos marinhos, principalmente crustáceos, desempenhando um importante papel na ciclagem da quitina, ao transformar esse polissacarídeo altamente insolúvel em uma forma biologicamente utilizável, fonte de carbono e nitrogênio (Bassler *et al.*, 1991). Por isso, frequentemente os vibrios constituem o

principal grupo de bactérias heterotróficas cultiváveis presentes nas águas costeiras (Urakawa e Rivera, 2006), sobretudo nos ambientes ricos em quitina, provenientes de plâncton, crustáceos, insetos ou fungos (Gildemeister *et al.*, 1994). É importante enfatizar também que as doenças infecciosas que acometem os camarões são resultado da interação entre micro-organismos patogênicos, animais e ambiente aquícola, sendo que o tipo e a quantidade dos micro-organismos patogênicos presentes no ambiente são importantes para a ocorrência da doença (Engering *et al.*, 2013).

As condições ambientais estão relacionadas às alterações verificadas na microbiota da água do sistema de criação dos camarões (Johnson *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Sob esse ponto de vista, conhecer a comunidade microbiana do ambiente aquícola e como as variáveis ambientais a influenciam, podem auxiliar no controle das doenças (Schöttner *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Entretanto, a qualidade da água do sistema de criação dos camarões não influencia somente a microbiota aquícola, mas também as condições fisiológicas e a resistência dos animais às doenças (Zhang *et al.*, 2016).

De acordo com Sullam *et al.* (2012), as bactérias intestinais dos animais aquáticos são originárias principalmente do ambiente que os circunda, ou seja, do *habitat* aquático. Entretanto, as análises das amostras de água provenientes do sistema de criação de camarões revelaram menor número de bactérias que o ambiente gastrintestinal dos camarões, sugerindo que o ambiente intestinal impõe pressão seletiva para o estabelecimento da comunidade microbiana (Johnson *et al.*, 2008; Chaiyapechara *et al.*, 2012; Rungrassamee *et al.*, 2014).

#### **4.4. Microbiota do trato gastrintestinal de camarões em diferentes fases de criação**

A tabela 4 apresenta os resultados das contagens bacterianas do trato gastrintestinal dos camarões *L. vannamei* nas diferentes fases de criação avaliadas.

Tabela 4. Médias ( $\bar{x}$ ), coeficientes de variação (CV) e intervalos de variação dos resultados da enumeração de bactérias heterotróficas totais de *Vibrio* spp. presentes no trato gastrointestinal de camarões *Litopenaeus vannamei* criados em sistema de bioflocos, em diferentes fases de criação

Enumeração bacteriana	Fase de criação														
	PL <sub>10</sub>			CR1			CR2			CR3			CR4		
	$\bar{x}$	CV (%)	Intervalo de variação	$\bar{x}$	CV (%)	Intervalo de variação	$\bar{x}$	CV (%)	Intervalo de variação	$\bar{x}$	CV (%)	Intervalo de variação	$\bar{x}$	CV (%)	Intervalo de variação
Bactérias heterotróficas totais (UFC/g) – Ágar marinho	1,3x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	87,67	Min. 3,4x10 <sup>7</sup>	1,7x10 <sup>6</sup> <b>b</b>	50,41	Min. 1,0x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>7</sup> <b>ab</b>	45,43	Min. 9,0x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	84,68	Min. 1,2x10 <sup>7</sup>	3,2x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	98,20	Min. 3,0x10 <sup>7</sup>
			Máx. 2,5x10 <sup>8</sup>			Máx. 2,7x10 <sup>6</sup>			Máx. 2,5x10 <sup>7</sup>			Máx. 2,6x10 <sup>8</sup>			Máx. 6,5x10 <sup>8</sup>
Bactérias heterotróficas totais (UFC/g) – TSA	4,5x10 <sup>7</sup> <b>a</b>	25,63	Min. 3,2x10 <sup>7</sup>	3,4x10 <sup>6</sup> <b>b</b>	137,83	Min. 4,0x10 <sup>5</sup>	5,7x10 <sup>6</sup> <b>ab</b>	70,68	Min. 2,1x10 <sup>6</sup>	4,5x10 <sup>7</sup> <b>a</b>	76,79	Min. 5,8x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	96,50	Min. 1,4x10 <sup>7</sup>
			Máx. 5,4x10 <sup>7</sup>			Máx. 8,8x10 <sup>6</sup>			Máx. 1,0x10 <sup>7</sup>			Máx. 7,1x10 <sup>7</sup>			Máx. 2,6x10 <sup>8</sup>
<i>Vibrio</i> spp. (UFC/g)	3,6x10 <sup>6</sup> <b>bc</b>	4,11	Min. 3,5x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>6</sup> <b>c</b>	33,51	Min. 9,5x10 <sup>5</sup>	4,7x10 <sup>4</sup> <b>d</b>	52,62	Min. 3,0x10 <sup>4</sup>	3,3x10 <sup>7</sup> <b>ab</b>	78,67	Min. 4,4x10 <sup>6</sup>	8,3x10 <sup>7</sup> <b>a</b>	121,59	Min. 1,1x10 <sup>7</sup>
			Máx. 3,8x10 <sup>6</sup>			Máx. 1,8x10 <sup>6</sup>			Máx. 7,6x10 <sup>4</sup>			Máx. 5,5x10 <sup>7</sup>			Máx. 1,8x10 <sup>8</sup>

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

O tamanho da população bacteriana do trato gastrointestinal do camarão *L. vannamei*, mensurado pela contagem de bactérias heterotróficas totais, apresentou comportamento similar nos meios de cultura TSA e ágar marinho, ao se avaliar as diferentes fases de criação. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as contagens de bactérias heterotróficas totais nas fases PL<sub>10</sub>, CR2, CR3 e CR4. As elevadas contagens bacterianas verificadas na fase PL<sub>10</sub> possivelmente não refletem apenas as alterações fisiológicas relacionadas à fase de desenvolvimento dos animais (Harris, 1993). Nessa fase, os animais estavam sob condições estressantes resultantes das circunstâncias do transporte a que foram submetidos, privados de alimentação e inseridos em um ambiente passível de alterações físico-químicas, diferentes das condições ideais para a espécie, ocasionadas pela não renovação de água. Essas alterações no meio ambiente demandam dos animais um maior gasto energético para se adaptarem às novas condições, podendo comprometer o sistema imunológico e favorecer a proliferação de bactérias oportunistas, como são os vibrios (Urakawa e Rivera, 2006), o que explicaria a maior contagem desse grupo bacteriano na fase PL<sub>10</sub>.

Na fase CR1 verificou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do número de bactérias heterotróficas totais em relação a fase PL<sub>10</sub>. Por ocasião da coleta das amostras dos animais para análises na fase CR1, as condições estressantes a que os camarões foram submetidos durante o transporte (PL<sub>10</sub>) não perduravam. Os animais estavam alojados no tanque berçário - onde a água do sistema apresentava parâmetros físico-químicos adequados à espécie, e recebendo ração. Considerando-se ainda que houve tempo suficiente para recuperação dos animais do estresse sofrido por ocasião do transporte e para à adaptação ao sistema de criação e à alimentação fornecida, pressupõe-se que as contagens de bactérias obtidas na fase CR1 podem representar uma comunidade bacteriana gastrointestinal mais adaptada às condições intestinais desta fase de desenvolvimento do animal, associadas às condições fisiológicas do animal. É interessante ressaltar que a metodologia utilizada para avaliar a microbiota dos camarões nas fases PL<sub>10</sub> e CR1 foi a mesma: os animais, devido ao pequeno tamanho, foram macerados após descontaminação da superfície externa, assumindo que a microbiota predominante nas amostras, fosse proveniente do trato gastrointestinal. Assim, não se pode associar a diferença dos resultados à metodologia de análise, neste caso.

Na fase CR2, os animais foram dissecados e somente o trato gastrointestinal foi amostrado para análise, diferentemente do que foi realizado nas amostras das fases PL<sub>10</sub> e CR1. Apesar de a metodologia de obtenção do material para a análise ter sido distinta, não houve diferença

significativa ( $p > 0,05$ ) entre as fases CR1 e CR2, considerando as contagens de bactérias heterotróficas totais. Os resultados obtidos nas amostras coletadas nas fases CR2, CR3 e CR4 não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), mas as contagens de bactérias totais referentes às fases CR3 e CR4 foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que a médias obtidas em CR1, sugerindo uma tendência de aumento da comunidade bacteriana ao longo do período de criação, em que, talvez, a fase CR2 represente um período de transição.

Provavelmente, o número de bactérias totais encontrado no trato gastrointestinal dos camarões foi subestimado. As técnicas dependentes de cultivo utilizam meios de culturas e condições laboratoriais que possibilitam o desenvolvimento de uma pequena porcentagem do total da comunidade bacteriana que habita o trato gastrointestinal dos animais (Harris, 1993; Amann *et al.*, 1995). Apesar das limitações inerentes à metodologia de enumeração bacteriana em placas, a determinação da densidade populacional de bactérias no trato gastrointestinal de camarões, em diferentes fases de criação, pode ser justificada para fins comparativos e fornecer informações valiosas neste estudo. As pesquisas que envolvem metodologias independentes de cultivo para a avaliação da comunidade bacteriana do trato gastrointestinal de camarões em diferentes idades (Rungrassamee *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2017) descrevem a composição e a diversidade dessa microbiota, não apresentando valores de concentração da população total.

A literatura científica envolvendo a enumeração de bactérias totais no trato gastrointestinal dos camarões peneídeos é escassa, descrevendo apenas uma fase de criação ou idade do animal. Moss *et al.* (2000) avaliaram a microbiota gastrointestinal dos camarões juvenis de *L. vannamei* pela contagem de bactérias totais em amostras de fezes. Esses autores obtiveram valores variando entre  $2,5 \times 10^9$  UFC/g e  $1,9 \times 10^{10}$  UFC/g. Beardsley *et al.* (2011), utilizando microscopia de epifluorescência, relataram valores para contagem bacteriana total em fezes dos camarões juvenis de *L. vannamei*, recém produzidas, entre  $0,6 \times 10^{10}$  a  $6,6 \times 10^{10}$  células bacterianas/g (em peso seco). Shakibazadeh *et al.* (2012), trabalhando com sistema de água clara e pesquisando a microbiota do trato gastrointestinal dos camarões juvenis de *L. vannamei*, registraram valores médios de  $1,1 \times 10^6$  UFC/g para a contagem de bactérias totais em amostras de trato gastrointestinal. As diferenças observadas em relação as contagens bacterianas no trato gastrointestinal dos camarões neste trabalho e os resultados relatados pelos autores supra mencionados, podem ser atribuídas, entre outros fatores, ao sistema de criação.

De acordo com Moss *et al.* (2000), a qualidade da água pode interferir na contagem bacteriana do intestino dos camarões juvenis de *L. vannamei*. Esses autores observaram uma menor contagem e uma maior diversidade de bactérias aeróbias Gram negativo em intestinos de animais criados em ambiente eutrófico (heterotrófico), quando comparado aos intestinos dos animais criados em ambiente oligotrófico (ambiente com baixo enriquecimento de nutriente e elevado teor de oxigênio dissolvido – água clara). Moss *et al.* (2000) atribuíram as diferenças verificadas na microbiota gastrintestinal dos camarões criados em ambientes distintos ao tempo de passagem. A quantidade de bactérias presentes no ambiente eutrófico é maior, assim, os camarões criados nesse meio têm constante acesso ao alimento, mesmo não sendo fornecida ração, devido aos agregados microbianos, o que proporciona uma frequente ingestão de bactérias (alimento), diminuindo o tempo de passagem, de maneira que as bactérias intestinais sejam eliminadas com as fezes antes de serem capazes de se dividir. No ambiente oligotrófico, o tempo de passagem é extremamente longo e o ambiente intestinal é mais estável para a proliferação de micro-organismos. Isso pode ter implicações importantes em relação à saúde dos camarões, pois a transmissão de patógenos gastrintestinais, como *Vibrio*, ocorre principalmente por via oral. Segundo os autores, é possível que o maior tempo de trânsito intestinal predisponha o camarão às infecções bacterianas.

Consistente com outros estudos (Gomez-Gil *et al.*, 1998; Oxley *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2009), os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a água do tanque de criação apresenta uma menor densidade populacional de *Vibrio* do que o ambiente intestinal dos camarões. Os valores das contagens de *Vibrio* nas amostras de água obtidas dos tanques foram da ordem de grandeza de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL, enquanto as contagens desse grupo de bactérias no trato gastrintestinal dos animais criados nesses mesmos tanques variaram entre  $10^4$  a  $10^7$  UFC/g. De acordo com Urakawa e Rivera (2006), as espécies de *Vibrio* são potencialmente importantes no ambiente aquático, pois como bactérias heterotróficas quitinolíticas, possibilitam a reestruturação dos níveis de carbono pela degradação da quitina presente nos resíduos do exoesqueleto dos crustáceos liberados na coluna d'água e, conseqüentemente, atuam na decomposição e mineralização do nitrogênio orgânico presente na água do sistema de criação dos camarões. No trato gastrintestinal dos camarões, a disponibilidade de matéria orgânica para os vibrios é maior, além de se aderirem às superfícies intestinais revestidas por quitina por meio de proteínas de ligação (Montgomery e Kirchman, 1993; Gildemeister *et al.*, 1994; Montgomery e Kirchman, 1994).

Em relação à contagem de *Vibrio*, a fase de criação dos camarões CR2 apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que as demais fases, ocorrendo um aumento da população nas fases subsequentes (CR3 e CR4). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as contagens de *Vibrio* nas amostras de camarões das fases PL<sub>10</sub>, CR1 e CR3. As elevadas contagens de *Vibrio* na fase PL<sub>10</sub> podem, como explicado anteriormente, estar associadas ao estresse a que os animais foram submetidos durante o transporte, refletindo também na fase subsequente, CR1. Isso, possivelmente explicaria a redução significativa ( $p < 0,05$ ) da contagem *Vibrio* da fase CR1 para a CR2, com aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na fase posterior, CR3.

Os resultados referentes às contagens de enterobactérias e bactérias ácido-láticas presentes no trato gastrintestinal dos camarões *L. vannamei* nas diferentes fases de criação são apresentados na tabela 5. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre as amostras das fases PL<sub>10</sub> e CR3, para as contagens de enterobactérias, com maiores valores sendo verificados nas amostras de camarões advindos do transporte, PL<sub>10</sub>. Provavelmente, os fatores estressantes e o comprometimento do ambiente no qual estavam inseridos, como já relatado, possam justificar as diferenças observadas.

As enterobactérias e as bactérias ácido-láticas não são comumente quantificadas nas pesquisas envolvendo a microbiota do trato gastrintestinal de camarões, possivelmente porque estão presentes em concentrações muito baixas. Shakibazadeh *et al.* (2009) e Shakibazadeh *et al.* (2012) relataram não terem isolado enterobactérias utilizando o meio de cultura MacConkey, mesmo meio utilizado neste experimento para o isolamento de enterobactérias.

Em relação às bactérias ácido-láticas, as pesquisas são mais direcionadas ao isolamento dessas bactérias do trato gastrintestinal de camarões, para posterior avaliação do seu potencial probiótico (Kongnum e Hongpattarakere, 2012; Maeda *et al.*, 2014). Os relatos de quantificação das bactérias ácido-láticas no trato gastrintestinal dos camarões foram, na maioria das vezes, associados à verificação do efeito probiótico da administração dessas bactérias aos animais (Vieira *et al.*, 2010; Nafiqoh *et al.*, 2011; Buglione-Neto *et al.*, 2013). Kongnum e Hongpattarakere (2012) isolaram e quantificaram bactérias ácido-láticas de camarões das espécies *Matapenaeus brevicornis* e *Peneaus merguensis* capturados na natureza e *L. vannamei* proveniente de sistema de criação, obtendo contagens variando entre  $1,5 \times 10^3$  UFC/g a  $1,3 \times 10^4$  UFC/g. Esses valores são superiores aos obtidos neste trabalho, no entanto, Kongnum e Hongpattarakere (2012) destacaram que a maioria dos micro-organismos isolados foram

obtidos de camarões adultos capturados na natureza. Neste estudo, foram avaliados camarões da espécie *L. vannamei*, criados em cativeiro, nas fases de pós-larva e juvenil, não atingindo o estágio adulto. Albinati (2012), também trabalhando com camarões adultos capturados na natureza, da espécie *Penaeus schimitti*, relatou uma população de bactérias ácido-láticas ( $1,6 \times 10^5$  UFC/mL) presente em maior concentração do que a população de vibrios ( $1,5 \times 10^4$  UFC/mL). Para a obtenção desses resultados, foram utilizados tratos gastrintestinais de dez animais em 9mL de salina para perfazer a diluição  $10^{-1}$ , a fim de que os resultados fossem expressos UFC/mL. A população de bactérias ácido-láticas superior a população de vibrios, no trato gastrintestinal de camarões diverge das observações relatadas neste trabalho e de outros pesquisadores (Mendes *et al.*, 2009; Vieira, 2010; Kongnum e Hongpattarakere, 2012).

Tabela 5. Mediana, médias ( $\bar{x}$ ), coeficientes de variação (CV) e valores mínimos e máximos dos resultados da enumeração de enterobactérias e bactérias ácido-láticas presentes no trato gastrintestinal de camarões *Litopenaeus vannamei* criados em sistema de bioflocos, em diferentes fases de criação

Fase de criação	Enumeração	Mediana	$\bar{x}$	CV (%)	Mínimo	Máximo
PL <sub>10</sub>	Enterobactérias (UFC/g)	$1,4 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1,6 \times 10^6$	62,38	$7,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	$4,0 \times 10^2$	$3,7 \times 10^2$	15,75	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
CR1	Enterobactérias (UFC/g)	$<1 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$	0	$<1 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	0	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$
CR2	Enterobactérias (UFC/g)	$<1 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$	0	$<1 \times 10^3$	$<1 \times 10^3$
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$	0	$<1 \times 10^2$	$<1 \times 10^2$
CR3	Enterobactérias (UFC/g)	$<1,0 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$2,2 \times 10^2$	95,32	$<1 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	$4,0 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	58,36	$3,7 \times 10^2$	$9,7 \times 10^2$
CR4	Enterobactérias (UFC/g)	$5,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$	149,75	$7,0 \times 10^2$	$6,1 \times 10^4$
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	$6,7 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$	147,51	$6,7 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$

Medianas seguidas por letras distintas nas linhas diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Microbiota nas diferentes porções do trato gastrintestinal dos camarões

Os resultados das análises dos segmentos anterior, correspondendo ao intestino anterior e o hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior dos animais coletados nas fases CR3 e CR4 são apresentados na tabela 6.

A contagem das bactérias heterotróficas totais, tanto utilizando o ágar TSA quanto o ágar marinho (AM), e a contagem de *Vibrio* spp. na porção anterior do trato gastrintestinal dos camarões nas fases CR3 e CR4 foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que as contagens para essas bactérias verificadas no intestino médio. Entretanto, não diferiram das contagens bacterianas referentes ao intestino posterior, exceto para bactérias heterotróficas totais em CR3 utilizado ágar marinho. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as contagens bacterianas dos intestinos médio e posterior, para todos os grupos de bactérias avaliadas. Esses resultados indicam que, quantitativamente, a população bacteriana no intestino do camarão não é uniformemente distribuída, sendo que a porção anterior alberga uma menor quantidade de bactérias que o intestino médio.

Esses resultados corroboram com os descritos por Oxley *et al.* (2002) e Johnson *et al.* (2008), que verificaram que as regiões anteriores do trato gastrintestinal dos camarões (o intestino anterior e o hepatopâncreas) possuem menores densidades bacterianas, sendo o maior número de bactérias verificado na região posterior, correspondendo ao intestino médio e intestino posterior.

Gomez-Gil *et al.* (1998), pesquisando *Vibrio* em diferentes porções do trato gastrintestinal dos camarões juvenis de *L. vannamei*, constataram que o hepatopâncreas apresentou menores contagens de *Vibrio* ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao estômago e ao intestino (porções média e posterior), sendo que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o estômago e o intestino. Associando os resultados descritos por Gomez-Gil *et al.* (1998) aos obtidos neste trabalho, pode-se depreender que ao reunir o hepatopâncreas ao estômago para compor o seguimento anterior, analisado neste estudo, tenha-se artificialmente promovido um aumento da carga bacteriana que poderia ser associada ao hepatopâncreas, dessa forma seria interessante realizar a análise desse órgão separadamente.

Tabela 6. Médias ( $\bar{x}$ ), coeficientes de variação (CV) e valores mínimos e máximos dos resultados da enumeração de bactérias presentes nas diferentes porções avaliadas do trato gastrointestinal de camarões *Litopenaeus vannamei* criados em sistema de bioflocos, em diferentes fases de criação

Fase	Enumeração	Porção Anterior				Intestino Médio				Intestino Posterior			
		$\bar{x}$	CV (%)	Mínimo	Máximo	$\bar{x}$	CV (%)	Mínimo	Máximo	$\bar{x}$	CV (%)	Mínimo	Máximo
CR3	BHT AM (UFC/g)	1,1x10 <sup>7</sup> <b>b</b>	54,52	4,8x10 <sup>6</sup>	1,7x10 <sup>7</sup>	2,6x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	51,08	1,1x10 <sup>8</sup>	3,5x10 <sup>8</sup>	1,7x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	12,09	1,5x10 <sup>8</sup>	1,95x10 <sup>8</sup>
	BHT TSA (UFC/g)	5,8x10 <sup>6</sup> <b>Bb</b>	145,76	6,6x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	7,1x10 <sup>7</sup> <b>a</b>	94,87	1,4x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>	5,7x10 <sup>7</sup> <b>ab</b>	85,61	2,5x10 <sup>6</sup>	9,7x10 <sup>7</sup>
	<i>Vibrio</i> spp. (UFC/g)	4,4x10 <sup>6</sup> <b>b</b>	69,67	8,7x10 <sup>5</sup>	6,4x10 <sup>6</sup>	5,5x10 <sup>7</sup> <b>a</b>	90,83	1,8x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	4,0x10 <sup>7</sup> <b>ab</b>	36,78	2,6x10 <sup>7</sup>	5,5x10 <sup>7</sup>
	Enterobactérias <sup>1,2</sup> (UFC/g)	1x10 <sup>2</sup>	0	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	118,02	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>2</sup>	0	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	4,0x10 <sup>2</sup>	129,90	1,0x10 <sup>2</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	9,7x10 <sup>2</sup>	83,61	1,0x10 <sup>2</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	3,7x10 <sup>2</sup> <b>B</b>	103,25	1,0x10 <sup>2</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>
CR4	BHT AM (UFC/g)	3,0x10 <sup>7</sup> <b>b</b>	88,16	1,3x10 <sup>7</sup>	6,0x10 <sup>7</sup>	6,5x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	123,05	9,2x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>9</sup>	2,7x10 <sup>8</sup> <b>ab</b>	101,65	4,7x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>8</sup>
	BHT TSA (UFC/g)	1,4x10 <sup>7</sup> <b>Ab</b>	72,59	3,2x10 <sup>6</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>	2,6x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	84,42	4,7x10 <sup>7</sup>	4,9x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>8</sup> <b>ab</b>	37,99	6,7x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>
	<i>Vibrio</i> spp. (UFC/g)	1,1x10 <sup>7</sup> <b>b</b>	57,59	7,0x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>7</sup>	2,0x10 <sup>8</sup> <b>a</b>	68,22	4,2x10 <sup>7</sup>	2,8x10 <sup>8</sup>	3,9x10 <sup>7</sup> <b>ab</b>	37,59	2,2x10 <sup>7</sup>	5,0x10 <sup>7</sup>
	Enterobactérias <sup>1,2</sup> (UFC/g)	1,0x10 <sup>3</sup>	74,23	1,0x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>3</sup>	58,24	2,7x10 <sup>3</sup>	8,9x10 <sup>3</sup>	6,6x10 <sup>3</sup>	161,84	1,4x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>5</sup>
	Bactérias ácido-láticas (UFC/g)	6,7x10 <sup>2</sup> <b>b</b>	82,62	1,0x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	6,7x10 <sup>3</sup> <b>ab</b>	93,58	1,7x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup> <b>Aa</b>	85,39	1,3x10 <sup>3</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si e médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>1</sup>Análise pelo teste Kruskal-Wallis (p<0,05)

<sup>2</sup> Mediana

BHT: bactérias heterotróficas totais; AM: ágar marinho; TSA: ágar triptona de soja

Os resultados obtidos neste trabalho podem refletir a influência da estrutura e da função do sistema digestivo do camarão sobre a colonização bacteriana. A cutícula de quitina que recobre o intestino posterior tem sido apontada como um importante substrato para a colonização e aderência de vibrios (Harris, 1993; McGraw e Curtis, 2013; Soonthornchai *et al.*, 2015). Apesar de o intestino anterior também ser revestido internamente por quitina, as funções de trituração e filtração sugerem impedir uma colonização substancial (Hopkin e Nott 1980, Oxley *et al.*, 2002), o que poderia explicar as menores contagens bacterianas observadas na porção anterior. Apesar de a mucosa do intestino médio não ser recoberta por essa cutícula de quitina, o material contido no seu interior é revestido pela membrana peritrófica, que possui quitina em sua constituição (Wang e Granados, 2001; Martin *et al.*, 2006), o que também poderia favorecer a aderência de vibrios. Outros trabalhos devem ser desenvolvidos para estabelecer se a microbiota verificada no intestino médio dos camarões está associada ou não à membrana peritrófica do intestino médio, pois o método de coleta utilizado neste trabalho não permite fazer essa distinção.

Não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre as porções do intestino dos camarões para as contagens de enterobactérias. Para as contagens de bactérias ácido-láticas, as diferenças foram verificadas somente na fase CR4. A região anterior – composta pelo hepatopâncreas e intestino anterior - apresentou contagens de bactérias ácido-láticas significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que as contagens do intestino médio, mas que não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) do intestino posterior; também não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre as contagens obtidas nas porções média e posterior do intestino.

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as contagens de bactérias obtidas nas mesmas porções do trato gastrointestinal, mas nas diferentes fases (CR3 e CR4) somente para as contagens de bactérias heterotróficas totais utilizando TSA, na porção anterior e bactérias ácido-láticas. Em ambos os casos, as contagens em CR4 foram maiores que em CR3, sugerindo que possa haver um aumento das bactérias com o maior desenvolvimento dos animais. Não foram encontradas informações na literatura consultada sobre a avaliação de bactérias ácido-láticas e enterobactérias nas diferentes porções do intestino para que se pudesse realizar uma discussão comparativa.

#### **4.6. Identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) de bactérias isoladas das amostras de água e trato gastrointestinal do camarão *L. vannamei***

Ao todo 382 isolados bacterianos provenientes das amostras de água e trato gastrointestinal dos camarões foram submetidos a análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Desses, 98 foram identificados ao nível de gênero e 219 ao nível de espécie. As amostras que não puderam ser identificadas foram agrupadas e denominadas de NI – não identificadas, totalizando 65. No quadro 1 são apresentados os resultados da identificação das bactérias, separadas de acordo com o meio de cultura em que foram originalmente isoladas.

Os meios de cultura ágar marinho (AM) e TSA permitiram o isolamento de uma ampla variedade de bactérias, conforme preconizado, pois caracterizam-se como meios não seletivos. Foi constatada a presença de *Vibrio* em abundância como componentes das bactérias heterotróficas totais, condizente com os resultados obtidos por Ganesh *et al.* (2010). Utilizou-se o ágar TCBS por ser um meio seletivo para bactérias marinhas da família *Vibrionaceae* gênero *Vibrio*, no qual também podem crescer espécies bacterianas dos gêneros *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* e *Flavobacterium*, além de enterobactérias. Os resultados obtidos permitem inferir que o meio atende ao preconizado, mostrando-se bastante seletivo para o isolamento de *Vibrio*. Apenas *Stenotrophomonas maltophilia*, pertencente à família Xanthomonadaceae, não é descrita entre as espécies bacterianas passíveis de serem isoladas nesse meio. Espécies de *Vibrio* também foram isoladas do ágar MacConkey (MC), condizente com a descrição de utilização do meio, seletivo para isolamento de Enterobacteriaceae e outros bastonetes Gram negativo. No entanto, a presença de sais biliares não inibiu o crescimento de amostras de *Staphylococcus*, bactérias Gram positivo.

Os resultados obtidos com o ágar MRS, descrito como meio de cultura seletivo para o isolamento de *Lactobacillus* spp. e outras bactérias ácido-láticas mesofílicas são preocupantes, pois a maior parte dos micro-organismos isolados foram de espécies do gênero *Staphylococcus*, não pertencentes ao grupo de bactérias ácido-láticas. Esses resultados demonstram que o meio de cultura MRS não pode ser considerado seletivo apenas para bactérias ácido-láticas.

QUADRO 1: Micro-organismos identificados por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), isolados de amostras de água e trato gastrointestinal de camarão, em diferentes fases de criação e porções de trato gastrointestinal, de acordo com o meio de cultura

	Água PL <sub>10</sub>	PL <sub>10</sub>	Poço	Tq1	CR1	Tq2	CR2	Tq3	CR3 A	CR3 M	CR3 P	Tq4	CR4 A	CR4 M	CR4 P	Total	
<b>Ágar Marinho</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>		1													1	
	<i>Arthrobacter globiformis</i>						1									1	
	<i>Arthrobacter oxydans</i>				1											1	
	<i>Arthrobacter</i> spp.				1											1	
	<i>Bacillus cereus</i>		1													1	
	<i>Bacillus mycoides</i>		1													1	
	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>				2											2	
	<i>Citrobacter</i> spp.		1													1	
	<i>Enterobacter asburiae</i>			1			1									2	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			1	1											2	
	<i>Enterobacter</i> spp.						1									1	
	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	1														1	
	<i>Microbacterium</i> spp.						1									1	
	<i>Photobacterium damsela</i>						1		1							2	
	<i>Serratia marcescens</i>			2												2	
	<i>V. alginolyticus</i>	1	5				1		1	1	2		2	1	1	15	
	<i>V. fluvialis</i>						1									1	
	<i>V. rotiferianus</i>								1				1		1	3	
	<i>Vibrio</i> spp.		3		1	2		3	1	4	5	4	2		3	3	31
	NI		1			3		1		1	1		2	2	3	14	
<b>Total identificado no AM</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>84</b>	

continua....

QUADRO 1: Micro-organismos identificados por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), isolados de amostras de água e trato gastrointestinal de camarão, em diferentes fases de criação e porções de trato gastrointestinal, de acordo com o meio de cultura

	Água PL <sub>10</sub>	PL <sub>10</sub>	Poço	Tq1	CR1	Tq2	CR2	Tq3	CR3 A	CR3 M	CR3 P	Tq4	CR4 A	CR4 M	CR4 P	Total	
TSA	<i>Aeromonas hydrophila</i>		2													2	
	<i>Aeromonas</i> spp.						1									1	
	<i>Bacillus altitudinis</i>							1								1	
	<i>Bacillus</i> spp.	1														1	
	<i>Enterobacter asburiae</i>				1											1	
	<i>Enterobacter kobei</i>		1													1	
	<i>Enterobacter cloacae</i>						1									1	
	<i>Streptococcus salivarius</i>					1										1	
	<i>Exiguobacterium</i> spp.				1		1									2	
	<i>Photobacterium damseae</i>								5	5	2		1	3	1	17	
	<i>Photobacterium</i> spp.													1		1	
	<i>Serratia marcescens</i>			1												1	
	<i>Sphingobacterium</i> spp.			1												1	
	<i>Staphylococcus</i> spp.			1												1	
	<i>V. alginolyticus</i>	1	4						1	2	2	3		1	2	2	18
	<i>V. fluvialis</i>	1						2									3
	<i>Vibrio mytili</i>							1	1								2
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>				1												1
	<i>Vibrio</i> spp.		4		2	1	2	4					1	2			16
<i>Vibrio vulnificus</i>				1												1	
NI	1		3		5	1	2				2	1	1	1	6	23	
<b>Total identificado no TSA</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>96</b>	

continua....

QUADRO 1: Micro-organismos identificados por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), isolados de amostras de água e trato gastrointestinal de camarão, em diferentes fases de criação e porções de trato gastrointestinal, de acordo com o meio de cultura

		Água PL <sub>10</sub>	PL <sub>10</sub>	Poço	Tq1	CR1	Tq2	CR2	Tq3	CR3 A	CR3 M	CR3 P	Tq4	CR4 A	CR4 M	CR4 P	Total
<b>MacConkey</b>	<i>Acinetobacter</i> spp.	1	1														2
	<i>Aeromonas caviae</i>	2	3														5
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		2	2													4
	<i>Citrobacter freundii</i>			1													1
	<i>Enterobacter asburiae</i>			2													2
	<i>Enterobacter cloacae</i>			1	1												2
	<i>Enterococcus faecalis</i>														3	1	4
	<i>Klebsiella oxytoca</i>			1													1
	<i>Photobacterium damsela</i>						1										1
	<i>Shewanella putrefaciens</i>								3		3			1	1	2	10
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>													1	2	3	6
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			1													1
	<i>Stenotrophomonas</i> spp.			1													1
	<i>V. alginolyticus</i>				1								2				3
	<i>V. fluvialis</i>				1												1
	<i>Vibrio</i> spp.				1												1
	NI	1	2	1							1						3
<b>Total identificado no MC</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>53</b>	

continua....

QUADRO 1: Micro-organismos identificados por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), isolados de amostras de água e trato gastrointestinal de camarão, em diferentes fases de criação e porções de trato gastrointestinal, de acordo com o meio de cultura

		Água PL <sub>10</sub>	PL <sub>10</sub>	Poço	Tq1	CR1	Tq2	CR2	Tq3	CR3 A	CR3 M	CR3 P	Tq4	CR4 A	CR4 M	CR4 P	Total	
TCBS	<i>Enterobacter cloacae</i>				1												1	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					1											1	
	<i>V. alginolyticus</i>	2	3				1	4	2	1		1		2			16	
	<i>V. fluvialis</i>							4									4	
	<i>V. harveyi</i>														1	1	2	
	<i>V. mytili</i>												1				1	
	<i>V. parahaemolyticus</i>								1			1					2	
	<i>V. rotiferianus</i>									1	1						2	
	<i>V. vulnificus</i>				1													1
	<i>Vibrio</i> spp.	1	2		1	4		1		6	7	3		1	1	1		28
	NI	1	2		1	2		3	1	1	1	1			1	2		16
	<b>Total identificado no TCBS</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>		<b>74</b>
MRS	<i>Enterococcus casseliflavus</i>				1												1	
	<i>Enterococcus faecalis</i>													1	9	4	14	
	<i>Kocuria kristinae</i>		1														1	
	<i>Lactococcus garvieae</i>	2	5	5							5						17	
	<i>Lactococcus lactis</i>	1															1	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>											1					1	
	<i>Staphylococcus</i> spp.			1						1				1	5		8	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>								1		4	4			1	2		12
	<i>Staphylococcus hominis</i>															2		2
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>										1	1		5	2	5		14
	NI				2									2				4
	<b>Total identificado no MRS</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>17</b>	<b>13</b>		<b>75</b>

As bactérias do gênero *Vibrio* estão amplamente distribuídas no ambiente marinho (Thompson *et al.*, 2004a). Embora algumas espécies de *Vibrio* sejam relatadas como patogênicas ao camarão (Zhou *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014; Sivagnanavelmurugan *et al.*, 2015), o gênero foi identificado como um dos principais constituintes da comunidade bacteriana gastrintestinal de camarões peneídeos (Shakibazadeh *et al.*, 2009; Chaiyapechara *et al.*, 2012; Rungrassamee *et al.*, 2014), sendo que algumas espécies têm sido relacionadas ao aumento da resistência às doenças em animais aquáticos (Kapareiko *et al.*, 2011). Portanto, a possibilidade de ocorrência de surtos de doenças em uma criação de camarões não deve ser associada apenas à contagem de *Vibrio* total na amostra e nem à simples presença de uma espécie de *Vibrio* específica (Sung *et al.*, 2001; Gomez-Gil *et al.* 1998; Albuquerque *et al.*, 2013).

A figura 13 apresenta a distribuição da frequência relativa das espécies de *Vibrio* identificadas nas amostras do trato gastrintestinal dos camarões, obtidas em diferentes fases da criação e porções do sistema digestivo, e também para as amostras de água.

Vandenberghe *et al.* (1999) identificaram *V. alginolyticus* como a espécie de *Vibrio* dominante nos estágios larvais do camarão *L. vannamei*, tanto de amostras obtidas de animais saudáveis quanto de animais com sintomas de doenças. Neste estudo, *V. alginolyticus* foi identificado em todas as fases e em todas as porções do intestino avaliadas, exceto nas amostras obtidas na fase CR1, em que somente houve identificação de *Vibrio* ao nível de gênero.

Vandenberghe *et al.* (1999) também isolaram *V. harveyi* em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, predominantemente em animais doentes, uma vez que esse micro-organismo acomete principalmente os camarões nessa fase, com registros de mortalidade em massa (Robertson *et al.*, 1998). Neste trabalho, *V. harveyi* foi identificado no trato gastrintestinal dos animais somente na fase CR4, que corresponde ao estágio de juvenil, nas porções média e posterior do trato gastrintestinal (CR4M e CR4P). Por outro lado, Vandenberghe *et al.* (1999) isolaram e associaram *V. parahaemolyticus* somente às fases juvenil e adulta de camarões saudáveis. Neste estudo, *V. parahaemolyticus* também foi identificado exclusivamente na fase de juvenil, no intestino posterior de amostras obtidas na fase CR3 (CR3P). Os achados encontrados neste estudo coadunam com relatos de Soonthornchai *et al.*, (2015) que, baseados em observações feitas a partir de microscopia eletrônica do epitélio do trato gastrintestinal de *P. monodon* infectados artificialmente com *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*, descreveram que

*V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* podem se estabelecer e proliferar na porção final do intestino médio e no intestino posterior dos animais sem causar dano tecidual.

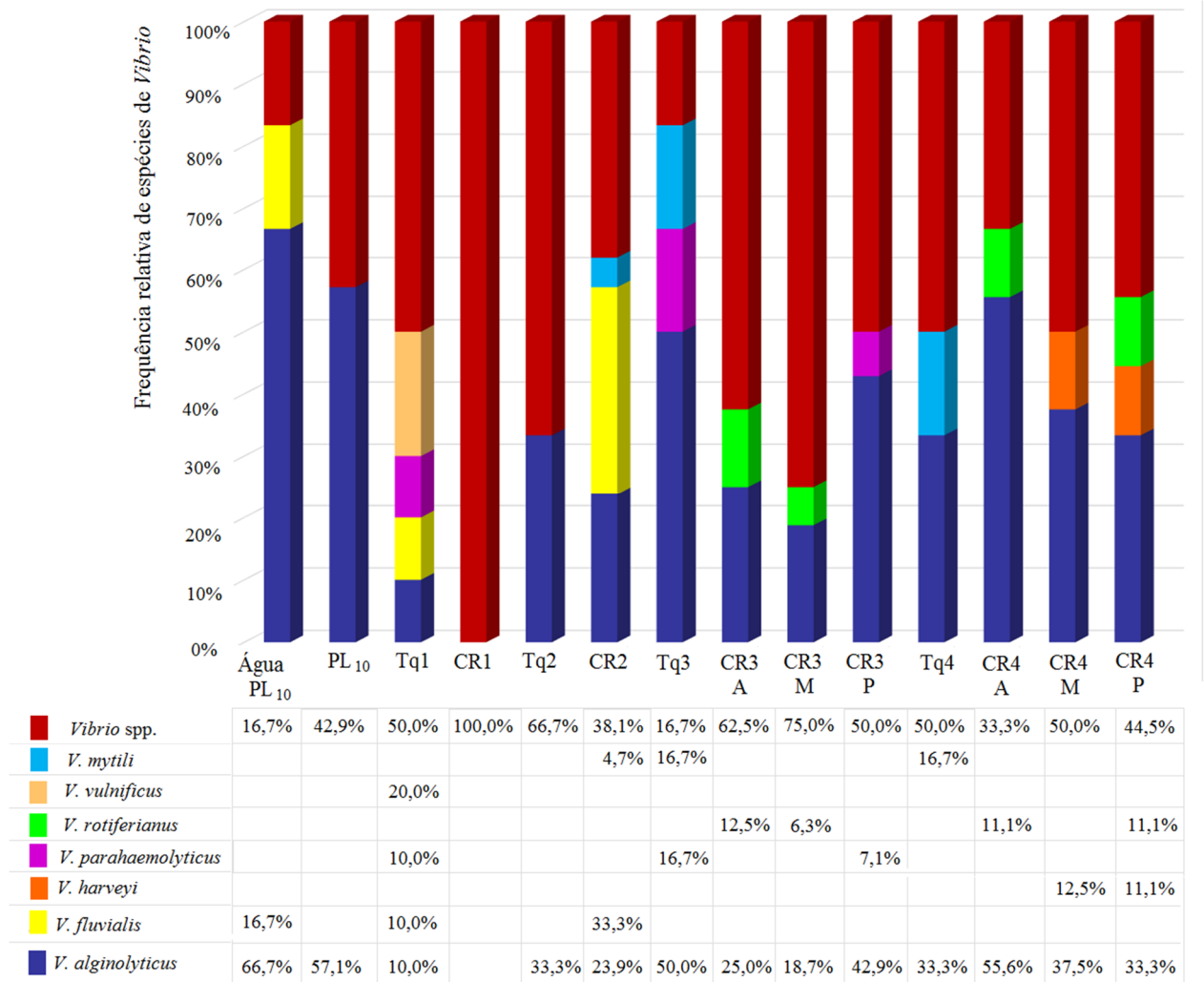


FIGURA 13. Frequência de distribuição de espécies de *Vibrio* em amostras de água e trato gastrintestinal de camarões *L. vannamei*, em diferentes fases de criação em sistema de bioflocos

A comunidade bacteriana gastrintestinal de camarões de várias espécies tem despertado o interesse de pesquisadores, principalmente devido à influência dessa microbiota sobre a saúde dos animais. Considerando que grande parte da microbiota gastrintestinal não é cultivável, as análises metagenômicas, com extração do DNA da comunidade microbiana, apesar de mais onerosas tem sido muito utilizada. Os avanços na tecnologia do sequenciamento do DNA promovem a oportunidade de acessar uma maior diversidade de micro-organismos (Chen *et al.*, 2015). Para facilitar a análise e a comparação dos resultados obtidos neste estudo com os

resultados das pesquisas de outros autores, utilizando essa metodologia, optou-se por agrupar as espécies identificadas nas amostras em filis e gêneros.

#### 4.7. Diversidade e composição das amostras de água e do trato gastrintestinal de camarões

Basicamente, as espécies identificadas a partir das amostras do trato gastrintestinal dos camarões foram agrupadas em dois filis, presentes em todas as amostras. Proteobacteria, corresponde ao filo bacteriano mais frequentemente isolado nas amostras do trato gastrintestinal dos camarões, e Firmicutes (figura 14).

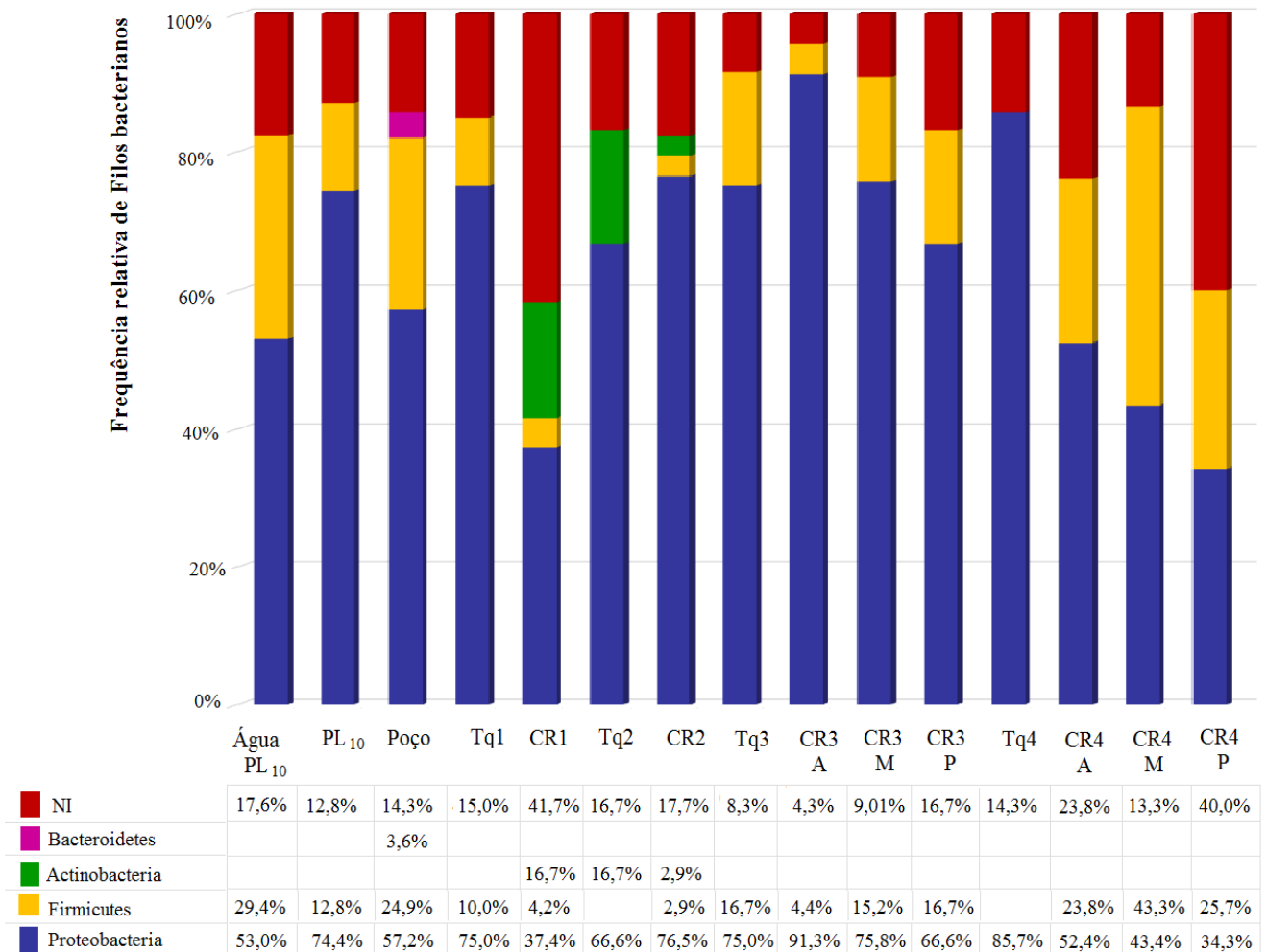


FIGURA 14. Frequência de distribuição de filis bacterianos em amostras de água e trato gastrintestinal de camarões *L. vannamei*, em diferentes fases de criação em sistema de bioflocos

Vários estudos abordando a caracterização da comunidade bacteriana do trato gastrointestinal de camarões *L. vannamei* identificaram o filo Proteobacteria como predominante nessa comunidade, com abundância relativa variando entre 68% a 97% (Zhang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017). O filo Proteobacteria também foi predominante no trato gastrointestinal de outras espécies de camarão como *Penaeus monodon* (Chaiyapechara *et al.*, 2012; Rungrassamee *et al.*, 2013), *Fenneropenaeus chinensis* (Liu *et al.*, 2011) e *Litopenaeus stylirostris* (Cardona *et al.*, 2016).

Gainza *et al.* (2017), utilizando o sequenciamento das regiões hipervariáveis V2 e V3 do gene rRNA 16S, identificaram o filo Proteobacteria como o mais abundante no trato gastrointestinal apenas em camarões da espécie *L. vannamei* obtidos por ocasião da despesca, na fase de juvenil. Nas amostras dos animais coletados na fase de pós-larva, o filo Proteobacteria foi o segundo mais abundante, sendo precedido pelo filo identificado como CKC4, composto exclusivamente por representantes não cultiváveis.

Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria foram os outros principais filios identificados no trato gastrointestinal do camarão *P. monodon* (Shakibazadeh *et al.*, 2009; Rungrassamee *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2014) e Cornejo-Granados *et al.* (2017), trabalhando com *L. vannamei*, também relatam esses filios entre os mais abundantes na comunidade bacteriana do trato gastrointestinal do camarão branco do Pacífico, mas ocorrendo em frequências distintas das relatadas para o *P. monodon*. Resultados divergentes foram obtidos por Zeng *et al.* (2017), pois o filo Cyanobacteria figurou como o segundo mais abundante na microbiota gastrointestinal de camarão *L. vannamei*. As divergências observadas entre os filios predominantes sugerem que a estrutura da população bacteriana está relacionada a variáveis ambientais (Zeng *et al.*, 2017). Relacionado a isso, Tang *et al.* (2014) relataram que o filo Actinobacteria foi dominante na água de criação de *L. vannamei* em sistemas utilizando água de baixa salinidade e altas temperaturas.

As bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria foram identificadas com maior frequência relativa nas amostras de água dos tanques de criação de *L. vannamei*. Esses resultados foram consistentes com os dados obtidos por Cardona *et al.* (2016) ao caracterizarem a comunidade microbiana do sistema de bioflocos. As espécies pertencentes ao filo Proteobacteria estão amplamente distribuídas no ambiente marinho, envolvidas com a reciclagem de nutrientes e mineralização de compostos orgânicos, correspondendo às bactérias heterotróficas (Kirchman,

2002). No sistema de bioflocos, a adição de uma fonte de carbono estimula o desenvolvimento desse grupo de micro-organismos (Avnimelech *et al.*, 1994; Avnimelech, 1999; McIntosh *et al.*, 2000; Avnimelech, 2003; Burford *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2006). Mesmo nos sistemas de criação que adotam água clara, o filo Proteobacteria foi o mais abundante (Zhang *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

No que concerne aos filos, a literatura consultada permite inferir que a composição bacteriana no intestino dos camarões é muito semelhante, sendo as diferenças marcantes observadas entre os gêneros e espécies. A figura 15 apresenta a frequência de distribuição dos gêneros bacterianos identificados nas amostras do trato gastrintestinal dos camarões, nas diferentes fases de criação.

O gênero *Vibrio* foi o mais abundante no trato gastrintestinal do camarão *L. vannamei* em todas as fases de criação e porções do sistema digestivo avaliadas. Um padrão similar para a composição da microbiota do trato gastrintestinal do camarão, revelando uma alta densidade populacional de *Vibrio* spp., foi relatado por Gomez-Gil *et al.* (1998); Moss *et al.*, (2000); Oxley *et al.*, (2002); Liu *et al.* 2011 e Tzuc *et al.* (2014). Resultado oposto foi observado nos estudos desenvolvidos por Zeng *et al.* (2017), utilizando o sequenciamento da região hipervariável V4 do gene rRNA 16S, em que o gênero *Vibrio* não foi relacionado entre os dez gêneros mais abundantes. Gainza *et al.* (2017) relataram a presença de *Vibrio* no trato gastrintestinal em baixa abundância relativa, variando entre 0,64% nas amostras obtidas de animais na fase de despesca e 2,02% para as amostras provenientes de animais na fase de berçário. Gainza *et al.* (2017) descreveram que os animais estudados foram criados em lagoas com baixa salinidade (5‰) e atribuíram a baixa frequência de vîbrios no trato gastrintestinal dos camarões obtidos dessas lagoas, nas fases de berçário e engorda, às concentrações de salinidade próximas ao limite mínimo de tolerância para a maioria dos vîbrios.

Cornejo-Granados *et al.* (2017) compararam a composição bacteriana do trato gastrintestinal de camarões *L. vannamei* capturados na natureza e criados em cativeiros (obtidos de sistemas de criação comercial), utilizando o sequenciamento de sete regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S. Esses autores verificaram que a comunidade bacteriana gastrintestinal dos camarões obtidos na natureza apresentou uma diversidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada à comunidade microbiana dos intestinos dos camarões oriundos de sistemas de criação comercial. Nas amostras provenientes do ambiente natural, *Photobacterium* (16%),

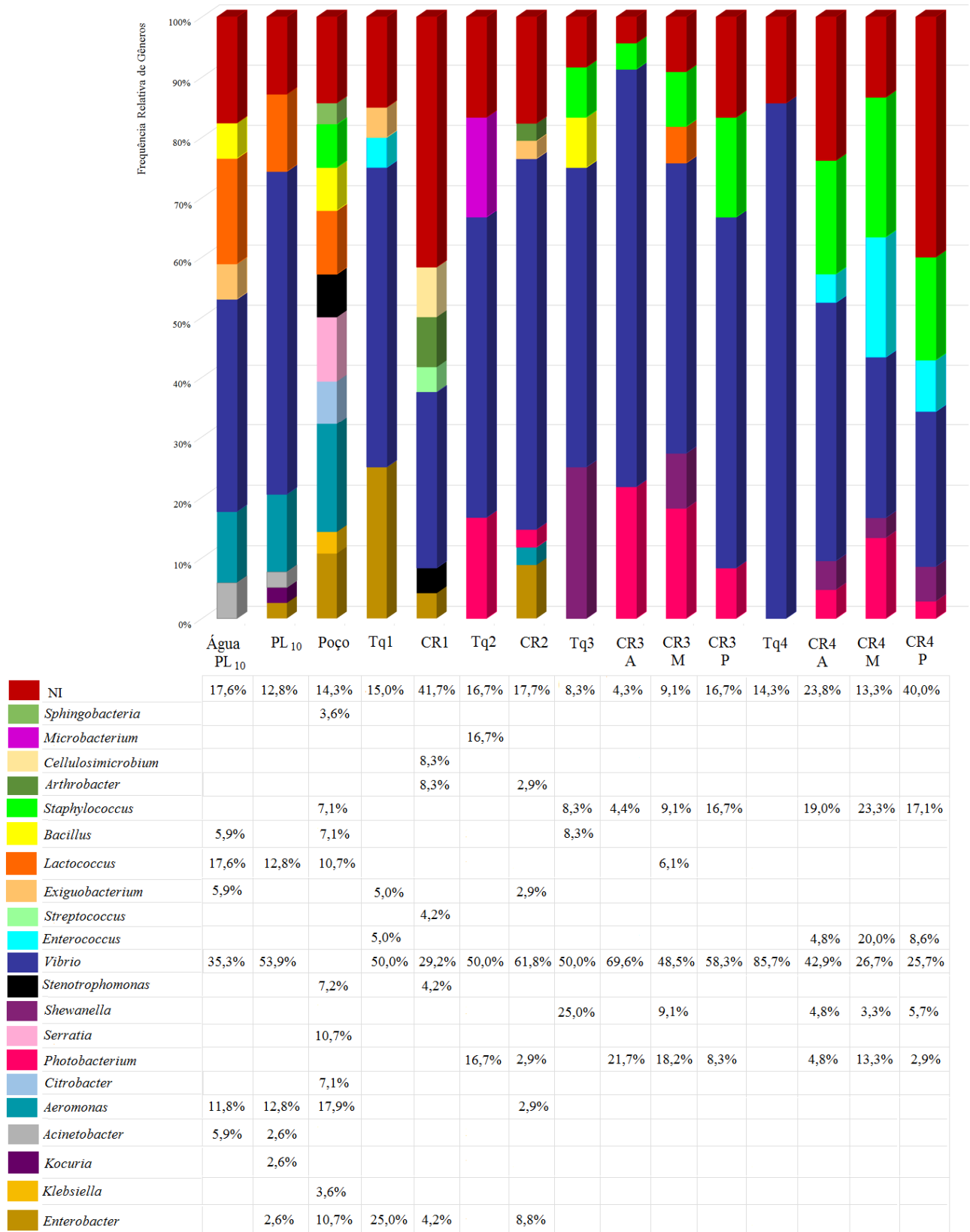


FIGURA 15. Frequência de distribuição de gêneros bacterianos em amostras de água e trato gastrointestinal de camarões *L. vannamei*, em diferentes fases de criação em sistema de bioflocos

*Acinetobacter* (12%) e *Vibrio* (8%) foram os gêneros predominantes, enquanto que *Pseudomonas* (18%), *Vibrio* (3%), e *Escherichia* (3%) predominaram nas amostras dos animais criados em cativeiro. Em quaisquer das duas situações apresentadas por Cornejo-Granados *et al.* (2017), o gênero *Vibrio* não foi predominante, ao contrário do observado neste estudo.

De acordo com Prieur *et al.* (1990), o ambiente artificial dos sistemas de criação dos animais aquáticos, em que a fonte e a qualidade de água, a dieta, a densidade de estocagem e a estrutura do *habitat* são diferentes do meio ambiente natural, podem levar ao estabelecimento de uma microbiota gastrintestinal distinta em indivíduos de uma mesma espécie. De fato, Rungrassamee *et al.* (2014) observaram uma maior diversidade bacteriana na microbiota intestinal de *Penaeus monodon* capturados na natureza em comparação à microbiota intestinal obtida de indivíduos da mesma espécie criados em sistemas comerciais. De acordo com Sullam *et al.* (2012), as bactérias presentes no *habitat* aquático influenciam a microbiota intestinal dos animais. Sendo assim, os camarões obtidos em um mesmo tanque de criação seriam expostos a uma população bacteriana mais homogênea em comparação aos *habitat* naturais, justificando a maior variação individual observada nos grupos de camarões que são obtidos na natureza. As diferenças observadas na composição e na diversidade da comunidade microbiana gastrintestinal dos camarões criados em sistemas artificiais pode, então, ser atribuída à grande diversidade de sistemas de criação que podem ser adotados para esses animais. Por outro lado, as alterações na população bacteriana intestinal podem fornecer informações úteis sobre o manejo da criação dos camarões, principalmente porque muitos micro-organismos encontrados no trato gastrintestinal estão associados a doenças (Chaiyapechara *et al.*, 2012).

De acordo com Wen *et al.*, (2016), além das condições ambientais a que os animais são expostos, a metodologia utilizada para caracterizar a comunidade bacteriana pode justificar as diferenças descritas. Estes autores relataram vieses significativos na estrutura da microbiota intestinal de camarões, associadas ao método de extração de DNA utilizado.

Consistente com outros estudos (Johnson *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014; Cardona *et al.* 2016) os resultados obtidos neste trabalho revelaram que a água do tanque de criação apresenta uma composição bacteriana distinta da composição bacteriana do intestino dos camarões. De acordo com Johnson *et al.* (2008), a microbiota do ambiente influencia a microbiota intestinal; porém, nem todas as bactérias presentes na água podem ser ingeridas e sobreviver no trato gastrintestinal dos camarões. Apesar de ser influenciada pelo ambiente de criação, existem

evidências de que a comunidade bacteriana do trato intestinal de camarões difere da microbiota do ambiente que os circunda, considerando que sistema digestivo do camarão possui enzimas necessárias para degradar o alimento e um menor potencial de oxirredução do que a água dos tanques de criação e, ainda, que existem fatores imunológicos que podem selecionar as diferentes bactérias (Johnson *et al.*, 2008).

Resultados obtidos por Cardona *et al.* (2016) e Zhang *et al.* (2016) indicaram que as amostras de água da criação de camarões apresentam uma maior diversidade bacteriana, quando comparadas ao trato gastrintestinal dos animais nelas criados. Com base nos resultados obtidos neste estudo, não foi possível observar maior diversidade de bactérias na comunidade aquícola comparada à população bacteriana do trato gastrintestinal dos camarões.

Em conformidade com as observações verificadas por Zhang *et al.* (2016), houve variação na composição e na frequência relativa dos gêneros constituintes da comunidade bacteriana das amostras de água do tanque obtidas em diferentes períodos, sugerindo alterações dinâmicas nessa população. Independentemente disso, *Vibrio* foi o gênero bacteriano que apresentou maior frequência relativa nas amostras de água dos tanques, em todas as fases. Resultado distinto do obtido por Zhang *et al.* (2016), que detectaram *Pseudomonas* como o gênero mais abundante na água do sistema de criação dos camarões.

Um dos fatores ambientais mais importantes na alteração da comunidade microbiana do ambiente aquícola é a temperatura da água. Águas com maiores temperaturas abrigam maior diversidade e riqueza bacteriana em relação a gêneros e espécies, quando comparadas às águas com menores temperaturas (Tang *et al.*, 2014). Essa tendência de menor riqueza da população bacteriana presente na água em função da redução da temperatura pode ser constatada neste trabalho. A amostra de água coletada na fase de criação CR4, correspondente a amostras Tq4, foi obtida no período em que as menores temperaturas da água do tanque onde os animais estavam sendo criados foram registradas (tabela 1). Na amostra Tq4, somente espécies de *Vibrio* foram identificadas, dominando a população bacteriana da água. Zhang *et al.* (2016) relatam que, embora a temperatura da água altere a diversidade da população bacteriana, o número total de bactérias não sofre influência da temperatura, como pode ser verificado na tabela 3, podendo ser alterado por outros fatores ambientais, como a presença de nutrientes.

Muitas bactérias do trato gastrointestinal dos camarões, entre elas as pertencentes ao gênero *Vibrio*, são patógenos oportunistas e as interações entre os diferentes micro-organismos e a qualidade da água podem modificar a patogenicidade dessas bactérias (Frey-Klett *et al.*, 2011; Shakya *et al.*, 2013), de forma que as alterações de temperatura comumente acarretam surtos de doenças infecciosas nos camarões *L. vannamei* (Tang *et al.*, 2014). Apesar de se verificar uma alteração na diversidade da microbiota aquícola no período em que houve registro de menores temperaturas, os resultados obtidos neste estudo não permitem fazer uma correlação entre os eventos. Ressalta-se que não foi registrado surto de doença nos camarões até o final do ciclo de produção. No entanto, em função das observações verificadas e, considerando que somente no período correspondente às menores temperaturas e predomínio de *Vibrio* na água identificou-se *V. harveyi* associado ao trato gastrointestinal dos camarões (figura 13), é extremamente importante o desenvolvimento de estudos que contemplem a composição e a diversidade microbiana do trato gastrointestinal do camarão *L. vannamei* e suas interações com fatores ambientais, visando também o controle de doenças.

A colonização do intestino de um hospedeiro não é determinada apenas pelos fatores ambientais, mas também estão relacionadas a outros fatores como às interações que ocorrem entre a microbiota e o hospedeiro (Harris, 1993), ao estágio de desenvolvimento (Huang *et al.*, 2014) e as condições fisiológicas do hospedeiro (Li *et al.* 2007).

Zeng *et al.* (2017) avaliando as diferenças da microbiota do trato gastrointestinal de *L. vannamei* em diferentes estágios de criação constataram que a composição microbiana altera significativamente ( $p < 0,01$ ) em função do estágio de criação, no entanto, identificaram algumas espécies de micro-organismos presentes em todos os estágios de criação, sugerindo que essa seja a população funcional e estruturalmente importante para os camarões.

Estudos envolvendo diferentes fases de desenvolvimento do camarão *P. monodon* (Rungrassamee *et al.*, 2013) e *L. vannamei* (Huang *et al.*, 2016, Gainza *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017) têm demonstrado que a microbiota do trato gastrointestinal é dinâmica, alterando a sua composição e diversidade em função da idade do hospedeiro. Essas alterações verificadas na comunidade bacteriana intestinal relacionadas às fases de desenvolvimento dos animais aquáticos podem ser atribuídas às alterações fisiológicas do trato intestinal (Harris, 1993). Rungrassamee *et al.* (2013) observaram em *P. monodon* diferenças na comunidade bacteriana intestinal da fase de pós-larva para a fase de juvenil: espécies de

*Photobacterium* predominaram durante a fase de pós-larva (80%) e foram substituídas na fase juvenil por espécies de *Vibrio*, que se tornaram dominantes na microbiota do intestino. Esses mesmos autores destacaram que as populações bacterianas dos intestinos de camarões avaliados em três períodos da fase de juvenil foram mais semelhantes entre si quando comparadas às populações da fase de pós-larva. Sendo assim, apesar de a população bacteriana intestinal de camarões em suas fases iniciais ser altamente diversa, ela torna-se progressivamente menos variada e semelhante à fase de juvenil. Apesar de avaliar uma espécie diferente, os resultados obtidos neste estudo são, em parte, opostos aos relatados por Rungrassamee *et al.* (2013). O gênero *Vibrio* ocorreu em uma maior frequência relativa em todas as fases e *Photobacterium* não foi identificado nas fases de pós-larva (PL<sub>10</sub> e CR1), portanto, as maiores frequências desse gênero ocorreram na fase juvenil. Destaca-se que o gênero *Shewanella* também não foi identificado na fase de pós-larva no trato gastrointestinal dos camarões.

Soonthornchai *et al.* (2010) destacam que o sistema imune do camarão é menos desenvolvido na fase de pós-larva quando comparado à fase de juvenil, o que poderia explicar as diferenças em relação à diversidade de bactérias no intestino do animal. A imaturidade do sistema imunológico dos camarões na fase de pós-larva promove condições menos hostis, determinando uma maior diversidade bacteriana intestinal nessa fase de desenvolvimento. O maior desenvolvimento do sistema imune de juvenis impõe uma maior pressão seletiva, determinando a presença de bactérias altamente adaptadas ao trato intestinal do hospedeiro (Matamoros, *et al.* 2013; Rungrassamee *et al.*, 2013).

Devido ao número semelhante de bandas observadas na figura 15, sugere-se que não ocorre variação na riqueza de gêneros bacterianos do trato gastrointestinal dos camarões, nas diferentes fases avaliadas, mas as diferenças no tamanho das bandas indicam variação da abundância dos gêneros nas diferentes fases de criação. Os gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* foram mais abundantes na última fase (CR4). Esses resultados estão em conformidade com os dados obtidos por Shakibazadeh *et al.* (2009), que relataram o gênero *Staphylococcus* como um dos mais abundantes entre as bactérias Gram positivo identificadas no trato gastrointestinal do camarão *L. vannamei* juvenil, e associados aos resultados relatados por Albinati (2012) que isolou espécies de *Enterococcus* no intestino do camarão *P. schimitti* adulto.

De acordo com Xiong *et al.* (2017), a maior diversidade e variação de gêneros bacterianos observados na microbiota intestinal dos estágios larvais dos camarões devem-se à imaturidade

do intestino e da própria microbiota, resultando em uma população relativamente instável. Isso ocorre, de acordo com os autores, quando existem nichos desocupados e o epitélio intestinal não foi efetivamente colonizado. Além disso, Xiong *et al.* (2017) relataram que a dieta exerce forte influência sobre a microbiota. Os dois fatores descritos podem explicar os resultados obtidos neste trabalho. Nos sistemas de criação comercial, durante as fases larvais iniciais, o camarão se alimenta principalmente de náuplio de *Artemia* e, nas fases juvenil e adulto recebem uma dieta mais homogênea a base de rações comerciais peletizadas com formulação padronizada (Huang *et al.*, 2016; Cornejo-Granados *et al.*, 2017). Sendo assim, como as pós-larvas (PL<sub>10</sub>) adquiridas e utilizadas na realização deste estudo já estavam recebendo ração comercial como alimento, pode ser que, por ocasião da primeira amostragem realizada para as análises microbiológicas, a comunidade microbiana intestinal desses animais já se encontrava estabelecida. Dessa forma, as variações na diversidade da comunidade intestinal relatada anteriormente não ocorreram.

Ainda, a análise da figura 15 permite constatar que a água do poço utilizada para encher os tanques e repor a água perdida por evaporação apresentou uma diversidade maior do que a água do tanque de criação dos animais, em quaisquer das fases avaliadas. A presença de bactérias na água do tanque dos camarões criados em sistema de bioflocos é parcialmente dependente da comunidade bacteriana presente na fonte de água utilizada para abastecer o tanque, das bactérias presentes na dieta fornecida aos animais (Kasan *et al.*, 2017) e, ainda, de bactérias adicionadas em formulações probióticas comerciais (Nimrat *et al.*, 2012). Os micro-organismos que predominaram no sistema de bioflocos, e a salinidade da água, alteraram o sistema natural aquático e, por sua vez, sofrem influência de fatores que predominam nesse sistema, como a baixa intensidade de luz que penetra na água e a alta concentração de matéria orgânica (Pérez-Rostro *et al.*, 2014).

De acordo com Cardona *et al.* (2016), as bactérias presentes na água do sistema de bioflocos limitam a sobrevivência de outras bactérias, inclusive as bactérias patogênicas. Esses autores verificaram que, ao compararem o sistema de bioflocos com o sistema de água clara, *Vibrio* foi menos abundante na água do bioflocos (0,01% em bioflocos e 0,73% no sistema de água clara), sendo assim, no sistema de bioflocos os animais estariam menos expostos a vibrioses. No entanto, na amostra de água coletada na fase CR4 (Tq4) constatou-se um aumento da frequência relativa de *Vibrio*. Yasuda e Kitao (1980) também relataram que a população bacteriana da água do tanque foi dominada por *Vibrio* na fase final da criação.

#### **4.8. Pesquisa de doenças infecciosas de camarões**

Não foram detectadas doenças infecciosas nas amostras de camarões coletadas durante todas as fases avaliadas no trabalho. Durante o período avaliado, as variáveis físico-químicas de qualidade de água do sistema de criação com bioflocos microbianos mantiveram-se dentro da faixa considerada ideal à espécie de camarão *L. vannamei*, sugerindo que as bactérias heterotróficas do bioflocos foram eficientes em manter a qualidade da água, o que contribuiu para a manutenção da saúde dos animais. A troca da água nos sistemas de criação de camarão foi identificada como um importante fator que contribui na disseminação de diversas doenças, por isso, o sistema de bioflocos, que adota trocas reduzidas de água, favorece aspectos relacionados à biossegurança, reduzindo o risco de introdução e disseminação de doenças (Moss *et al.*, 2000; McIntoch *et al.*, 2000). Dessa forma, pode-se inferir que os animais foram criados em ambiente adequado, sendo a microbiota do trato gastrointestinal avaliada neste trabalho proveniente de animais hígidos.

#### **4.9. Avaliação microbiológica das rações e do produto comercial contendo probióticos**

As bactérias do gênero *Bacillus* e as bactérias ácido-láticas têm sido utilizadas como probióticas para animais aquáticos. De uma maneira geral, os resultados obtidos revelaram elevação nas taxas de sobrevivência e aumento da absorção de alimentos, devido a maior disponibilidade de proteases, culminando em um melhor crescimento dos animais (Guo *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Swapna *et al.*, 2015) e manutenção da qualidade da água do sistema de criação (Nimrat *et al.*, 2012; Kasan *et al.*, 2017), atuando principalmente no controle da comunidade de *Vibrio* (Aguilera-Rivera *et al.*, 2014).

À água dos tanques de criação foi adicionado um produto comercial contendo probióticos composto de *Bacillus cereus* ( $4,0 \times 10^{11}$  UFC/Kg), *Bacillus subtilis* ( $4,0 \times 10^{11}$  UFC/Kg), *Bifidobacterium bifidum* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC/Kg), *Enterococcus faecium* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC/Kg) e *Lactobacillus acidophilus* ( $3,5 \times 10^{11}$  UFC/Kg), segundo informações do fabricante. Além disso, com exceção da ração R4, todas as outras rações fornecidas aos animais possuíam a informação nos rótulos da adição de *Pediococcus acidilactici* ( $1,5 \times 10^9$  UFC/kg) ou *Bacillus* spp. como eventual substituto.

A espécie bacteriana relacionada nos níveis de garantia dos rótulos das rações fornecidas aos camarões (*Pediococcus acidilactici*) não foi isolada nas amostras de água nem no trato gastrintestinal dos camarões em nenhuma das fases avaliadas. O gênero *Bacillus*, indicado como eventual substituto, foi identificado em apenas uma fase, na amostra de água Tq3. Entretanto, esse gênero também é relacionado na formulação do produto comercial contendo probióticos adicionado à água e também foi identificado nas amostras de água do poço da propriedade, utilizada inicialmente para encher os tanques e ocasionalmente para repor as perdas por evaporação. Não foi detectada a presença das outras espécies bacterianas relacionadas no rótulo do produto comercial. Apesar desse fato, a qualidade da água do sistema de criação manteve-se dentro dos parâmetros ideais, sugerindo que as bactérias heterotróficas do sistema de bioflocos sejam as principais responsáveis pela manutenção da qualidade da água (Schryver, 2012).

Os resultados encontrados neste trabalho, referentes ao isolamento e identificação de *Bacillus*, podem ser explicados pela baixa concentração de micro-organismos detectados nas amostras de ração e no produto comercial contendo probióticos, apresentados na tabela 11. Esses produtos apresentaram uma concentração de bactérias que não estavam em conformidade com o declarado no rótulo.

TABELA 7. Contagens de bactérias totais e bactérias ácido-láticas nas rações utilizadas nas diferentes fases da criação do camarão *Litopenaeus vannamei* e no produto comercial contendo probióticos adicionado à água

Parâmetro	R1	R2	R3	R4	Probiótico
Contagem bacteriana total (UFC/g)	1,2x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>3</sup>	7x10 <sup>2</sup>	7,3x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>
Bactérias ácido-láticas (UFC/g) - M17	5,7x10 <sup>2</sup>	3,3x10 <sup>3</sup>	6,6x10 <sup>3</sup>	9x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>
Bactérias ácido-láticas (UFC/g) - MRS	<1	1,1x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>
Identificação	<i>Bacillus</i> spp. <i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus sonorensis</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus</i> spp.	<i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus</i> spp.

Em relação às espécies bacterianas identificadas nas rações, embora *Pediococcus* tenha sido isolado apenas na ração R3, as rações R1 e R2 estão em conformidade com o declarado, pois *Bacillus* spp. podem ser utilizados como substitutos. Embora *Bacillus* também tenham sido isolados na ração R4, no rótulo dessa ração não consta adição destas bactérias.

No produto comercial contendo probióticos foi identificado apenas *Bacillus*, sendo que não se esperava isolar *Bifidobacterium bifidum* com a metodologia utilizada, pois trata-se de um micro-organismo anaeróbico obrigatório.

## 5. CONCLUSÕES

A comunidade microbiana heterotrófica do biofloco mostrou-se eficiente em manter os parâmetros de qualidade da água do sistema dentro da faixa adequada para a criação de camarões da espécie *L. vannamei*.

O trato gastrintestinal dos animais no início da fase de criação, pós-larva, apresentou menor contagem bacteriana do que o trato gastrintestinal dos animais nas fases mais avançadas do ciclo de produção, correspondentes a camarões juvenis, sugerindo uma tendência de aumento da comunidade bacteriana ao longo do período de criação.

A população bacteriana no trato gastrintestinal do camarão *L. vannamei* não é uniformemente distribuída, sendo que a porção anterior alberga uma menor quantidade de bactérias quando comparada ao intestino médio.

Proteobacteria e Firmicutes foram os filos bacterianos identificados em todas as amostras do trato gastrintestinal dos camarões, nas fases de pós-larva e juvenis, criados em sistema de bioflocos, sendo o filo Proteobacteria dominante.

O gênero bacteriano predominante no trato gastrintestinal e nas amostras de água foi *Vibrio*.

A riqueza bacteriana no trato gastrintestinal dos camarões, em relação aos gêneros, não variou em função da fase de criação, mas verificou-se uma variação na composição da microbiota, sobretudo em relação à abundância relativa dos gêneros componentes da comunidade bacteriana. Alguns gêneros como *Photobacterium*, *Shewanella* e *Staphylococcus* foram identificados somente na fase juvenil enquanto outros como Enterobacter, ocorreram apenas nas fases iniciais de criação.

A microbiota do trato gastrintestinal dos animais variou com o sistema de criação, sendo identificados gêneros bacterianos presentes exclusivamente nos animais vindos da larvicultura.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a comunidade bacteriana cultivável do trato gastrintestinal do camarão *L. vannamei* criado em sistema de bioflocos se altera durante o ciclo de produção, havendo um aumento no número de bactérias no trato gastrintestinal dos animais nas fases próximas ao final do ciclo, com modificação na composição dos gêneros bacterianos. Essas alterações são importantes para o hospedeiro, uma vez que a microbiota do trato gastrintestinal tem sido associada às doenças, mas também à produção de enzimas digestivas.

As informações da composição da microbiota gastrintestinal dos camarões e dos fatores que alteram a sua diversidade permitem uma abordagem racional desses micro-organismos objetivando melhorias na produtividade.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, n. 6928, p.198-207, 2003.

AGUILERA-RIVERA, D.; PRIETO-DAVO, A.; ESCALANTE, K.; *et al.* Probiotic effect of FLOC on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 424, p. 215-219, 2014.

ALAVANDI, S. V.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T. C.; *et al.* Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 17, n. 2, p. 115-120, 2004.

ALBINATI, F. L. *Isolamento e seleção de bactérias candidatas a probiótico para utilização em cultivo do camarão marinho (Litopenaeus vannamei, Boone, 1931)*. 2012. 78f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

ALBUQUERQUE, R. C.; CRISTINA, G. C.; LIMA, R. A; *et al.* Microbiota of *Vibrio* sp. in the hepatopancreas of cultured white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Rev. MVZ Córdoba*, v. 18, n. 2, p. 3439-3443, 2013.

ALLEN, A. E.; HOWARD-JONES, M. H.; BOOTH, M. G.; *et al.* Importance of heterotrophic bacterial assimilation of ammonium and nitrate in the Barents sea during summer. *J. Mar. Syst.*, v. 38, p. 93-108, 2002.

ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? *Int. J. Food Microbiol.*, v. 92, p. 265-274, 2004.

AMANIDAZ, N.; ZAFARZADEH, A.; MAHVI, A. H. The interaction between heterotrophic bacteria and coliform, fecal coliform, fecal Streptococci bacteria in the water supply networks. *Iran J. Public Health*, v. 44, n.12, p.1685-1692, 2015.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, v. 59, n. 1, p.143-169, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Microbiological examination. In: APHA. *Microbiological examination of water e wastewater*. 20th ed. Washington, DC. APHA, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21 ed. Washington, 2005.

ASSOCIAÇÃO CULTURAL E EDUCACIONAL BRASIL (ACEB). *1º Anuário brasileiro da pesca e aquicultura*. 2014. 132p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official Methods of Analysis*. Gaithersburg, MD: AOAC International, 16 ed, 2010.

APPELBAUM, S., GARADA, J., MISHRA, J. K., Growth and survival of the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared intensively in the brackish water of the Israeli Negev desert. *Isr. J. Aquac. -Bamidgeh*, v.54, p. 41-48, 2002.

AQUACOP. Penaeid reared broodstock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *Proc. World Maric. Soc.*, v. 10, p. 445-452, 1979.

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. *Revista UninCor*, V. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

ASSIS, G. B. N.; PEREIRA, F. L.; ZEGARRA, A. U. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of Gram-positive fish pathogens. *Front. Microbiol.*, v. 8, 1492, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01492.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). *Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011*. Natal: MPA, 2013. 77p.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agentes of zoonoses. *Vet. Microbiol.*, v. 140, p. 310-317, 2010.

AVNIMELECH, Y. (Ed.). *Biofloc technology - A practical guide book*, 2.ed. Baton Rouge, Louisiana: The World Aquaculture Society, 2012. 271p.

AVNIMELECH, Y. *Biofloc technology - a practical guide book*. Baton Rouge, Louisiana: The World Aquaculture Society, 2009.182 p.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, v. 176, p. 227-235, 1999.

AVNIMELECH, Y. Control of microbial activity in aquaculture systems: active suspension ponds. *World Aquac.*, v. 34, n. 4, p. 19-21, 2003

AVNIMELECH, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, v. 264, p. 140-147, 2007.

AVNIMELECH, Y.; KOCHVA, M.; DIAB, S. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Isr. J. Aquacult-Bamid.*, v. 46, n. 3, p. 119-131, 1994.

AVNIMELECH, Y.; WEBER, B.; HEPHER, B.; *et al.* Studies in circulated fish ponds: Organic matter recycling and nitrogen transformation. *Aquacult. Fish. Manage.*, v. 17, p. 231-242, 1986.

AZAM, F.; MALFATTI F. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5, p. 782-791, 2007.

AZIM, M. E.; LITTLE, D. C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 283, p. 29-35, 2008.

- AZIM, M. E.; LITTLE, D. C.; BRON, J. E. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technol.*, v. 99, p. 3590-3599, 2008.
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; *et al.* The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, v. 114, p. 173-186, 2006.
- BALLESTER, E. L. C., ABREU, P. C.; CAVALLI, R. O., *et al.* Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquac. Nutr.*, v. 16, p. 163-172, 2010.
- BARBIERI JR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. *Camarões Marinhas: maturação, reprodução e larvicultura*. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001, 225p.
- BARTRAM, J.; COTRUVUO, J.; EXNER, M.; *et al.* (eds.). *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. London: WHO, IWA Publishing, 2003. 256p.
- BASSLER, B. L.; GIBBONS, P. J.; YU, C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria: Chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n.36, p.24268-24275, 1991.
- BEARDSLEY, C.; MOSS, S.; MALFATTI, F.; AZAM, F. Quantitative role of shrimp fecal bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 77, n. 1, p. 134-45, 2011.
- BENTZON-TILIA, M.; SONNENSCHNEIN, E. C.; GRAM, L. Monitoring and managing microbes in aquaculture – towards a sustainable industry. *Microbial Biotechnol.*, v. 9, p. 576–584, 2016.
- BISWAS, S.; ROLAIN, J. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J. Microbiol. Methods*, v. 92, p.14-24, 2013.
- BITTON, G. Role of microorganisms in biogeochemical cycles. In: BITTON, G. *Wastewater microbiology*. 3.ed. New Jersey: Jonh Wiley & Sons, 2005. cap. 3, p. 75-105.
- BOTHE, H.; JOST, G.; SCHLOTTER, M.; *et al.* Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 24, p. 673-690, 2000.
- BOYD, C. E.; CLAY J. W. Evaluation of Belize aquaculture, Ltd: a Superintensive shrimp aquaculture system. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 2002, 17 p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011*. Brasília: MPA, 2013, 60p.
- BUGLIONE-NETO C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N. *et al.* Métodos para determinação da digestibilidade aparente de dietas para camarão marinho suplementadas com probiótico. *Pesq. Agropec. Bras.*, vol.48, n.8, p.1021-1027, 2013.

- BURFORD, M. A.; SELLARS, M. J.; ARNOLD, S. J.; *et al.* Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-density rearing systems. *Aquac. Res.*, v. 35, p. 508-515, 2004a.
- BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J; MCINTOSH, R. P. *et al.* Nutrient and microbial dynamics in high - intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, v. 219, p. 393-411, 2003.
- BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J; MCINTOSH, R. P. *et al.* The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. *Aquaculture*, v. 232, p. 525-537, 2004b.
- CAILLOUET, C. W. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp, *Penaeus duorarum* burkenroad. *Proc. Annu. World Maric. Soc.*, v. 3, p. 205-225, 1972.
- CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.*, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2011.
- CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K. *et al.* Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol.*, v. 16, n. 1, 157, 2016.
- CARVALHO, J. M. M.; PAULA NETO, F. L.; NASCIMENTO, F. O. T.; FEITOSA, R. A. *Perspectivas para o desenvolvimento da carcinicultura no nordeste brasileiro*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2005, 132 p.
- CECCALDI, H. J. *Anatomy and physiology of digestive tract of crustaceans decapods reared in aquaculture*. *Advances in tropical aquaculture*, Tahit. Feb 20-March 4, 1989. AQUACOP. IFREMER. Actes de Colloque 9, p. 243-259.
- CHAIYAPECHARA, S.; RUNGRASSAMEE, W.; SURIYACHAY, I.; *et al.* Bacterial Community Associated with the Intestinal Tract of *P. monodon* in Commercial Farms. *Microb. Ecol.*, v. 63, p. 938-953, 2012.
- CHAMBERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; MCINTOSH, R. P.; VELASCO, M. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N. I: nutrient transformation and water quality benefits. *Global Aquacult. Advocate*, v. 4, p. 53-56, 2001.
- CHAMBERLAIN, G.W. History of shrimp farming summarized from the shrimp book. *Global Aquacult. Advocate*, v. 14, n. 5, p. 29-31, 2011.
- CHAMBERLAIN, G.W.; GERVAIS, N.F. Comparison of unilateral eyestalk ablation with environmental control for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricult. Soc.*, v. 15, p. 29-30, 1984.
- CHARLIE, G.; BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 13, p. 790-801, 2013.
- CHEN, H.Y.; ZEIN-ELDIN, P.; ALDRICH, D.V. Combined effects of shrimp size and dietary protein source on the growth of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei*. *J. World Maricul. Soc.*, v. 6, p. 288-296, 1985.

- CHEN, L.; HU, M.; HUANG, L.; *et al.* Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *ISME J.*, v. 9, p. 1579-1592, 2015.
- CHEN, M.; LI, H.; LI, G.; ZHENG, T. Distribution of *Vibrio alginolyticus*-like species in Shenzhen coastal waters, China. *Braz. J. Microbiol.*, v.42, p. 884-896, 2011.
- COELHO, M. A. S. Análise de custo/volume/lucro e investimentos em carcinicultura de pequeno porte. *Custos e @gronegocio*, v. 1, n. 1, p. 62-84, 2005.
- CORNEJO-GRANADOS, F.; LOPEZ-ZAVALA, A. A., GALLARDO-BECERRA, L. Microbiome of Pacific whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between wild, aquacultured and AHPND/ EMS outbreak conditions. *Sci. Rep.*, v. 7, n. 1: 11783. Doi:10.1038/s41598-017-11805-w.
- CORREIA, E. S.; WILKENFELD, J. S.; MORRIS; *et al.* Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a bioflocdominated system. *Aquacult. Eng.*, v. 59, p. 48-54, 2014.
- CRAB, R., AVNIMELECH, Y., DEFOIRDT, T.; *et al.* Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, v. 270, p. 1-14, 2007.
- CRAB, R.; CHIELENS, B.; WILLE, M.; *et al.* The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquac. Res.*, v. 41, p. 559–567, 2010.
- CRUZ, P. M.; IBÁÑEZ, A. L.; HERMOSILLO, O. A.; SAAD, H. C. R. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, v.2012, p.1-13, 2012.
- CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; *et al.* Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, v.235, p.513-551, 2004.
- DECAMP, O.; CODY, J.; CONQUEST, L. *et al.* Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquacult. Res.*, v. 34, p. 345-355, 2003.
- DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; *et al.* Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J.*, v. 2, p. 9-26, 2008.
- DEMPSEY, A. C.; KITTING, C. L. Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. *Crustaceana*, v. 52, n. 1, p. 90-94, 1987.
- DHAR, A. K.; ROUX, M. M.; KLIMPEL, K. R. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *J. Virol. Methods*, v. 104, p. 69-82, 2002.
- EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, v. 257, p.346-358, 2006.
- EGIDIUS, E. Vibriosis: pathogenicity and pathology: a review. *Aquaculture*, v. 67, p. 15-28, 1987.

EKASARI, J.; ANGELA, D.; WALUYO, S. H.; *et al.* The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture*, v. 426-427, p. 105-111, 2014.

ELMAHDI, S.; DASILVA, L. V.; PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review. *Food Microbiol.*, v. 57, p. 128-134, 2016.

EMERENCIANO, M.; BALLESTER, E. L. C.; CAVALLI, R. O.; WASIELESKY, W. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquac Res.*, v. 43, p. 447-457, 2012.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. In: MATOVIC, M. D. (Ed.). *Biomass now – cultivation and utilization*. S.l.: InTech, 2013. cap. 12, p. 301-328. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-bft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-food-industry>>. Acessado em: 01 de fev. 2016.

EMONET, S.; SHAH, H. N.; CHERKAoui, A.; SCHRENZE, J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 16, p. 1604-1613, 2010.

ENGERING, A.; HOGERWERF, L.; SLINGENBERGh, J. Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerg. Microbes Infect.*, v. 2, n. 2, e5. 2013.

FAKRUDDIN, M.D.; MANNAN, K. S. B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Bio. Sci.*, v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

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

FELGENHAUER, B. E. Internal anatomy of the decapoda: an overview. In: HARRISON, F. W.; HUMES, A.G. (Ed). *Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod Crustacea*. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 45-75.

FERREIRA, M. G. P.; MELO, F. P.; LIMA, J. P. V.; *et al.* Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine shrimp culture with biofloc. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, v; 45, n. 1, p. 167-176, 2017.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Sanidade aquícola: certificação sanitária na aquicultura. *Panorama da Aquicultura*, v. 107, 2008. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/107/Sanidade107.asp>>. Acessado em: 04 mar. 2018.

FLEGEL, T. W.; NIELSEN, L.; THAMAVIT, V., *et al.* Presence of multiple viroses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*, v. 240, p. 55-68, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). WHO-Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAO yearbook: fishery and aquaculture statistics 2015. Rome: FAO, 2017a, 107p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Department. Statistics 1950-2015: online query panels. FAO. 2017b. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/topic/16140/en>>. Acessado em: 30 out. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Geneva: WHO, 2006, 107p.

FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A.; *et al.* 2011. Bacterial–fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 75, n. 4, p. 583-609, 2011.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 141, Suppl. 1, p. S15-28, 2010.

GAINZA, O.; RAMÍREZ, C.; RAMOS, A. S.; ROMERO, J. Intestinal microbiota of white shrimp *Penaeus vannamei* under intensive cultivation conditions in Ecuador. *Microb. Ecol.*, 2017. Doi 10.1007/s00248-017-1066-z.

GANESH, E. A.; DAS, S.; CHANDRASEKAR, K.; *et al.* Monitoring of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in aquaculture pond. *Curr. Res. J. Biol. Sci.*, v. 2, n. 1, p. 48-52, 2010.

GANJOOR, M. S. A short review on infectious viruses in cultural shrimps (Penaeidae Family). *Fish. Aquac. J.*, v. 6, n. 3, 1000136, 2015. doi: 10.4172/2150-3508.1000136.

GAO, W.; NAVARROLI, D.; NAIMARK, J.; *et al.* Microbe observation and cultivation array (MOCA) for cultivating and analyzing environmental microbiota. *Microbiome*, v. 1: 4, 2013. doi: 10.1186/2049-2618-1-4.

GAO, X.; LIU, Y.; MIAO, L. *et al.* Mechanism of anti-*Vibrio* activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express.*, v. 7:23, 2017.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p.147-165, 1999.

GIBSON, R.; BARKER, P. L. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, v. 17, p. 285-346, 1979.

GILDEMEISTER, O. S.; ZHU, B. C. R.; LAINE, R. A. Chitovibrin: a chitin-binding lectin from *Vibrio parahemolyticus*. *Glycoconjugate J.*, v. 11, n. 6, p. 518-526, 1994.

GILLILLAND, M. G. 3rd; ERB-DOWNWARD, J. R.; BASSIS, C. M.; *et al.* Ecological succession of bacterial communities during conventionalization of germ-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, p. 2359-2366, 2012.

GODOY, L. C.; ODEBRECHT, C.; MARTIN, T. G.; *et al.* Tecnologia de bioflocos: criação sustentável de camarões marinhos, In: CYRINO, J. E. P.; FURUYA, W. M.; RIBEIRO, R. P.; FILHO SCORVO,

J. D. (eds.). *Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura III*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2010. cap. 23, p. 227-236.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, v. 191, p. 259-270, 2000.

GOMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A. *et al.* Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 163, p. 1-9, 1998.

GOODMAN, A. L.; KALLSTROM, G.; FAITH, J. J.; *et al.* Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 108, n. 15, p. 6252-6257, 2011.

GUERRELHAS, A. C. B. Shrimp hatchery development in Brazil: successful history of seedstock production. *Global Aquacult. Advocate*, April, p. 67-70, 2003.

GUO, J.; LIU, K.; CHENG, S.; *et al.* Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquacult. Res.*, v. 40, p. 609-618, 2009.

HAN, J. E.; TANG, K. F.; TRAN, L. H.; LIGHTNER, D. V. *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ.*, v. 113, n. 1, p. 33-40, 2015.

HARGREAVES, J. A. *Biofloc production systems for aquaculture*. SRAC Publication, n. 4503, p. 1-11, 2013. Disponível em: [http://aquaculture.ca.uky.edu/sites/aquaculture.ca.uky.edu/files/srac\\_4503\\_biofloc\\_production\\_systems\\_for\\_aquaculture.pdf](http://aquaculture.ca.uky.edu/sites/aquaculture.ca.uky.edu/files/srac_4503_biofloc_production_systems_for_aquaculture.pdf). Acessado em: 01 jan. 2017.

HARGREAVES, J.A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacult. Eng.*, v. 34, p. 344-363, 2006.

HARRIS, J. M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.*, v. 25, p.195-231, 1993.

HEENATIGALA, P. P. M.; FERNANDO, M. U. L. Occurrence of bacteria species responsible for vibriosis in shrimp pond culture systems in Sri Lanka and assessment of the suitable control measures. *Sri Lanka J. Aquat. Sci.*, v. 21, n. 1, p. 1-17, 2016.

HEIDELBERG, J. F.; HEIDELBERG, K. B.; COLWELL, R. R. Bacteria of the gammasubclass proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 5498-5507, 2002.

HEINZEL, H. G. Gastric mill activity in the lobster. I. Spontaneous modes of chewing. *J Neurophysiol.*, v. 59, p. 528-550, 1988.

HEINZEL, H. G.; WEIMANN, J. M.; MARDER, E. The behavioral repertoire of the gastric mill in the crab, *Cancer pagurus*: an *in situ* endoscopic and electrophysiological examination. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 1793-1803, 1993.

HOLTHUIS, L. B. FAO species catalogue. *Shrimp and prawns of the world*. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. Rome: FAO. 1980. v. 1, 235p.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 10, p. 159-169, 2010.

HOPKIN, S. P.; NOTT, J. A. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, v. 60, 891-90, 1980.

HOPKINS, J. S.; SANDIFER, P. A.; BROWDY, C. L. Effect of two protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. *J. World Aquac. Soc.*, v. 26, p. 93-97, 1995.

HOULIHAN, D. F.; WARING, C. P.; MATHERS, E.; GRAY, C. Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiol. Zool.*, v. 63, n. 4, p. 735-756, 1990.

HUANG, Z.; LI, X.; WANG, L.; SHAO, Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.*, v. 47, p. 1737-1746, 2014.

HUANG, Z.; LI, X.; WANG, L.; SHAO, Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.*, v. 47, p. 1737-1746, 2016.

HUGON, P.; LAGIER, J. C.; ROBERT, C.; *et al.* Molecular studies neglect apparently Gram negative populations in the human gut microbiota. *J. Clin. Microbiol.*, v. 51, n. 10, p. 3286–3293, 2013.

ICELY, J. D.; NOTT, J. A. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In: HARRISON, F. W.; HUMES, A. G. (Ed.) *Microscopic anatomy of the invertebrates*. New York: Wiley, 1992, p. 147-201.

IGNYŚ, I.; SZACHTA, P.; GAŁĘCKA, M.; *et al.* Methods of analysis of gut microorganism – actual state of knowledge. *Ann. Agric. Environ. Med.*, v.21, n. 4, p. 799-803, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Produção da pecuária municipal 2016*. Rio de Janeiro: IBGE, 2016, v. 44, p. 24-38.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Gráficos. Estação Sete Lagoas (MG). 2017. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf)>. Acessado em 20 dez.2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 7889:2003*. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms – colony-count technique at 37°C. 2003. 11p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 21872-1:2017*. Microbiology of the food chain – horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. - part 1: detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Vernier, 2017. 33p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 6887-1:2017*. Microbiology of the food chain – preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Vernier, 2017. 26p.

JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; SILVA, J. S. Protein levels for *Litopenaeus vannamei* in semi-intensive and biofloc systems. *Aquaculture*, v. 432, p. 365-371, 2014.

JOHNSON, C. N.; BARNES, S.; OGLE, J.; *et al.* Microbial community analysis of water, foregut, and hindgut during growth of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in closed-system aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 39, n. 2, p. 251-258, 2008.

KAPAREIKO, D.; LIM, H. J.; SCHOTT, E. J.; *et al.* Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries: II. effects of a *Vibrio* sp. probiotic candidate upon survival of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) in pilot-scale trials. *J. Shellfish Res.*, v. 30, n. 3, p. 617-625, 2011.

KASAN, N. A.; GHAZALI, N. A.; IKHWANUDDIN, M.; IBRAHIM, Z. Isolation of potential bacteria as inoculum for biofloc formation in pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* culture ponds. *Pak. J. Biol. Sci.*, v. 20, n. 6, p. 306-313, 2017.

KASPAR, C. W.; TAMPLIN, M. L. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, n. 8, p. 2425-2429, 1993.

KELLY, M. T. Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Beneckeia) vulnificus* occurrence in a Gulf Coast environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, n. 4, p. 820-824, 1982.

KENT, D. J.; CHAUHAN, K.; BOORJ, K. J. *et al.* Spore test parameters matter: mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. *J. Dairy Sci.*, v. 99, n. 7, 2016.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, v.274, p.1-14, 2008.

KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 3, p. 1641-1650, 2004.

KING, J. E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull.*, v. 94, p. 244-262, 1948.

KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 39, p.91-100, 2002.

KITANI, H. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* (BOONE) reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, v. 52, n. 7, p. 1131-1139, 1986.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 32, p. 170-177, 2012.

KRUMMENAUER, D.; LARA, G.; FÓES, G.; *et al.* Sistema de bioflocos: é possível reutilizar a água por diversos ciclos? *Panorama da Aquicultura*, v. 136, p. 40-47, 2013.

KRUMMENAUER, D.; SAMOCHA, T.; POERSCH, L.; *et al.* The reuse of water on the culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in BFT system. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 45, p. 3-14, 2014.

KRUMMENAUER, D.; SEIFFERT JÚNIOR, C. A.; POERSCH, L. H. *et al.* Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. *Atlântica*, v.34, n. 2, p. 103-111, 2012.

KUBITZA, F. Criação de tilápias em sistema com bioflocos sem renovação de água. *Panorama da Aquicultura*, v. 21, n. 125, p. 14-23, 2011.

KUMAR, B. K.; DEEKSHIT, V. K.; RAJ, J. R. M.; *et al.* Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquaculture*, v. 433, p. 247-251, 2014.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A. *et al.* A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, v. 72, n. 4, p. 557-578, 2008.

KURESHY, N.; DAVIS, D. A. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific White shrimps, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 204, ed. 1 – 2, p. 125 – 143, 2002.

LAGIER, J.C.; HUGON, P.; KHELAIPIA, S.; *et al.* The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 28, p. 237-264, 2015.

LAU, J. T.; WHELAN, F. J.; HERATH, I.; *et al.* Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med.*, v. 8:72, 2016.

LARA, G.; KRUMMENAUER, D.; POERSCH, L. H.; WASIELESKY, W. JR. Sistema de bioflocos: processos de assimilação e remoção de nitrogênio. *Panorama da Aquicultura*, 2013. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=1881>>. Acessado em: 01 mar. 2018.

LAY, J. O. JR. MALDI-TOF Mass spectrometry of bacteria. *Mass. Spectrom. Rev.*, v. 20, n. 4, p. 172-194, 2001.

LAYCOCK, G.; SAIT, L.; INMAN, C.; *et al.* A defined intestinal colonization microbiota for gnotobiotic pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 149, p. 216-224, 2012.

LENOCH, R. *Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo a síndrome de taura e a doença da mancha branca*. 2004. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

- LI, E. C., CHEN, L. Q.; ZENG, C., *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. *Aquaculture*, v. 265, 385-390, 2007.
- LIAO, I. C.; CHIEN, Y. The Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Asia: the world's most widely cultured alien crustacean. In: GALIL, B.S. *et al.* (eds.). *In the wrong place-alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts, invading nature*. Dordrecht: Springer, 2011. v. 6, p 189-519.
- LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, v. 164, 201-220, 1998.
- LIN, Y.; CHEN, J. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 259, 109-119, 2001.
- LIU, C. H. CHIU, C. S.; HO, P. L.; WANG, S. W. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.*, v. 107, p. 1031-1041, 2009.
- LIU, H.; LI, Z.; TAN, B.; *et al.* Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 41, n. 2, p. 300–307, 2014.
- LIU, H.; WANG, L.; LIU, M.; *et al.* The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture*, v. 317, p. 32-36, 2011.
- LORENZO, M. A. *Tecnologia de bioflocos na larvicultura do camarão Litopenaeus vannamei*. 2016. 93f. Tese (Doutorado em Aeuicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- LOTZ, J. M. Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 13, p. 405-413, 1997.
- LOVETT, D. L., FELDER, D. L. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). *J. Morphol.*, v. 201, p. 253-272, 1989.
- LOVETT, D. L., FELDER, D. L. Ontogeny of kynamics in the gut of the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae). *J. Crustac. Biol.*, v. 10, p. 53-68, 1990.
- LUIS-VILLASEÑOR, I. E.; VOLTOLINA, D.; GOMEZ-GIL, B. *et al.* Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, v. 43, n. 4, p. 766-775, 2015.
- MA, H.; OVERSTREET, R. M, JOVONOVICH, J. A. Stable yellowhead virus (YHV) RNA detection by qRT-PCR during six-day storage. *Aquaculture*, v. 278, p. 10-13, 2008.
- MAEDA, M.; SHIBATA, A.; BISWAS G.; *et al.* Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Mar. Biotechnol.*, v. 16, n. 2, p.181-192, 2014.

- MAICÁ, P. F.; BORBA, M. R.; WASIELESKY, W. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water exchange superintensive system. *Aquacult. Res.*, v. 43, p. 361-370, 2012.
- MANTEL, L. H.; FARMER, L. L. Osmotic and ionic regulation. In: MANTEL, L. H. (Ed.), *The Biology of Crustacea: internal anatomy and physiological regulation*. New York: Academic Press, 1983. cap. 2, p. 53-161.
- MARTIN, G. G.; SIMCOX, R.; NGUYEN, A.; CHILINGARYAN, A. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability. *Biol. Bull.*, v. 211, p. 275-285, 2006.
- MATAMOROS, S.; GRAS-LEGUEN, C.; LE VACON, F.; *et al.* Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.*, v. 21, n. 4, p. 167-173, 2013.
- MCFALL-NGAIA, M.; HADFIELD, M. G.; BOSCH, T. C. G.; *et al.* Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 110, p. 3229-3236, 2013.
- McGRAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. *J. Comp. Physiol. B.*, v. 183, p. 443-465, 2013.
- McGRAW, W.; TEICHERT-CODDINGTON, D. R.; ROUSE, D. B.; BOYD, C. E. Higher minimum dissolved oxygen concentrations increase penaeid shrimp yields in earthen ponds. *Aquaculture*, v. 199, p. 311-321, 2001.
- MCINTOSH, D.; SAMOCHA, T. M.; JONES, E. R.; *et al.* The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquacult. Eng.*, v. 21, p. 215-227, 2000.
- MCNEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. *Global Aquacult. Advocate*, p. 72-76, 2000. Disponível em: <http://pdf.gaalliance.org/pdf/GAA-McNeil-June00.pdf>. Acessado em: 10 jan. 2017.
- MENDES, E. S.; LIRA, S. F.; GÓES, L. M. N. B. *et al.* *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. *Ci. Anim. Bras.*, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.
- MENTE, E.; LEGEAY, A.; HOULIHAN, D. F.; MASSABUAU, J. C. Influence of oxygen partial pressure on protein synthesis in feeding crabs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 284, p. R500-R510, 2003.
- MEZITI, A.; MENTE, E.; KORMAS, K. A. Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 35, p. 473-482, 2012.
- MIMICA, M. J.; MARTINO, M. D. V.; PASTERNAK, J. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 49, n. 4, p. 256-259, 2013.
- MONTGOMERY, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, n. 12, p. 4284-4288, 1994.

MONTGOMERY, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.; 59, n. 2, p. 373- 379, 1993.

MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: BELL, C. R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. (Eds). *Microbial Biosystems: new Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology* Halifax: 1999. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Disponível em: <[https://cals.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia\\_shrimp/moriarty.PDF](https://cals.arizona.edu/azaqua/tilapia/tilapia_shrimp/moriarty.PDF)>. Acessado em: 20 dez. 2017.

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. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 31, n. 2, p. 255-263, 2000.

MOTES, M. L.; DEPAOLA, A.; COOK, D. W.; *et al.* Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 4, p. 1459-1465, 1998.

NAFIQOH, N.; CHANG, P.; WANG, Y. The effect of feeding *Lactobacillus* on growth, survival rate and protease activity of *Litopenaeus vannamei*. *Indon. Aquacult. J.*, v. 6, n. 2; p. 141-147, 2011.

NATORI, M. M.; SUSSEL, F.R.; SANTOS, E. C. B.; *et al.* Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. *Informações econômicas*, v. 41, n. 2, p. 61-73, 2011.

NEIVA, G. S.; SANTOS, E. P.; JANKAUSKIS, V. Análise preliminar da população de camarão legítimo *Penaeus schmitti*, Bukerroad, 1936, na Baía de Santos – Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, v. 1, n. 2, p. 7-14, 1971.

NIMRAT, S.; SUKSAWAT, S.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet. Microbiol.*, v. 159, p. 443-450, 2012.

NUNAN, L.; LIGHTNER, D.; PANTOJA, C.; GOMEZ-JIMENEZ, S. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Organ.*, v 111, p. 81-86, 2014.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. *Panorama da Aquicultura*, v. 12, n. 72, p. 23-33, 2002.

NURHIDAYU, A.; INA-SALWANY, M. Y.; DAUD, H. M.; HARMIN, A. S. Isolation, screening and characterization of potential probiotics from farmed tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 6, n. 9, p. 1924-1933, 2012.

OLAFSEN, J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, v. 200, p. 223-247, 2001.

OLIVEIRA, A. C. D. G. *Bactérias heterotróficas e autotróficas envolvidas na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário em reator de leito móvel*. 2012. 124f. Dissertação (Mestrado em Edificações e Saneamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

- OXLEY, A. P. A.; SHIPTON, W.; OWENS, L.; MCKAY, D. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 93, p. 214-223, 2002.
- PARVATHI, A.; KUMAR, H. S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters from two estuaries along the Southwest Coast of India, using molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 11, p. 6909-6913, 2004.
- PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *B. Inst. Pesca*, v. 31, n. 1, p. 81-88, 2005.
- PEREIRA, L. V. *Perfil sanitário da carcinicultura do nordeste brasileiro segundo a percepção dos técnicos responsáveis*. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. *Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world*. Keys and diagnoses for the families and genera. Paris: Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, 1997. v.175, 233p.
- PÉREZ-ROSTRO, C. I.; PÉREZ-FUENTES, J. A.; HERNÁNDES-VERGARA, M.P. Biofloc, a technical alternative for culturing malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii*. In: HERNÁNDES-VERGARA, M.P.; PÉREZ-ROSTRO, C. I. (Eds.). *Sustainable aquaculture techniques*. S.l.: InTech, 2014. cap. 3, p. 87-104.
- PERRY, J. D.; FREYDIÈRE, A. M. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J. Appl. Microbiol.*, v. 103, p. 2046-2055, 2007.
- PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C.; *et al.* Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infections with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 290, p. 61-68, 2009.
- PONCE-PALAFIX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; ROSS, L. G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, v. 157, p. 107-115, 1997.
- PRIEUR, D.; MÉVEL, G.; NICOLAS, J. L.; *et al.* Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 28: 277-352, 1990.
- QIAO, F.; LIU, Y. K.; SUN, Y. K.; *et al.* Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquacult. Nutr.*, 2016. Doi:10.1111/anu.12412.
- QUEIROZ, J. F.; BOEIRA, R. C. *Boas práticas de manejo (BPMs) para reduzir o acúmulo de amônia em viveiros de aquicultura*. Jaguariúna: Embrapa, 2007. 5p
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Eckert *Fisiologia animal: mecanismos e adaptações*. 4 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2000. 764p.
- RAY, A. Biofloc technology for super-intensive shrimp culture. In: AVNIMELECH, Y. (Ed.). *Biofloc Technology - a practical guide book*, 2ed., Baton Rouge, Louisiana: The World Aquaculture Society, 2012. cap. 13, p. 167-188.

RAY, A. J.; SEABORN, G.; LEFFER, J. W.; *et al.* Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture*, v. 310, p. 130-138, 2010.

RESENDE, M. F. S. *Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas*. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de produtos de Origem Animal) - Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RETTEDAL, E. A.; GUMPERT, H.; SOMMER, M. O. A. Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria. *Nat. Commun.*, 2014 Aug 28;5:4714. doi: 10.1038/ncomms5714.

ROBERTSON, P. A. W.; CALDERON, J.; CARRERA, L.; *et al.* Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Organ.*, v. 32, p. 151-155, 1998.

ROCHA, I. P.; ROCHA, D. M. *Análise da produção e do mercado interno e externo do camarão cultivado*. Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2011. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/analise-da-producao/>>. Acessado em: 08 fev. 2016.

RUNGRASSAMEE W.; KLANCHUI A.; MAIBUNKAEW S.; *et al.* Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoSOne*, v. 9, e91853. doi:10.1371/journal.pone.0091853, 2014.

RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; CHAIYAPECHARA, S.; *et al.* Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PLoSOne*, v. 8, e60802. doi: 10.1371/journal.pone.0060802, 2013.

RUSSELL, H, (ed). Bacterial taxonomy: na integrated study. In: \_\_\_\_\_. *Introduction to bacteriology*. New York: Library Press, 2017. cap. 2, p. 24-48.

SAMOCHA, T. M.; LAWRENCE, A. L.; BRAY, W. A. Design and operation of an intensive nursery raceway system for penaeid shrimp. In: CRC Handbook of Mariculture Crustacean. *Aquaculture*, v. 1, ed. 2, p. 173–210, 1993.

SANTOS, V. S. Organismos autotróficos e heterotróficos. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/organismos-autotrofos-heterotrofos.htm>>. Acessado em: 01 mar. 2018.

SANTOS, A. F.; CAYÔ, R.; SCHANDERT, L.; GALES, A. C. Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 49, n. 3, p. 191-197, 2013.

SANTOS, E. C. B.; PESSOA, M. N. C.; MENDES, P. P. Efeito das técnicas de povoamento no desempenho produtivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Bras. Eng. Pesca*, v. 9, n. 1, p. 77-88, 2016.

SCHLOSS, P. D.; GIRARD, R. A.; MARTIN, T.; *et al.* Status of the archaeal and bacterial census: an update. *mBio*, v. 7, n. 3, 2016. e00201-16. doi:10.1128/mBio.00201-16.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E. H.; VERRETH, J. A. J. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. *Aquaculture*, v. 261, p. 1239-1248, 2006.

SCHÖTTNER, S.; HOFFMANN, F.; CÁRDENAS, P.; *et al.* Relationships between host phylogeny host type and bacterial community diversity in cold-water coral reef sponges. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, e55505. 2013. doi.org/10.1371/journal.pone.0055505.

SCHRYVER, P. D.; CRAB, R.; DEFOIRDT, T. *et al.* The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, v. 277, p. 125-137, 2008.

SCHRYVER, R. *Efeito dos sólidos suspensos totais na água e dos substratos artificiais sobre o cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com bioflocos.* 2012. 134f. Tese (doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

SCHWOCHOW, R. Q.; ZANBONI, A. J. O estuário de Lagoa dos Patos: um exemplo para o ensino ecológico no nível médio. *Cad. Biol. Aquat.*, v. 2, n. 2, p. 13-27, 2007.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.*, v. 90, p. 859-904, 2010.

SHA, Y.; LIU, M.; WANG, B.; *et al.* Bacterial population in intestines of *Litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, n. 10, p. 1736-1745, 2016.

SHAKIBAZADEH, S.; ROOS, S. C.; HAFEZIEH, M.; *et al.* A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. *Iran. J. Fish. Sci.*, v. 11, n. 4, 849-866, 2012.

SHAKIBAZADEH, S.; SAAD, C.; CHRISTIANUS, A.; KAMARUDIN, M.; *et al.* Bacteria flora associated with different body parts of hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*, tanks water and sediment. *Ann. Microbiol.*, v. 59, p. 425-430, 2009.

SHAKYA, M.; GOTTEL, N.; CASTRO, H.; *et al.* A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* Trees. *PLoS ONE*, v. 8 n. 10, e76382, 2013.

SHARMILA, R.; ABRAHAM, T. J.; SUNDARARAJ, V. Bacterial flora of semi-intensive pond-reared *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) and the environment. *J. Aquacult. Trop.*, v.11, p. 193-203, 1996.

ShEST. Shrimp EST Genome Project. *O cultivo do camarão marinho*. Disponível em: <<http://www.shrimp.ufscar.br/historico/cultivo.php>>. Acessado em: 04 mar. 2018.

SHIAU, S. Y. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*, v. 164, p. 77-93, 1998.

SILVA, K. R.; WASIELESKY JR. W.; ABREU, P. C. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, v. 44, p. 30-41, 2013.

SIMÕES, N.; JONES, D.; SOTO-RODRÍGUEZ, S.; *et al.* Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones Peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. In: CRUZ SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; *et al.* (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola*, VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. ISBN: 970-694090-1. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México, p. 243-275, 2002.

SIVAGNANA VELMURUGAN, M.; RAMNATH, G. K.; THADDAEUS, B. J.; *et al.* Effect of *Sargassum wightii* fucoidan on growth and disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon* post-larvae. *Aquacult. Nutr.*, 2015. doi: 10.1111/ anu. 12217.

SMITH, P. M.; HOWITT, M. R.; PANIKOV, N.; *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T<sub>reg</sub> cell homeostasis. *Science*, v. 341, p. 569-573, 2013.

SOONTHORNCHAI, W.; CHAIYAPECHARA, S.; JARAYABHAND, P. *et al.* 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.

SUÁREZ, J. E. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr. Hosp.*, v. 28, Suppl. 1, p. 38-41, 2013.

SULLAM, K. E.; ESSINGER, S. D.; LOZUPONE, C. A.; *et al.* Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Mol. Ecol.*, v. 21, 13, 2012. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05552.x.

SUNG, H.; HSU, S.; CHEN, C., *et al.* Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture*, v. 192, p. 101-110, 2001.

SUNG, H.; LI, H. C.; TSAI, F. M.; *et al.* Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 236, n. 2, p. 261-271, 1999.

SWAPNA, B.; VENKATRAYULU, C.; SWATHI, A. V. Effect of probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus rhamnosus* on growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Eur. J. Exper. Biol.*, v. 5, n. 11, p. 31-36, 2015.

TACON, A. G. J.; CODY, J. J.; CONQUEST, L. D.; *et al.* Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquac. Nutr.*, v. 8, p. 121-137, 2002.

TAHIM, E. F. *A carcinicultura e o meio ambiente: o desafio da sustentabilidade*. Fortaleza: Instituto Centec, 2008. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/1232.pdf>>. Acessado em: 09 fev. 2016.

TALL, A.; HERVIO-HEATH, D.; TEILLON, A.; *et al.* Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyrH sequencing. *J. Appl. Microbiol.*, v. 114, p. 1713-1724, 2013.

- TANG, K. W.; TURK, V.; GROSSART, H. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, v. 61, p. 261-277, 2010.
- TANG, Y.Y.; TAO, P.Y.; TAN, J.G.; *et al.* Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 15, n. 8, p. 13663-13680, 2014.
- THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.*, v. 68, n. 3, p. 403-431, 2004a.
- THOMPSON, J. R.; RANDA, M. A.; MARCELINO, L. A.; *et al.* Diversity and dynamics of a north Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 7, p. 4103-4110, 2004b.
- TISON, D. L.; KELLY, M. T. *Vibrio* species of medical importance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 2, p. 263-276, 1984.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. *Rev. Virtual Quim.*, v. 3, n. 2, p. 78-87, 2011.
- TREECE, G. D. Shrimp culture. In: STICKNEY, R. R. *Encyclopedia of Aquaculture*. New York: John Wiley e Sons, Inc. 2000, p. 798-868.
- TREECE, G. D.; YATES, M. E. *Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae*. Texas: A&M University, 1988, 104p.
- 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*). *Springerplus*, v. 3:280, 2014. doi: 10.1186/2193-1801-3-280. eCollection.
- UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION (UNESCO). Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission, 1983. 53p.
- URAKAWA, H.; RIVERA, I. N. G. Aquatic environment. In: THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds.). *The biology of vibrios*. Washington: ASM Press, 2006. cap. 12, p. 175-189.
- VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water quality requirements and management. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M.; LARAMORE, R. *et al.* *Farming marine shrimp in recirculating freshwater system*. Harbor Branch Oceanographic Institution. 1999. cap. 8, p. 141-161
- VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-ARZARENA, R. *et al.* Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, n. 6, p. 2592-2597, 1999.
- VELASCO, M.; LAWRENCE, A. L.; CASTILLE, F. L.; OBALDO, L. G. Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIASALAZAR, M.; *et al.* (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V*. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola: Mérida, Yucatán, México, 19-22 nov. 2000, p. 181-192.

- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.64, n.4, p.655-671, 2000.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.64, n.4, p.655-671, 2000.
- VIDAL, J. M. A. *Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino de camarão marinho Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)*. 2015. 80f. Tese (Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; MOURIÑO, J. P. L.; *et al.* Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, n. 3, p. 631, 638, 2010.
- VIEIRA, F.N. *Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha*. 2010. 133f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v.47, n.2, p.110-118, 2001.
- WASIELESKY, W. JR.; ATWOOD, H.; STOKES, AL.; BROWDY, C. L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 258, p. 396-403, 2006.
- WEN, C.; XUE, M.; LIANG, H.; DONG, J. Biases on community structure during DNA extraction of shrimp intestinal microbiota revealed by high-throughput sequencing. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v. 56, n. 1, p. 130-142, 2016.
- WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62p. 2273– 2278, 1996.
- WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. *PLoS Comput Biol.*, v. 26, n. 6, 2010. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000667.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Office International des Epizooties. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis. In: OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris, 2015a. cap. 2.2.2, p. 1-20.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Office International des Epizooties. Infectious myonecrosis. In: OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris, 2012b. cap. 2.2.3, p. 138-147.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Office International des Epizooties. Necrotising Hepatopancreatitis. In: OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris, 2015c. cap. 2.2.4, p. 1-12.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Office International des Epizooties. Taura Syndrome. In: OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris, 2015b. cap. 2.2.5, p. 1-17.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Office International des Epizooties. White spot disease. In: OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris, 2012a. cap. 2.2.6, p. 177-190.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Office International des Epizooties. Yellow Head Disease. In: OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. Paris, 2012c. cap. 2.2.8, p. 204-217.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH -OIE. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>. Acesso em: 10 jan. 2018.

WRIGHT, A. C.; HILL, R. T.; JOHNSON, J. A. *et al.* Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 2, p. 717-724, 1996.

XIONG, J.; ZHU, J.; DAI, C. D.; *et al.* Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. *Environ. Microbiol.*, v. 19, n. 4, p. 1490-1501, 2017.

XU, W.; MORRIS, T. C.; SAMOCHA, T. M. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*, v. 453, 169-175, 2016.

YANBO, W.; ZIRONG, X.; XUXIA, Z.; MEISHENG, X. Bacteria attached to suspended particles in Northern white shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. *Aquaculture*, v. 249, p. 285-290, 2005.

YASUDA, K.; KITAO, T. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, v. 19, p. 229-234, 1980.

ZENG, S.; HUANG, Z.; HOU, D.; *et al.* Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *PeerJ*, v. 5, p. e3986, 2017. Doi 10.7717/peerj.3986.

ZHANG, H.; SUN, Z.; LIU, B. *et al.* Dynamic changes of microbial communities in *Litopenaeus vannamei* cultures and the effects of environmental factors. *Aquaculture*, v. 455, p. 97-108, 2016.

ZHANG, M.; SUN, Y.; CHEN, K. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, v. 434, p. 449-455, 2014.

ZHOU, J.; FANG, W.; YANG, X.; *et al.* A Nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “bacterial white tail disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *Plos One*, v. 7, n. 2, e29961. 2012.

ZHU, D. C.; TANABE, S. H., YANG, C.; *et al.* Bacterial community composition of South China Sea sediments through pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e78501, 2013. doi.org/10.1371/journal.pone.0078501.

ZOETENDAL, E. G.; CHENG, B.; KOIKE, S.; MACKIE, R. I. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, v. 5, p. 31-48, 2004.