

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA**

**AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA DE *Lactobacillus* B6 NO TRATO INTESTINAL DE
CAMARÕES MARINHOS (*Litopenaeus vannamei*) E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA**

FELIPE DO NASCIMENTO VIEIRA

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação Aqüicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de mestre em aqüicultura.

Orientador: Dr. Luis A. Vinatea

Coorientadora: Dr^a. Margherita A. Barracco

FLORIANÓPOLIS

2006

Eng^o agrônomo Vieira, Felipe do Nascimento,

Avaliação do tempo de permanência de *Lactobacillus* B6 no trato intestinal de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e sua relação com a resposta imunológica. -2006, F. tabs., grafs.

Orientador: Luis Alejandro Vinatea

Dissertação de Mestrado em Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Probiótico, 2. contagem total de hemócitos, 3. fenoloxidase, 4. flora intestinal, 5. vibriose, 6. *Vibrio harveyi*.

Avaliação do tempo de permanência de *Lactobacillus* B6 no trato intestinal de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e sua relação com a resposta imunológica.

Por

FELIPE DO NASCIMENTO VIEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana - *Orientador*

Dra. Cristina Ramirez Toro

Dr. Elpídio Beltrame

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luis Alejandro Vinatea Arana pela orientação durante a realização do mestrado e por todas as oportunidades que me ofereceu;

A professora Margherita Barracco pelos preciosos ensinamentos na cativante arte da imunologia de invertebrados;

Ao professor e amigo Elpídio Beltrame por toda a confiança em mim depositada e por todo o empenho que tornou possível a realização do trabalho aqui apresentado,

A professora e amiga Cristina Ramirez, pelos ensinamentos em microbiologia e bactérias lácticas,

Ao professor Maurício Laterça Martins, pela paciência durante a realização do experimento no Laboratório de Patologia,

A professora Carla Bonetti por disponibilizar os equipamentos para realização da dosagem de proteínas e atividade da enzima fenoloxidase;

Aos meus pais, Rogério Alano Vieira e Eloisa do Nascimento Vieira e a minha irmã Leila do Nascimento Vieira, por todo o amor e confiança que demonstram sentir;

A Eloysa Caroline Oliveira, pelo carinho, amor e paciência durante a todos os finais de semana que não pude dar atenção para ela durante o mestrado;

Aos amigos do Setor de microbiologia José Mouriño, Celso Buglione Neto, Adolfo Jatobá e Fabiola Pedrotti que tanto me auxiliaram,

Ao amigo Delano Dias Schleder pela ajuda nas análises imunológicas,

Aos funcionários e Bolsistas do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC pela prestatividade;

Em fim, a todos que ajudaram de alguma forma na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos _____	4
Sumário _____	5
Lista De figuras _____	7
Lista de abreviaturas _____	8
Resumo _____	10
Abstract _____	11
Introdução _____	12
As doenças causadas por <i>Vibrio sp.</i> _____	13
A resposta imune em crustáceos: _____	14
Hemograma _____	15
Sistema Fenoloxidase (PO) _____	16
Definição de probióticos _____	17
Bactérias Lácticas _____	18
Isolamento de bactérias probióticas _____	18
Probióticos na Carcinicultura _____	22
Objetivo _____	23
Formatação do Artigo _____	23
Artigo: TEMPO DE ATUAÇÃO DO <i>Lactobacillus B6</i> NA FLORA BACTERIANA INTESTINAL DE <i>Litopenaeus vannamei</i> E SUA RELAÇÃO COM A CONTAGEM TOTAL DE HEMÓCITOS E A ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE FRENTE À INFECÇÃO POR <i>Vibrio harveyi</i> _____	24
Resumo _____	25
Abstratct _____	26
Introdução _____	27
Material e métodos _____	28
Material biológico e preparação do inóculo _____	28
Preparo da dieta _____	28
Condições experimentais _____	29
Coleta da hemolinfa para avaliação dos hemogramas, avaliação microbiológicas e preparação do soro _____	29
Avaliação da microbiologia do trato digestivo e da hemolinfa _____	29
Contagem total de hemócitos (THC) _____	30
Concentração de proteína no soro _____	30
Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro _____	30
Análises estatística _____	30
Resultados _____	31
Microbiologia do trato digestivo _____	31
Presença de bactérias na hemolinfa _____	31
Contagem total de hemócitos (THC) _____	31

Atividade da enzima fenoloxidase (PO)	32
Discussão	35
Conclusão	37
Agradecimentos	37
Referencia	38
Referencias da introdução	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Flutuação na população de bactérias de um tanque de larvicultura pela utilização de um antibiótico. (adaptada de MAEDA, et al., 1997). _____ 13
- Figura 2:** Mecanismo de ação da fenoloxidase com os principais passos da formação da melanina a partir de compostos fenólicos, PO: enzima fenoloxidase (adaptado de NAPPI e VASS, 2003). _____ 17
- Figura 3:** Isolamento de bactérias do trato digestivos de camarões _____ 20
- Figura 4:** Protocolo para o teste de bactérias isoladas candidatas a probióticos. _____ 21
- Figura 5:** Contagens microbiológicas do trato digestivo dos camarões após a substituição do fornecimento de alimentação suplementada com probióticos por ração sem probióticos (probiótico) e do trato digestivo dos camarões alimentados com ração sem a adição de probióticos (controle): a) bactérias totais em Agar Marine, b) vibrio e enterobactérias totais em Agar TCBS e c) bactérias lácticas totais em Agar MRS. Cada ponto representa a média de 4 pools de 3 camarões \pm EP. _____ 33
- Figura 6:** Contagem total de hemócitos (a) e atividade da enzima fenoloxidase (b) 3 horas após a injeção de *V. harveyi* e solução salina 1,5% estéril em camarões após a retirada da alimentação suplementada com probióticos e de camarões alimentados com ração sem a adição de probióticos. PS: alimentado com probiótico e inoculado com solução salina; PV: alimentado com probiótico e inoculado com *V. harveyi*; CS: alimentado com ração sem adição de probióticos e inoculado com solução salina estéril; CV: alimentado com ração sem adição de probióticos e inoculado com *Vibrio harveyi*. Cada ponto representa a média de 4 pools de 3 camarões \pm EP. _____ 34

Lista de abreviaturas

- BGBP - β -1,3-glucan binding proteins, proteínas de reconhecimento de β -1,3 – glucanos
- BHI – Brain Heart Infusion, Infusão de Coração e Cérebro
- C – tratamento controle
- CaCl₂ – cloreto de cálcio
- CS – controle inoculado com solução salina
- CV – controle inoculado com *V. harveyi*
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DP – desvio padrão da média
- EP – erro padrão da média
- EROs – espécies ativas de oxigênio
- g - grama
- g* - gravidade
- HH – hemócitos hialinos
- HGP – hemócitos de grânulos pequenos
- HGG – hemócitos de grânulos grandes
- kDa - quilodaltons
- L-DOPA – L-dihydroxyphenylalanine
- LPS- lipo-polissacarídeos
- log – logarítmo de base 10
- mg - miligrama
- MgCl₂ – cloreto de magnésio
- mL – mililitro
- μ L - microlitro
- mM – milimolar
- MRS - Man, Rogosa e Sharpe
- n – número amostral
- NaCl – cloreto de sódio
- NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
- nm – nanômetro
- O₂⁻ - anion superóxido
- °C – graus Celsius
- p – nível de probabilidade
- P – tratamento alimentado com probióticos por 8 dias
- PCR – polymerize chain reaction, reação de polimerase em cadeia
- PG – peptídeos glicanos
- PO - fenoloxidase
- ppAE – prophenoloxidase activating enzyme, enzima ativadora de profenoloxidase
- ppm – partes por mil
- proPO - profenoloxidase

PRPs – pattern recognition proteins, proteínas de reconhecimento padrão
PS – tratamento alimentado com probióticos por 8 dias e inoculado com solução salina
PV - tratamento alimentado com probióticos por 8 dias e inoculado com *V. harveyi*
TBS – Tris buffer solution – solução tampão de tris
TCBS – Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sucrose
THC – Total Haemocyte Count – contagem total de hemócitos
TSA – Trypt soy Agar, Agar Triptona de Soja
TSV – Taura Syndrome Virus
YHV – Yellow head virus
U – unidade internacional de atividade enzimática
UFC – Unidade Formadora de Colônias
WSSV - White Spot Syndrome Virus

RESUMO

Avaliou-se o tempo de atuação da bactéria *Lactobacillus* B6 na flora bacteriana intestinal de *Litopenaeus vannamei*. Utilizaram-se dois grupos experimentais, um alimentado com dieta comercial e outro alimentado dieta comercial suplementada com o probiótico *Lactobacillus* B6. As avaliações iniciaram-se 8 dias após o início do experimento e repetiram-se 2, 4, 6 e 8 dias após a substituição do fornecimento da dieta suplementada com *Lactobacillus* B6 por dieta comercial. A contagem de bactérias lácticas no trato digestivo dos camarões foi superior no tratamento que foi alimentado com dieta suplementada com *Lactobacillus* B6 somente até o 4^o dia de avaliação. A contagem de vibrios e enterobactérias no trato digestivo dos camarões foi superior no controle em relação ao tratamento probiótico apenas nas avaliações nos dias 0 e 2. Nos dias 0 e 2 e 4, a contagem total de hemócitos (THC) dos tratamentos alimentado com ração suplementada com probiótico e controle 3 horas após a inoculação com solução salina e do tratamento probiótico 3 horas após a inoculação com *V. harveyi* não diferiram e foram superiores ao controle 3 horas após a inoculação com *V. harveyi*. Nas avaliações dos dias 6 e 8, os tratamentos probiótico e controle 3 horas após a inoculação com solução salina não apresentaram diferenças quanto a THC que foram superiores a dos tratamentos probiótico e controle 3 horas após a inoculação com *Vibrio harveyi*. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto à atividade da enzima fenoloxidase. No sexto dia após a substituição da alimentação suplementada com probióticos por dieta comercial, todos os parâmetros avaliados foram semelhantes nos camarões alimentados ou não com dieta suplementada com probióticos, sugerindo que o período de ação da bactéria *Lactobacillus* B6 no trato digestivo dos camarões é curto.

Palavras chaves: 1. Probiótico, 2. contagem total de hemócitos, 3. enzima fenoloxidase, 4. flora bacteriana intestinal, 5. vibriose, 6. *Vibrio harveyi*.

ABSTRACT

It was analyzed time of actuation of probiotic bacteria *Lactobacillus* B6 on the bacterial flora in the digestive tract of *Litopenaeus vannamei*. The experiment was divided in two experimental groups, one fed with commercial diet and other fed with *Lactobacillus* supplemented diet. The first analyze was done 8 days after the begging of the experiment and was repeated 2, 4, 6 and 8 after the interruption of the alimentations with the diet supplemented with probiotics. The counts of acid-lacto bacterial in the digestive tract were higher in treatment fed with probiotic supplemented diet than in controls until day 4. The counts of vibrio and enterobacterial in the digestive tract were higher in shrimps of control treatment on days 0 and 2. On days 0, 2 and 4 the total hemocyte cont (THC) of treatments feed with diet supplemented with probiotics and control, 3 hours after inoculation with saline solution and treatment probiotic, 3 hours after de infection with *V. harveyi* were not different and were higher than treatment control 3 hours after the inoculation of *V. harveyi*. On days 6 and 8, the treatments probiotic and control, 3 hours after inoculation with saline solution were not different in THC and were higher than treatments probiotic and control, 3 hours after inoculation with saline *V. harveyi*. It was not observed differences in PO between the treatments. In day 6 after interruption of the alimentations with the diet supplemented with probiotics, all parameter analyzed were identical in fed our not with probiotic supplemente diet, suggesting that the time of actuation of *Lactobacillus* B6 on the bacterial flora in the digestive tract of *Litopenaeus vannamei* is short.

Key words: 1. probiotic, 2. total hemocytes count, 3. phenoloxidase, 4. bacterial flora, 5. vibriosis, 6. *Vibrio harveyi*.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de doenças no cultivo de camarões, não é resultado apenas da intensificação da densidade de produção, mas também de distúrbios ecológicos, alimentares e poluição (KAUTSKY et al., 2000). Bactérias são comuns na água do mar, e podem se tornar patógenos oportunistas, tirando vantagens de mudanças ecológicas da água que é utilizada na aquicultura (SKJERMO e VADSTEIN, 1999).

Grande parte das bactérias patogênicas, como as do gênero *Vibrio*, são altamente adaptáveis a condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido (MAEDA et al., 1997). Um sistema de aquicultura com falha no sistema de oxigenação ou com grande concentração de matéria orgânica pode promover o desenvolvimento destas bactérias. A utilização profilática e terapêutica de antibióticos tem sido a estratégia mais utilizada na aquicultura no controle destas enfermidades (GOMEZ-GIL et al., 2000). Porém, o uso indiscriminado destes antibióticos é uma fonte de poluição ambiental (BOYD e MASSAUNT, 1999) e as bactérias patogênicas podem facilmente desenvolver resistência aos antibióticos (SKJERMO e VADSTEIN, 1999). Muitas vezes, os antibióticos utilizados na carcinicultura são também usados na medicação humana (como clorafenicol e eritromicina), podendo o seu resíduo na carne do camarão selecionar cepas de bactérias patogênicas para humanos resistentes a estes antibióticos. Por este motivo, os importadores e consumidores, cada vez mais, se tornam exigentes e tem demonstrado aversão a produtos produzidos com antibióticos.

Existe também uma questão de equilíbrio ecológico envolvido. No oceano, existe uma população de bactérias naturalmente na água (MAEDA e LIAO, 1994, apud MAEDA et al., 1997), e em tanques de aquicultura há uma tendência do mesmo processo ocorrer. Quando se utiliza um antibiótico, a população de bactérias decresce rapidamente, porém em pouco tempo volta a se estabelecer (Figura 1, adaptada de MAEDA, et al., 1997). Um tanque atacado por doenças normalmente está com o ambiente debilitado, e neste ambiente as bactérias patogênicas são altamente competitivas. Logo, se medidas não forem tomadas no intuito de melhorar o ambiente dos tanques ou de interagir no equilíbrio da população de bactérias, as bactérias patogênicas vão recompor a maior parte da população de bactérias depois da aplicação de um antibiótico.

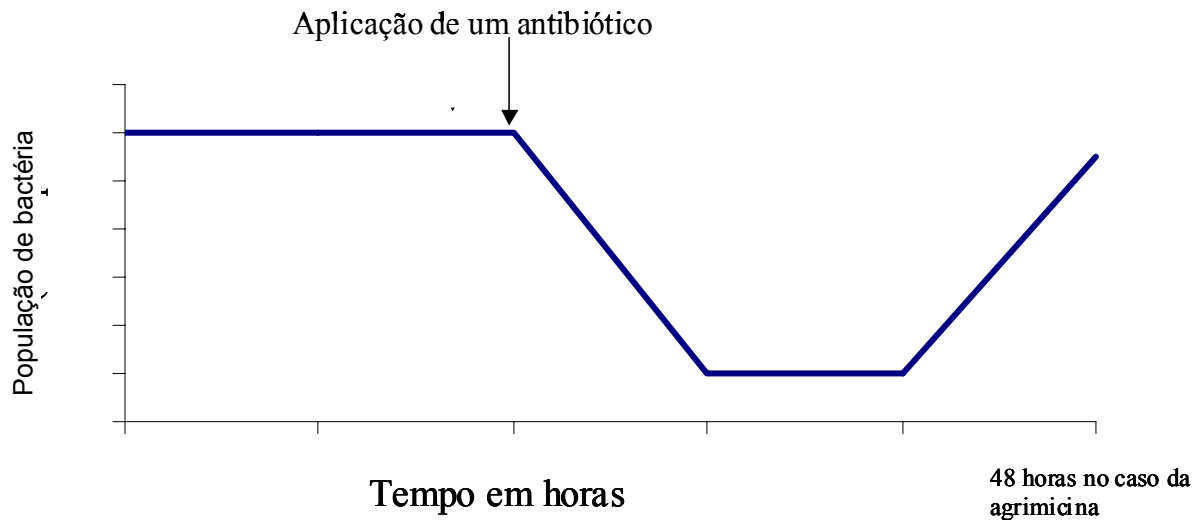


Figura 1: Flutuação na população de bactérias de um tanque de larvicultura pela utilização de um antibiótico. (adaptada de MAEDA, et al., 1997).

No intuito de interagir no equilíbrio bacteriano no tanque de produção, um manejo que pode ser utilizado é a adição de cepas de bactérias benéficas (probióticas) para competir e inibir e o crescimento de bactérias patogênicas (VERSCHUERE et al., 2000). Contudo, o probiótico não pode ser classificado como um agente de controle biológico, pois ele nem sempre atua diretamente sobre o organismo patogênico. Ele também não pode ser qualificado com promotor de crescimento, uma vez que sua utilização não é restrita a melhorar a taxa de crescimento (GOMEZ-GIL et al., 2000). Segundo Boyd e Massaunt (1999), o probiótico pode ter o potencial benéfico de atuar em tanques de aquicultura na decomposição de matéria orgânica, redução na concentração de nitrogênio e fósforo, melhorar o crescimento de algas, melhorar a disponibilidade de oxigênio dissolvido, redução na proliferação de algas azuis e verdes, controlar a concentração de amônia, nitrito e hidróxido de enxofre, diminuir a incidência de doenças e melhorar a sobrevivência e o crescimento do organismo cultivado.

Assim, um tratamento efetivo com um probiótico tem um amplo espectro de ação, atuando no ambiente, na imunidade sorológica e competindo por espaço no intestino dos camarões (RENGPIPAT et al., 2000). Sendo que os probióticos não trazem prejuízos aos animais cultivados nem ao meio ambiente (BOYD e MASSAUNT, 1999).

As doenças causadas por *Vibrio sp.*

As bactérias do gênero *Vibrio* podem ser encontradas livre ou associados a organismos aquáticos. Eles podem ocorrer em nos mais diferentes ambientes aquáticos, incluindo estuários, águas costeiras, sedimentos e tanques de produção aquícola.

Os víbrios são bactérias Gram negativas, anaeróbica facultativa, bastonetes não esporulados, não produzem ácido, curvos ou retos, catalase e oxidase positivos. Eles são geralmente móveis com flagelos polares (AUSTIN e AUSTIN, 1987). Algumas destas espécies de *Vibrio* são conhecidas por serem patógenos secundários e oportunistas causando mortalidade em camarões em condições de estresse (LIU et al., 2004). O aparecimento destas enfermidades está estreitamente relacionado à

interação entre o hospedeiro, distúrbios ambientais e a população de espécies de potencialmente patogênicas (LIGHTNER e REDMAN, 1998). Diversas espécies são reportadas como patógenas como *Vibrio dansela* (SONG et al., 1993), *Vibrio harveyi* (PASHARAWIPAS et al., 2005), *Vibrio nigripulchritudo* (GOARANT et al., 2006), *Vibrio orientalis* (ABRAHAM e PALANIAPPAN, 2004), *V. alginolyticus* (VANDENBERGHE, 1998), *Vibrio furnissii* e *V. parahaemolyticus* (SUNG et al., 1999), *V. alginolyticus* (BUGLIONE et al., 2006).

A presença de bactérias luminosas em tanques de cultivo de camarões marinhos está normalmente associada à bactéria *Vibrio harveyi*. Esta bactéria foi responsável pelo aparecimento da “síndrome de gaivota” no Equador que causou uma quebra de 15% na produção. O *V. harveyi* também é responsável por causar em larvas de camarões marinhos as doenças conhecidas com “síndrome de bolitas” (ROBERTSON et al., 1998) e “síndrome de Protozoea” (AUSTIN e AUSTIN, 1987) que estão entre as maiores causadoras de perdas na larvicultura de camarões.

Apesar de ser um importante patógeno na aquicultura, os mecanismos de patogenicidade destas bactérias ainda não estão totalmente elucidados. E mesmo a diferenciação, dentro da mesma espécie, de cepas de víbrios com potencial probiótico ou virulentas é muito difícil (GEORGE et al., 2004). Produtos extracelulares como proteases, lipases e hemolisinas são considerados determinantes na virulência das cepas de *Vibrio sp.* (AUSTIN e ZHANG, 2006). Adicionalmente, a capacidade da bactéria em fixar-se na quitina mediante a mecanismos protéicos mediadores específicos podem ser significantes para adesão, colonização e subsequente infecção do hospedeiro (MONTGOMERY e KIRCHMAN 1993).

Os camarões infectados internamente por vibrios apresentam sinais característicos quando estão próximos à morte; tais sinais incluem: fraqueza (os camarões se deitam no fundo do viveiro); nado desorientado; opacidade da musculatura abdominal; aumento da pigmentação; grampo na cauda, e lesões escuras ou amarronzadas na cutícula (AUSTIN e AUSTIN, 1987).

A resposta imune em crustáceos:

Além da cutícula rígida, que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos, a integridade corpórea dos crustáceos é mantida por seu sistema imunológico. Assim como outros invertebrados, os crustáceos contam apenas com um *sistema imune intato* ou *natural*, diferentemente dos vertebrados, que possuem, além deste, um *sistema adaptativo* ou *adquirido* (BARRACCO, 2004). A ausência nos invertebrados do sistema adaptativo inviabiliza qualquer tentativa de desenvolvimento de *vacinas*, na concepção clássica da palavra, diminuindo assim, de forma substancial, a possibilidade de se prevenirem e controlarem doenças nestes animais (BARRACCO, 2004). A impossibilidade do desenvolvimento de vacinas torna ainda mais importante o desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de doenças como substâncias imunestimulantes e probióticos.

O sistema imunológico dos invertebrados é formado por barreiras físicas (cutícula e epitélios) somadas a defesas celulares e defesas extracelulares mediadas por células (humoral) (PINHEIRO e ELLAR, 2006). Invertebrados possuem proteínas de reconhecimento padrão (PRPs - pattern recognition proteins) para o reconhecimento da presença de padrões moleculares específicos da parede de microorganismos (RODRÍGUEZ, J. e LE MOULLAC, 2000), carentes contudo de

imunoglobulinas e receptores altamente específicos de vertebrados. Diversas PRPs já foram isoladas e caracterizadas de crustáceos como proteínas de reconhecimento de β -1,3 – glucanos (BGBP, β -1,3-glucan binding proteins) (SÖDERHÄLL et al., 1988); de LPS (LPS-binding proteins - LEE et al., 1996) e de peptoglicanos (peptidoglycan-binding proteins - KANG et al., 1998). Durante as infecções, as PRPs presentes nos hemócitos granulares ou no plasma, ligam-se nos microorganismos invasores, ativando os hemócitos e levando a sua degranulação, com a liberação de moléculas imuno-efetoras (peptídios antimicrobianos, enzima fenoxidase, lectinas).

Quando o patógeno consegue ultrapassar a barreira física da cutícula e epitélios, a fagocitose é a mais comum das reações de defesa celular (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992). Este processo consiste no reconhecimento, ingestão e degradação de partículas estranhas como bactérias, fungos e protozoários (VÁZQUEZ et al., 1996). Os microorganismos são interiorizados pelos hemócitos dentro de um vacúolo digestivo chamado de fagossoma, onde são liberadas enzimas degradativas e são gerados espécies reativas oxigênio (EROs) (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992), em processo conhecido como choque respiratório (MUÑOZ et al., 2000). O primeiro ERO gerado é o anion super óxido. Reações subseqüentes geram outros reativos de oxigênio como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e oxigênio “*singlet*” (RODRÍGUEZ e LE MOULLAC, 2000).

Quando os crustáceos são invadidos por uma quantidade muito grande de microorganismos há a formação de nódulos que aprisionam os invasores dentro de várias camadas de hemócitos (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992).

Vários procedimentos quantitativos são utilizados para avaliara a expressão da resposta imune em crustáceos. A contagem total de hemócios (THC) e a atividade fenoxidase (PO) têm sido consideradas como marcadores de saúde, uma vez que mudanças nestes parâmetros podem estar relacionadas a infecções por patógenos e condições adversas (SRITUNYALUCKSANA e SÖDERHÄLL, 2000).

Hemograma

Hemócitos constituem na primeira linha de defesa interna contra invasores e são cruciais nas reações imunes dos camarões. Estas células são responsáveis pela fagocitose, encapsualção, formação de nódulos e produção de moléculas tóxicas (VAN DE BRAACK et al., 2002b).

A compreensão das reações imune celulares dos crustáceos depende de forma crucial de número e tipos de hemócitos ou células imunocompetentes. Apesar de não haver ainda uma classificação uniforme e universalmente aceita para estas células, três tipos de hemócitos são usualmente descritos em crustáceos: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (HGG) (JOHANSSON et al., 2000).

Acredita-se que os hemócitos hialinos são de linhagens diferentes dos hemócitos granulares e estão envolvidos com as reações de coagulação (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1992; GARGIONI e BARRACCO, 1998). Já os hemócitos granulares estariam relacionados aos mecanismos de fagocitose, formação de nódulos e produção de moléculas tóxicas e microbicidas (DESTOUMIEUX et al., 2000, VAN DE BRAACK et al., 2002b).

Variações nos hemogramas de camarão são relatadas em muitas situações de estresse como infecções bacterianas (MARTIN et al., 1993), virais (VAN DE BRAACK et al., 2002a), ciclo de mudas (LIU et al., 2004), salinidade (PERAZZOLO et al., 2002), toxidez por enxofre (CHENG et al., 2006) e temperatura (WANG e CHENG, 2006).

Durante uma infecção bacteriana os hemócitos migram para as regiões da infecção, fazendo com que o número de hemócitos na circulação caia. A quantidade de hemócitos na circulação é restabelecida ou até aumentada depois do controle da infecção, aparentemente pela produção de novos hemócitos pelo tecido hematopoiético (VAN DE BRAACK et al., 2002b).

Sistema Fenoloxidase (PO)

A proPO é um zimogênio da enzima fenoloxidase e encontra-se nos crustáceos compartimentalizada no interior dos grânulos dos hemócitos, de onde são liberados por uma exocitose regulada (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1998). Pela estimulação de componentes das paredes celulares microbianas como LPS da parede celular de bactérias Gram positivas, β -glucanos da parede de fungos e peptoglicanos da parede celular de bactéria Gram negativas, a proPO é liberada e ativada em fenoloxidase. A conversão da proPO inativa para PO é realizada por uma serino-protease chamada de enzima ativadora de profenoloxidase (ppAE - prophenoloxidase activating enzyme) (SRITUNYALUCKSANA e SÖDERHÄLL, 2000). Essa proPO pode também ser ativada por serino-proteases comerciais como tripsina (PERAZZOLO e BARRACCO, 1997).

A modulação da atividade da enzima fenoloxidase (PO; monofenol, L-DOPA:oxigênio redutase; EC 1.14.18.1) tem sido muito empregada como parâmetro de saúde, principalmente em camarões (Barracco, 2004). Esta enzima é bifuncional e catalisa as reações de o-hidrolisação de monofenóis e a oxidação de fenóis a quinonas (SRITUNYALUCKSANA e SÖDERHÄLL, 2000). Assim, esta enzima tem a habilidade de converter tirosina a L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine) e também de converter L-DOPA para DOPA-quinona (NAPPI e VASS, 1993). As quinonas, por sua vez, continuam transformando-se por via não enzimática em vários outros compostos, que culminam com a formação da melanina (Figura 2). A melanina e os compostos intermediários da cascata de melanização são tóxicos a microorganismos (NAPPI e VASS, 1993).

O sistema de ativação da proPO é regulado por inibidores de proteases para evitar uma super-ativação e restringir a reação somente nos locais agredidos e/ou infectados, evitando assim danificar outros tecidos do hospedeiro (BARRACCO, 2004). A melanina também parece ter a função de "scavenger" de radicais livres (NAPPI e VASS, 1993), prevenindo danos causado por estas moléculas reativas ao tecido do próprio hospedeiro.

A atividade da PO parece variar em relação a diversas condições de estresse, como a infecção por patógenos (HAUTON et al, 1997), hipoxia (LE MOULLAC et al., 1998), variação de temperatura (VARGAS-ALBORES et al., 1998), salinidade (PERAZZOLO et al., 2002) e amônia (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000).

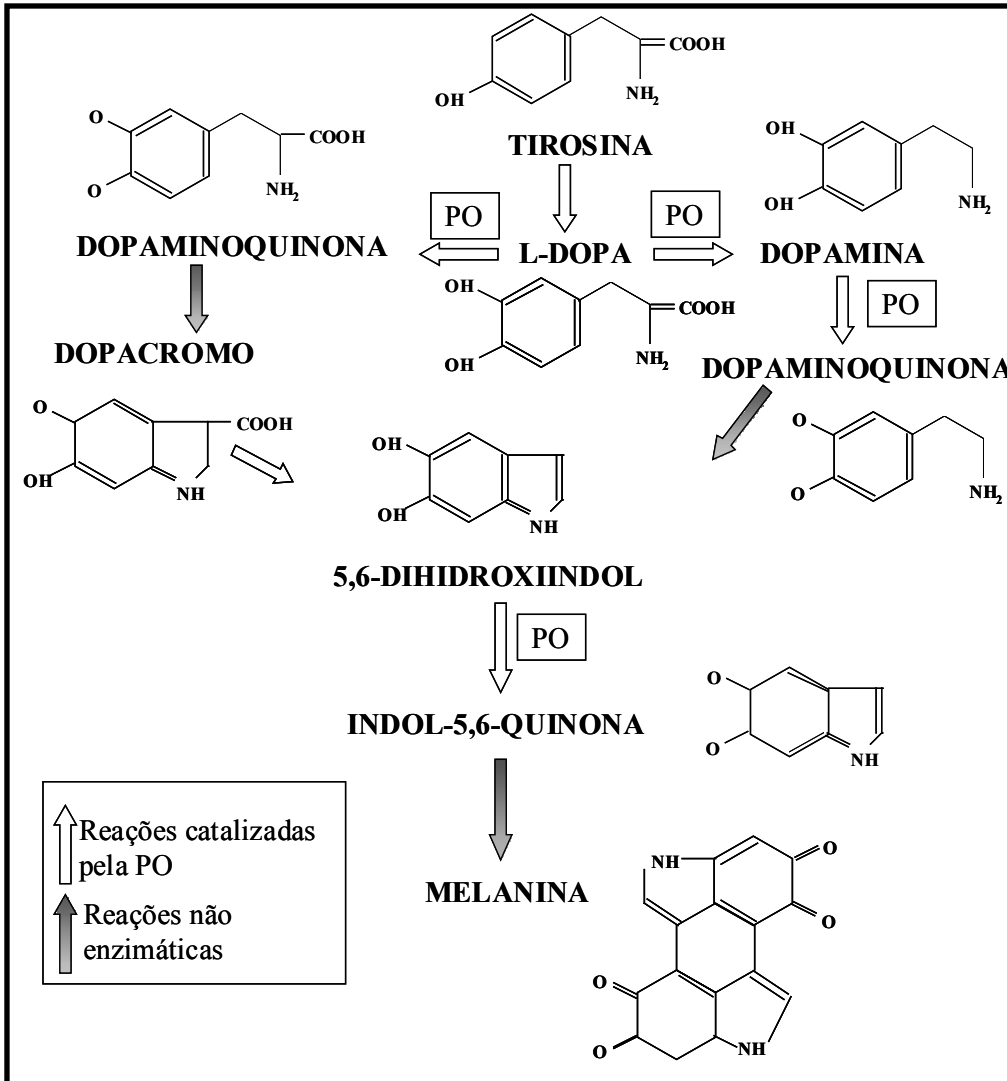


Figura 2: Mecanismo de ação da fenoloxidase com os principais passos da formação da melanina a partir de compostos fenólicos, PO: enzima fenoloxidase (adaptado de NAPPI e VASS, 2003).

Definição de probióticos

A palavra probiótico vem do grego, “pro bios” que significa “para vida”. A definição inicial provém de Lilly e Stillwell (1965), “substância produzida por um protozoário que estimula o crescimento de outro”. Esta definição foi modificada por Fuller (1989) para “microorganismo vivo utilizado na alimentação que afeta beneficemente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de microorganismos da flora intestinal”. Porém esta definição foi feita levando em conta apenas animais terrestres. Na aquicultura esta definição é insuficiente, pois não somente a flora intestinal do organismo está envolvida, como também o ambiente externo. Assim, Gatesoupe (1999) definiu probiótico como “células microbianas que são adicionadas de uma maneira que entrem no trato digestivo dos animais, mantendo-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal”. Esta definição é mais ampla que a anterior, pois o probiótico não precisaria ser adicionado necessariamente na alimentação, podendo também ser adicionado na água de cultivo. Porém, este autor exclui dos probióticos a atuação no ambiente de cultivo, seja melhorando a qualidade de água ou eliminando compostos tóxicos. Esta ação é considerada por Gatesoupe (1999) como “biorremediação”. Já, Verschuere et al. (2000) inclui o conceito de biorremediação dentro do conceito

de probióticos como “microorganismo vivo que ao ser ministrado a tanques de cultivo atua beneficemente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, balanço de bactérias no trato digestivo ou o ambiente de cultivo (viveiro)”.

Os probióticos se diferenciam dos prebióticos e suplementos alimentares por serem bactérias vivas. Os prebióticos são “são substratos que agem beneficemente ao estimular seletivamente o crescimento de bactérias benéficas” (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Já, os suplementos alimentares “são substâncias ricas em um ou mais nutrientes essenciais que são adicionados à dieta”.

Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas são caracterizadas por serem Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, imóveis, não esporuladas, catalase negativas, carência de citocromos e que produzem ácido láctico como maior produto do seu metabolismo (RINGO e GATESOUBE, 1999). Diferentes gêneros de bactérias lácticas (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*) se adaptaram a crescer em diferentes condições ambientais (FARZANFAR, 2006). Estas bactérias são encontradas comumente na flora gastrointestinal de diversos animais endodérmicos, em leite, queijo e em alguns tecidos de plantas (RINGO e GATESOUBE, 1999). Contudo, as bactérias ácido-lácticas não são dominantes na microbiota intestinal de organismos aquáticos, e muitas tentativas têm sido realizadas no intuito de induzir uma dominância artificial destas bactérias nestes organismos (GATESOUBE, 1999).

O interesse no uso das bactérias ácido-lácticas como probióticos se deve a sua grande capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas pela produção de compostos antibacterianos (FULLER, 1989). Entre estes compostos destacam-se o ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, reuterina e bacteriocinas (VÁSZQUEZ et al., 2005).

Isolamento de bactérias probióticas

Não existe consenso sobre os benefícios do uso de bactérias benéficas no cultivo de camarões marinhos. São inúmeros os relatos positivos (REGPINPAT et al., 1998 e 2000, GULLIAN et al., 2004, Li et al., 2006) e negativos de probióticos (MEUNPOL et al., 2003, ALAVANDI, et al. 2004 e PADILHA, 2005). Os relatos negativos muitas vezes estão associados ao uso de bactérias que não foram isoladas do trato digestivo do animal em estudo.

As bactérias probióticas devem ser isoladas preferencialmente do organismo no qual ela será utilizada (Figura 3). Um protocolo para o isolamento de bactérias probióticas está descrito na Figura 4. Assim, o primeiro passo para o desenvolvimento de um probiótico é isolá-lo do trato digestivo ou do ambiente de cultivo de animais saudáveis. Deve-se usar então um meio seletivo para o tipo de bactéria que se pretende isolar como meio de cultura Agar TCBS (Tiosulfato Citrato Sais de Bile Sacrose) para o isolamento de *Vibrio sp.* e enterobactérias (GULLIAN et al., 2004), Agar Marine Agar para *Pseudomonas sp.* (VIJAYAN et al., 2006), Agar MRS (DE MAN et al., 1960) para bactérias lácticas (RAMIREZ, 2005), entre outros.

Uma vez isoladas as cepas candidatas a serem utilizadas como probióticos, deve-se realizar diversos testes de seleção *in vitro* antes dos testes *in vivo*. Estes testes incluem tolerância a NaCl em caso de probióticos usados em animais de água salgada (RAMIREZ, 2005), resistência a sais biliares (RAMIREZ, 2005), curva de crescimento ideal em diferentes pH e temperaturas (VIJAYAN et al., 2006), capacidade da cepa de produção de compostos inibitórios (VINE et al., 2004, VIEIRA et al., 2005, RAMIREZ, et al 2006) e de exclusão competitiva diferentes patógenos (VASEEHARAN e RAMASAMY, 2003).

Das cepas candidatas ao uso como probiótico, deve-se fazer um teste *in vivo* para avaliar a capacidade destas em recolonizar o trato digestivo do animal (GULLIAN et al., 2004) e avaliar se a mesma não é patogênica (VIJAYAN et al., 2006). Este teste pode ser feito adicionando o probiótico na água (LI et al., 2006), na ração (LIN et al., 2004) ou em artemias vivas (VIEIRA, et al. 2006a).

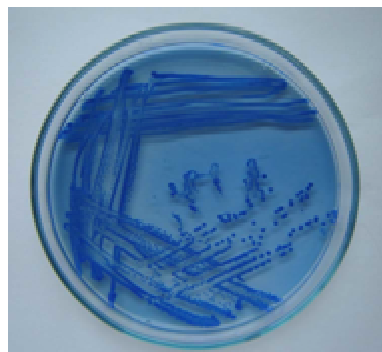
Se as cepas candidatas não se mostrarem patogênicas e tiverem a capacidade de colonizar o trato digestivo dos animais, deve-se fazer um experimento piloto para avaliar se há algum efeito benéfico da adição desta cepa ao animal de cultivo, seja na resistência a infecção por patógenos (GULLIAN et al., 2004) ou na melhoria de índices zootécnicos (VENKAT et al., 2004). Contudo, os testes de seleção *in vitro* não garantem os resultados esperados *in vivo*. Alavandi et al., (2004) relatam que o uso das bactérias candidatas a probiótico *Pseudomonas sp.* PM11 e *Vibrio fluviales* PM17, selecionadas *in vitro* pela capacidade de inibir patógenos, baixou os índices imunitários em *Penaeus monodon*.



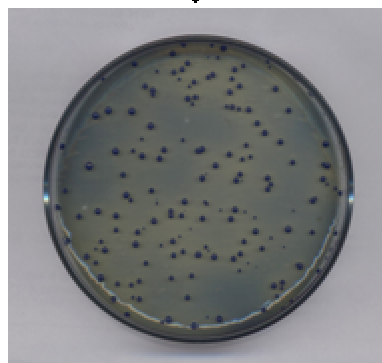
Retirada do trato
digestivo



Semeadura em
meio de cultura
seletivo



Semeadura por
estrias para o
isolamento



Cepa Isolada

Figura 3: Isolamento de bactérias do trato digestivos de camarões

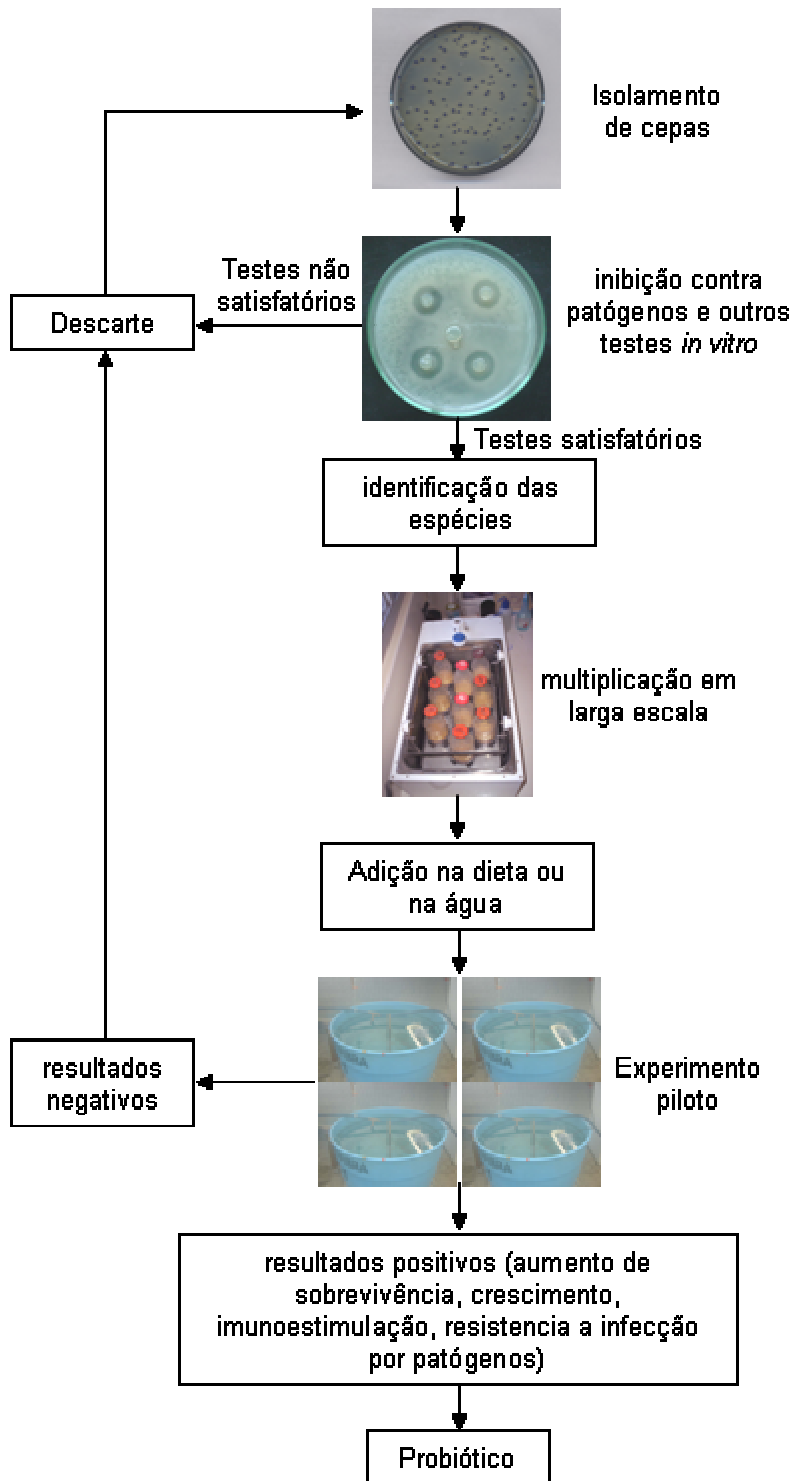


Figura 4: Protocolo para o teste de bactérias isoladas candidatas a probióticos.

Probióticos na Carcinicultura

A utilização de probióticos vem ganhando espaço na carcinicultura. Muitos estudos têm sido conduzidos com o intuito de mostrar o efeito positivo da utilização de probióticos na produção de camarões. Griffith (1995) relatou que após a introdução do uso de probióticos na indústria camaroneira equatoriana, a produção teve um incremento de 35% e a utilização de antibióticos foi reduzido em 94%. Em escala comercial de produção de larvas, Garcia e Massam (2005) relatam que em uma larvicultura localizada em Honduras, houve um incremento na sobrevivência das larvas de *L. vannamei* após a substituição dos antibióticos pelos probióticos comerciais. Em tanques de engorda, o uso de probióticos comerciais foi relatado como benéfico, melhorando a sobrevivência, conversão alimentar, taxa da crescimento e mantendo os parâmetros de qualidade de água em níveis ótimos (SHARIFF et al., 2001; WANG et al., 2005).

Em estudo com *L. vanamei*, Vieira et al., (2006b) relatam que o uso da bactéria *Lactobacillus* isolada do trato digestivo de camarões, melhorou a sobrevivência da larvicultura e a resistência das larvas à infecção por *V. harveyi*. Em *Macrobrachium rosenbergii*, VENKAT et al., (2004) demonstraram que a utilização de dieta suplementada de cepas de bactérias *Lactobacillus acidophilus* e *L. sporogenes* melhorou a taxa de crescimento dos camarões. Este resultado pode estar associado a uma melhoria na digestibilidade da dieta ou estimulação da produção de enzimas digestivas. Lin et al., (2004) demonstraram que a inclusão da bactéria *Bacillus sp.* na dieta de *Litopenaeus vannamei* melhorou os índices de digestibilidade da ração. Em *Fenneropenaeus indicus* observou-se que a atividade das enzimas digestivas lipase e amilase foram superiores em camarões alimentados com *Bacillus sp.* (ZIAEI-NEJAD et al., 2006). Estes camarões também apresentaram uma maior taxa de crescimento e menor conversão alimentar.

Diversos trabalhos têm demonstrado a capacidade de cepas de bactérias probióticas em inibir o crescimento de cepas de bactérias patogênicas *in vitro* (VIEIRA et al., 2005; VINE et al., 2006, VIJAYAN et al., 2006). Algumas destas cepas têm demonstrado capacidade de inibição semelhante aos antibióticos (LI et al., 2006, RAMIREZ, 2005).

Ramirez (2005) demonstrou que o fornecimento de alimentação suplementada com probióticos lácticos (*Lactobacillus 2*) a camarões positivos para WSSV (detecção por Polymerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia), resultou em melhoria na resistência destes camarões à infecção com *Vibrio alginolyticus*. Neste trabalho, foi observada a mortalidade de 65% dos camarões do grupo controle 3h após a infecção intramuscular com *V. alginolyticus*, com aparecimento dos sinais clínicos da doença da mancha branca. Já os camarões do grupo alimentados com dieta suplementada com probióticos tiveram mortalidade de apenas 15%.

A utilização da bactéria probiótica *Bacillus S11*, isolada do habitat natural de *Penaeus monodon*, mostrou-se eficiente no aumento da sobrevivência no cultivo desta espécie (RENGPIPAT et al., 1998). O *Bacillus S11* modificou a microbiota intestinal dos camarões, diminuindo a incidência de bactérias do gênero *Vibrio*. Os camarões cultivados com a adição desta cepa de bactéria ainda se mostraram mais resistentes à infecção por *Vibrio harveyi* (100% de sobrevivência dos camarões no tratamento com probióticos e 26% no controle). Resultados semelhantes na sobrevivência de *P.*

monodon tratados com *Bacillus subtilis* na água de cultivo e infectados por *V. harveyi* foram observados por Vaseeharan e Ramasamy (2003).

A bactéria probiótica *Bacillus* S11 se mostrou eficiente também na estimulação da resposta imune de *Penaeus monodon* (RENGPIPAT et al., 2000), com aumento na atividade da enzima fenoloxidase, índice de fagocitose e atividade antibacteriana da hemolinfa. Ainda em se tratando de *Penaeus monodon*, Meunpol et al. (2003) relataram que a utilização de *Bacillus* S11 na proporção de 1:3 (peso/peso) com ração comercial associada a um tratamento com ozônio se mostrou efetiva no aumento da sobrevivência de pós-larvas em relação ao controle.

Gullian et al., (2004) relataram que as cepas de bactérias *Bacillus* P64 e *Vibrio* P62 isolados do trato digestivo de camarões adultos de *L. vannamei* apresentaram ação exclusão competitiva contra a bactéria patogênica *V. harveyi*. Adicionalmente, estas cepas mostraram-se eficiente na estimulação da enzima fenoloxidase.

Contudo, o período em que a flora bacteriana intestinal dos camarões permanece modificada após o fornecimento das bactérias probióticas, bem como o tempo em que os animais permanecem imunoestimulados após a parada do fornecimento das bactérias probióticas ainda é desconhecido.

Objetivo

Avaliar o tempo de atuação da bactéria probiótica *Lactobacillus* B6 isolada do trato digestivo de camarões (*Litopenaeus vannamei*) na flora bacteriana (bactérias totais, vibrios e enterobactérias e bactérias lácticas) de juvenis de *L. vannamei* e sua relação com a contagem total de hemócitos e atividade da enzima fenoloxidase frente à inoculação por *Vibrio harveyi*.

Formatação do Artigo

O artigo formatado de acordo com as normas da revista *Aquaculture*.

**ARTIGO: TEMPO DE ATUAÇÃO DO LACTOBACILUS B6 NA FLORA BACTERIANA
INTESTINAL DE LITOPENAEUS VANNAMEI E SUA RELAÇÃO COM A CONTAGEM TOTAL DE
HEMÓCITOS E A ATIVIDADE DA ENZIMA FENOLOXIDASE FRENTE À INFECÇÃO POR VIBRIO
HARVEYI.**

Felipe N. Vieira^a, Celso C. Buglione^a, José L.P. Mouriño^a, Adolfo Jatobá^a, Fabiola S. Pedrotti^a, Elpídio Beltrame^a, Margherita A. Barracco^b, Luis A. Vinatea^a

^a Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis -SC, CEP:88062-601, Brasil.

^b Laboratório de Imunologia Aplicado a Aqüicultura, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, UFSC, SC, Cep: 88040-900, Brasil.

fone: 554832313400, fax: 554832313434, felipenvieira@yahoo.com.br.

Artigo dentro das normas da revista Aquaculture

RESUMO

Avaliou-se o tempo de atuação da bactéria probiótica *Lactobacillus* B6 na flora bacteriana intestinal de *Litopenaeus vannamei* e sua relação com a resposta à contagem total de hemócitos (THC) e atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro dos camarões desafiados com *Vibrio harveyi*. Utilizaram-se dois grupos experimentais: alimentado com dieta comercial durante todo o experimento e alimentado durante 8 dias com dieta comercial suplementada com *Lactobacillus* B6 e posteriormente com ração comercial. As avaliações iniciaram-se 8 dias após o início do experimento e repetiram-se 2, 4, 6 e 8 dias depois. A contagem total de bactérias lácticas no trato digestivo dos camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos foi superior até o 4º dia de avaliação. Houve uma queda exponencial ($y = 7,949e^{-0,4326x}$, $R^2=0,96$) na contagem de bactérias probióticas do trato digestivo dos camarões alimentados com probióticos após a substituição da alimentação suplementada com *Lactobacillus* B6 por ração comercial. A contagem de vibrios e enterobactérias foi superior no controle em relação ao tratamento alimentado com dieta suplementada com probióticos nas avaliações dos dias 0 e 2. Observou-se um crescimento exponencial na contagem de vibrios e enterobactérias no tratamento probiótico após a substituição da dieta suplementada com probióticos por ração comercial ($y=4,3802e^{0,0928x}$, $R^2=0,83$). Nos dias 0, 2, e 4, a THC dos camarões do tratamento alimentado com ração suplementada com probiótico e controle, 3 horas após a inoculação com solução salina e do tratamento probiótico, 3 horas após a inoculação com *V. harveyi* não diferiram e foram superiores aos camarões do controle 3 horas após a inoculação com *V. harveyi*. Nos dias 6 e 8, os camarões do tratamento probiótico e controle após 3 horas da inoculação com solução salina não apresentaram diferenças entre as suas médias de THC que foram superiores aos camarões do tratamentos probiótico e controle 3 horas após a inoculação com *V. harveyi*. O THC do tratamento probiótico inoculado com *V. harveyi* apresentou uma queda linear nas avaliações ($y=-1898,8x+17482$, $R^2 = 0,75$). Não foi observado diferença significativa entre os camarões do tratamento probiótico e controle quanto a PO. Porém, observou-se uma queda linear da PO nos camarões tratamento probiótico inoculado com *V. harveyi* nas avaliações ($y=-6,57x+ 66,1$, $R^2=0,67$). No 6º dia após a substituição da alimentação suplementada com probióticos por dieta sem suplementação, todos os parâmetros avaliados foram idênticos nos camarões do tratamento probiótico e no controle, sugerindo assim que o período de ação da bactéria *Lactobacillus* B6 no trato digestivo dos camarões é curto.

Palavras chaves: Probióticos; vibriose, camarões marinhos, bactérias ácido-lácticas.

ABSTRACT

The object of this work was to examine the actuation time of probiotic bacteria *Lactobacillus* B6 on the digestive tract bacterial flora of *Litopenaeus vannamei* and its relation with total hemocyte count (THC) and phenoloxidase activities (PO) in the serum after infection with *Vibrio harveyi*. The experiment was divided into two experimental groups, one fed with commercial diet and the other with *Lactobacillus* B6 supplemented diet. The first analysis was done 8 days after the beginning of the experiment and was repeated at 2, 4, 6, and 8 days after the interruption of the alimentations with probiotic supplemented diet. The counts of acid-lacto bacterial in the digestive tract were higher in shrimps of treatment fed with probiotic supplemented diet than in controls until day 4. It was observed an exponential decrease ($y = 7,949e^{-0,4326x}$, $R^2 = 0,96$) in the counts of acid-lacto bacterial in the digestive tract of shrimp after the substitution of probiotic supplemented diet for commercial diet. The counts of vibrio and enterobacterial in the digestive tract were higher in shrimps of control treatment on days 0 and 2. It was observed an exponential increase ($y = 4,3802e^{0,0928x}$, $R^2 = 0,83$) in counts of vibrio and enterobacterial in the digestive tract of shrimps after the substitution of probiotic supplemented diet for commercial diet. On days 0, 2, and 4 the total hemocyte count (THC) in shrimps fed with probiotic supplemented diet and control, 3 hours after inoculation with saline solution and treatment probiotic, 3 hours after infection with *V. harveyi* were not different and were higher than shrimps of control 3 hours after the inoculation of *V. harveyi*. On days 6 and 8, the shrimps of treatments probiotic and control, 3 hours after inoculation with saline solution were not different in THC and were higher than shrimps of treatments probiotic and control, 3 hours after inoculation with saline *V. harveyi*. The THC of treatment probiotic infected with *V. harveyi* presented a linear decrease during the analyzes ($y = -1898,8x + 17482$, $R^2 = 0,75$). It was not observed differences in PO between the shrimps fed or not with probiotic supplemented diet. However, the PO of treatment probiotic infected with *V. harveyi* presented a linear decrease during the analyzes ($y = -6,57x + 66,1$, $R^2 = 0,67$). In day 6 after interruption of the alimentations with probiotic supplemented diet, all parameters analyzed were similar in all treatments, suggesting that the time of actuation of *Lactobacillus* B6 on the bacterial flora in the digestive tract of *Litopenaeus vannamei* is short.

Key words: probiotic; vibriosis, marine shrimps, acid-lacto bacterial.

INTRODUÇÃO

As perdas na produção de camarões por resultado de doenças, principalmente as de origem viral como o WSSV, TSV e YHV (Ligtner e Redman, 1998), são incalculáveis. As doenças causadas por bactérias oportunistas também causam perdas importantes na carcinicultura marinha. Diversas espécies de vibrio já foram reportadas como patogências como *Vibrio dansela* (Song et al., 1993), *V. harveyi* (Pasharawipas et al., 2005), *V. nigripulchritudo* (Goarant et al., 2006), *V. orientalis* (Abraham e Palaniappan, 2004), *V. alginolyticus* (Vandenbergh, 1998), *V. furnissii* e *V. parahaemolyticus* (Sung et al., 1999)

Para o controle de *Vibrios* sp. e outras bactérias patogências, a utilização profilática e terapêutica de antibióticos tem sido a estratégia mais utilizada na aqüicultura (Gomez-Gil et al., 2000). Porém, estes antibióticos são uma fonte de poluição ambiental (Boyd e Massaunt, 1999) e as bactérias patogências podem facilmente desenvolver resistência aos antibióticos (Karunasagar et al., 1994). Por outro lado, os importadores e consumidores, tornam-se cada vez mais exigentes e têm demonstrado aversão a produtos produzidos com antibióticos. Uma alternativa ao uso de antibióticos que vem ganhando espaço na indústria nos últimos anos é a utilização de bactérias probióticas (Gatesoupe, 1999, Vine et al., 2006).

Probiótico é definido por Gatesoupe (1999) como “microorganismo vivo que ao ser ministrado coloniza o trato digestivo dos animais de cultivo com o objetivo de melhorar a saúde destes animais”. Varias gêneros de bactérias têm sido reportadas por sua ação probiótica como *Bacillus* (Rengpipat et al., 2000), *Vibrio* sp (Gullian et al., 2004), *Arthrobacter* (Li et al., 2006), *Pseudomonas* (Vijayan et al., 2006), e *Lactobacillus* (Venkat et al., 2004). Os *Lactobacillus* estão entre os gêneros de bactérias probióticas mais estudadas por produzirem diversas substâncias antimicrobianas assim como peptídeos antimicrobianos, ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio (Folks e Gibson, 2002).

Estudos têm demonstrado que a composição natural da flora bacteriana intestinal de camarões marinhos pode ser modificada pelo fornecimento de bactérias probióticas diretamente na alimentação (Ziaei-Nejad et al., 2006) e que esta modificação pode estimular a resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por bactérias patogências (Rengpipat et al., 2000). Contudo, o período em que a flora bacteriana intestinal dos camarões permanece modificada bem como o tempo em que os animais permanecem imunoestimulados após a parada do fornecimento das bactérias probióticas ainda é desconhecido. A bactéria *Lactobacillus* B6 já foi reportada por melhorar a sobrevivência na larvicultura de *Litopenaeus vannamei* e a resistência das larvas à infecção por *Vibrio harveyi* (Vieira et al., 2006).

A modulação da atividade da enzima fenoloxidase (PO) tem sido muito empregada como parâmetro de saúde, principalmente em camarões (Barracco, 2004). A enzima fenoloxidase catalisa a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, que podem ser polimerizados formando melanina. A melanina e os compostos intermediários da cascata de melanização são tóxicos a microorganismos (Nappi e Vass, 1993). A atividade da PO parece variar em relação a diversas condições de estresse, como a infecção por patógenos (Hauton et al, 1997).

Este trabalho objetivou avaliar o tempo de atuação da bactéria probiótica *Lactobacillus* B6 na flora bacteriana intestinal do trato digestivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e sua

relação à contagem total de hemócitos (THC) e atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro dos camarões frente à infecção por *Vibrio harveyi*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Aplicado a Aqüicultura (Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC) e no Laboratório de Camarões Marinhos (Departamento de Aqüicultura - UFSC) em conjunto com o Laboratório de Imunologia Aplicada a Aqüicultura (Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética-UFSC).

Material biológico e preparação do inóculo

Para o experimento foram utilizados camarões juvenis com $10 \pm 1,23\text{g}$ (*Litopenaeus vannamei* - Pérez-Farfante e Kensle, 1997) provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC. Utilizou-se a cepa de bactéria ácido-láctica *Lactobacillus* B6 isolada de camarões *Litopenaeus vannamei* (Vieira et al., 2006) com peso médio de $30 \pm 3\text{g}$ ($\bar{x} \pm DP$) provenientes do banco de reprodutores do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC e a cepa de bactéria virulenta *Vibrio harveyi* U.A. 2343.

A cepa bacteriana *Lactobacillus* B6 foi cultivada em meio de cultura caldo MRS (De Man et al., 1960; Aumedia) em incubadora sobre agitação contínua de 200rpm a 35°C por 24h para alcançar a contagem de 10^9 UFC/mL..

O *Vibrio harveyi* foi cultivado em meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion – Infusão de Coração e Cérebro, Oxoid) sobre agitação contínua (200rpm) a 30°C. Após 24h do início da cultura, a suspensão bacteriana de *V. harveyi* foi centrifugado ($1000 \times g$), e o sobrenadante descartado, sendo o *pellet* ressuspenso em solução salina estéril (NaCl 1,5% - SSE). A concentração de *V. harveyi* nesta solução foi estimada por contagem das colônias formadas em placas contendo meio de cultura Agar TSA (Agar Triptona de Soja, Oxoid) por meio de 8 diluições seriadas fator 10. A concentração do inóculo foi ajustada para 10^7 UFC/mL com solução salina 1,5%.

Preparo da dieta

A ração comercial (35% de proteína) foi aspergida com 200mL/kg de inóculo de 10^8 UFC/mL de bactérias lácticas. A ração aspergida foi hermeticamente fechada e incubada em estufa a 35°C por 24h. Passado este período, a ração foi transferida para uma segunda estufa com circulação de ar para secagem a 35°C por 24h.

Três amostras de 1g da ração seca foram macerada em 1mL de solução salina (1,5%) estéril e diluídas serialmente (1/10) 9 vezes. As diluições 10^{-5} até 10^{-9} foram semeadas em placas com meio de cultura MRS e incubadas a 35°C por 48h para estimar a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias probióticas na ração oferecida aos camarões. A ração do tratamento controle sofreu o mesmo processo da ração suplementada com probióticos, porém ela foi aspergida com meio de cultura estéril. A contagem final de bactérias lácticas na ração ficou em $1,5 \pm 0,7 \times 10^8$ UFC/g.

Condições experimentais

Foram utilizados 8 tanques de 120L povoados com 50 camarões juvenis de *Litopenaeus vannamei* com peso médio de $10 \pm 1,2g$ ($\bar{x} \pm DP$). Destes tanques, 4 receberam somente ação inoculada com meio de cultura estéril durante todo o experimento. Os outros 4 tanques foram alimentados com ração suplementada com probióticos durante 8 dias. Passado este período, foi interrompido o fornecimento de ração suplementada com probióticos para estes tanques que passarem a ser alimentados somente com ração comercial sem probióticos.

A ração foi fornecida 4 vezes ao dia (8:00, 12:00, 16:00 e 20:00) em uma quantidade equivalente a 3% de biomassa. A temperatura da água foi mantida em $28 \pm 2^{\circ}C$ e a salinidade em 30ppm. Foi realizada uma renovação de 100% da água no oitavo dia de experimento para eliminar a microbiota dos tanques. Nos demais dias foi realizada uma renovação de 10% da água em todos os tanques e o sedimento do fundo foi retirado.

Passados 8 dias do início do experimento, 3 camarões foram retirados ao acaso de cada tanque para avaliação microbiológica do trato digestivo ($n=24$; 8 *pools* de 3 animais). Outros 3 camarões de cada tanque foram amostrados e inoculados no primeiro segmento abdominal com 25 μ L de SSE contendo 10^7 UFC/mL de *Vibrio harveyi* e repassados à recipientes de 15L de água do mar com salinidade 30ppm. Mais três camarões de cada tanque foram amostrados e inoculados com 25 μ L SSE para controle e repassados para recipientes de 15L de água marinha com salinidade de 30ppm.

Três horas após a inoculação foram coletadas a hemolinfa dos camarões (8 *pools* de 3 animais) para avaliação da contagem total de hemócitos (THC), atividade da enzima fenoloxidase (PO) e a presença de bactérias na hemolinfa. O tempo de avaliação de 3 horas após a infecção foi utilizado porque ensaios anteriores demonstraram que neste período não havia mortalidade de camarões. Estes procedimentos foram repetidos mais 4 vezes a cada 2 dois dias.

Coleta da hemolinfa para avaliação dos hemogramas, avaliação microbiológicas e preparação do soro

A hemolinfa foi obtida do sinus ventral de cada camarão (cerca de 300 μ L por animal). As amostras foram coletadas com seringas estéreis de 1mL (21G) resfriadas a 4 $^{\circ}C$. Da hemolinfa coletada, 10 μ L foi fixado em solução de 4% de formol-MAS (10 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7.0) para contagem total de hemócitos (THC), 10 μ L foi utilizado para avaliação microbiológica e o restante foi deixado coagular em presença de gelo. O coagulo foi então congelado e descongelado por 3 vezes, centrifugado repetidamente a 2000 x *g* por 10 minutos para obtenção do soro que foi alíquotado e estocado a -20 $^{\circ}C$.

Avaliação da microbiologia do trato digestivo e da hemolinfa

A hemolinfa coletada (10 μ L) foi semeada em condições de esterilidade em placa de petri contendo meio de cultura Agar TCBS (Tryptona Citrato Sais de Bile Sucrose, Oxoid) para verificar a presença de *Vibrios* sp.. Os tratos digestivos dos 3 camarões amostrados de cada tanque foram

extirpados com o auxílio de pinças e bisturi, homogeneizados com SSE em um gral e diluídos serialmente (1/10) 5 vezes. As diluições 10^{-1} até 10^{-5} foram semeadas em meio de cultura Agar Marine (Agar não seletivo, contagem total de bactérias, Oxoid), Agar MRS (seletivo para bactérias lácticas), e Agar TCBS (seletivo para vibrios e enterobactérias, Oxoid) e incubadas em estufa a 30°C. Foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colônias após 24h da incubação nos meios de cultura Agar Marine e Agar TCBS e 48h depois no meio Agar MRS. Das colônias crescidas em MRS, foi feita a coloração de Gram.

Contagem total de hemócitos (THC)

O número total de hemócitos foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer.

Concentração de proteína no soro

A concentração de proteína do soro foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão.

Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro

A atividade da PO foi determinada por espectrofotometria (490 nm) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma) (Perazzolo e Barraco, 1997). Primeiramente, amostras do soro (8 poos de 3 animais) foram diluídas (1:9) em TBS (1 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7.4). Desta solução, 50µL foram incubados em triplicata com 50µL de solução do indutor enzimático tripsina (Sigma, 1mg/L) em microplacas de 96 poços por 5 minutos. Após a incubação, 50 µL de solução L-DOPA (3mg/mL) foi adicionado em cada poço. O controle foi feito com 100 µL de TBS adicionado de 50µL da solução 1:9 de soro diluído em TBS. A formação do DOPA-cromo foi monitorada nos tempos 0, 5 e 10 minutos. A variação de uma unidade na atividade enzimática foi equivalente a variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligramma de proteína (Söderhäll e Häll, 1984).

Análises estatística

Para avaliação da microbiologia do trato digestivo foi realizada uma análise de variância ao nível de significância de 0,05 com parcelas subdivididas no tempo com os tratamentos alimentados por 8 dias com dieta suplementada com *Lactobacillus* B6 ou com dieta sem suplementação. A atividades da enzima fenoloxidase (PO), contagem total de hemócitos (THC) e presença de bactérias na hemolinfa dos camarões foram avaliados por análise de variância bi-fatorial (2x2) com parcelas sub-divididas no tempo. Os níveis do fator A foram alimentado com ração suplementada com probiótico por 8 dias (P) ou controle (C) e o fator B inoculação com *V. harveyi* (V) ou com solução salina estéril (S). Quando encontradas diferenças significativas pela análise de variância, foi realizado o teste Tukey de separação ao nível de significância de 0,05. Os resultados das contagens microbianas do trato digestivo do tratamento com probiótico foram avaliados por regressão exponencial e os resultados do tratamento probiótico inoculado com *V. harveyi* por regressão linear para THC e atividade da PO.

Os dados de contagens microbiológicas e, de THC foram transformados para $\log(x+1)$ para homogeneização da variâncias antes de serem analisados. Os dados estão expressos em média \pm Erro Padrão ($\bar{x} \pm EP$).

RESULTADOS

Durante todo o período do experimento não foi observada mortalidade de nenhum dos camarões mesmo após as inoculações com *V. harveyi*.

Microbiologia do trato digestivo

Não foi observada diferença significativa na contagem total de bactérias no trato digestivo dos camarões em nenhuma das avaliações (Figura 5a). A contagem de vibrios e enterobactérias foi significativamente superior ($p < 0,05$) no controle (C) em relação ao grupo alimentado por 8 dias com dieta suplementada com probióticos (P) nos dias 0 e 2 (Figura 5b), igualando-se nas avaliações posteriores ($p > 0,05$). Foi observado um crescimento exponencial na contagem de vibrios e enterobactérias no tratamento com probióticos após a substituição da ração suplementada com probióticos pela ração sem probiótico ($R^2 = 0,82$, $y = 4,3802e^{0,0928x}$).

A contagem de bactérias lácticas no trato digestivo dos camarões foi significativamente superior nos animais alimentado com ração suplementada com probióticos até o dia 4 ($p < 0,05$), não havendo diferenças significativas a partir do dia 6 (Figura 5c). As colônias observadas por microscopia, após coloração de Gram, crescidas dos camarões que foram alimentados com probióticos, eram formadas de bacilo-cocos Gram positivos agrupados de 2 em 2, morfologia semelhante às bactérias utilizada como probiótica. Já as colônias crescidas dos camarões que não foram alimentados com probióticos, eram formadas por diferentes tipos de bactérias Gram positiva sendo a maioria tipo cocos. O trato digestivo dos camarões cuja dieta foi suplementada com probiótico apresentou uma queda exponencial ($y = 7,949e^{-0,4326x}$, $R^2 = 0,96$) na contagem de bactérias probióticas após substituição por ração sem probiótico.

Presença de bactérias na hemolinfa

Nos camarões inoculados com *V. harveyi* a contagem de bactérias na hemolinfa variou de $3,3 \times 10^1$ até $1,8 \times 10^3$ UFC/mL, e não houve diferença significativa ente os camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos e o controle em nenhuma das avaliações ($p > 0,05$). As colônias de bactérias crescidas da hemolinfa eram sacarose negativas e formadas por vibrios Gram negativos semelhantes aos do inoculo (*V. harveyi*). Não foi observada a presença de bactérias na hemolinfa dos camarões inoculados com SSE.

Contagem total de hemócitos (THC)

Os camarões inoculados com *V. harveyi* apresentaram a THC inferior ($p < 0,05$) aos animais inoculados com SSE, com os valores respectivos de 11000 ± 3200 e 17000 ± 300 células/mm³. No dia 0, o THC dos camarões alimentado com ração suplementada com probiótico por 8 dias (PS) e

controle (CS) inoculado com solução salina e os camarões do tratamento probiótico (PV) inoculado com *V. harveyi* não diferiram entre si e foram superiores aos animais do controle (CV) inoculado com *V. harveyi* ($p < 0,05$). Este mesmo comportamento foi observado na avaliação do dia 2 e 4. Já nos dias 6 e 8, os animais PS e CS não apresentaram diferenças entre as suas médias de THC que foram superiores a dos camarões dos tratamentos PV e CV (Figura .6a).

A THC dos animais do tratamento PV apresentou uma queda linear com o passar dos dias ($y = -1898,8x + 117482$, $R^2 = 0,75$) com a retirada da alimentação suplementada com probióticos. Os demais tratamentos não apresentaram tendências significativas de acréscimo ou decréscimo no THC nas avaliações nos diferentes dias (Figura 6a).

Atividade da enzima fenoloxidase (PO)

A atividade da PO variou de 20 a 57 $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹, e os camarões que foram inoculados com *V. harveyi* apresentaram uma atividade da PO superior ao dos camarões inoculados com solução salina estéril ($p < 0,05$), com os valores respectivos de $38,0 \pm 1,4$ e $28,0 \pm 0,7$ $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. Não foi observada diferença significativa entre os camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos e controle nos diferentes dias ($p > 0,05$). Porém, foi observada uma queda linear no tratamento PV ($y = -6,57x + 66,1$, $R^2 = 0,67$) com o passar dos dias. Os demais tratamentos não apresentaram tendências significativas de queda ou acréscimo na atividade da PO nas avaliações dos diferentes dias (Figura 6b).

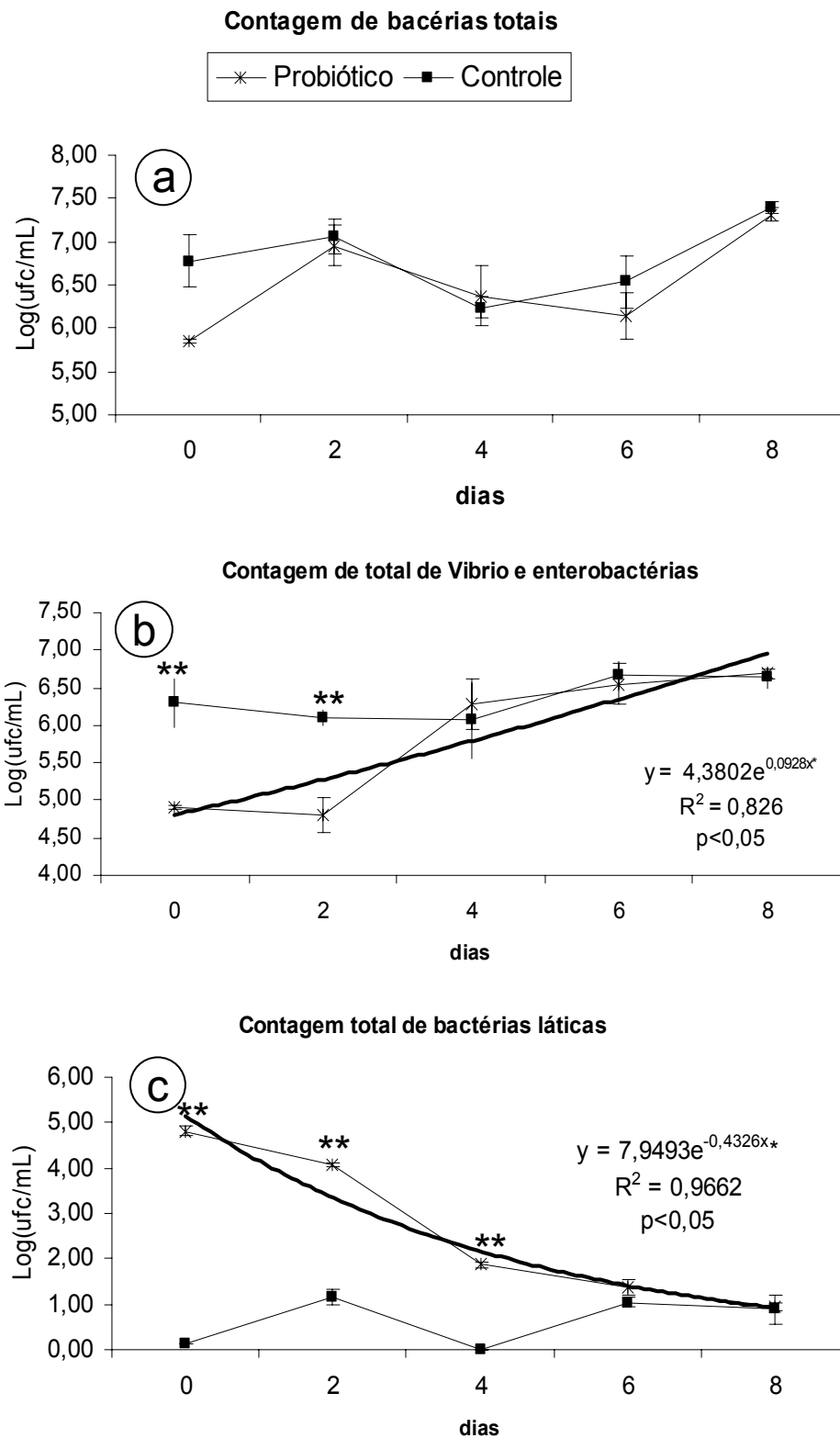


Figura 5: Contagens microbiológicas do trato digestivo dos camarões após a substituição do fornecimento de alimentação suplementada com probióticos por ração sem probióticos (probiótico) e do trato digestivo dos camarões alimentados com ração sem a adição de probióticos (controle): a) bactérias totais em Agar Marine, b) vibrio e enterobactérias totais em Agar TCBS e c) bactérias lácticas totais em Agar MRS. Cada ponto representa a média de 4 pools de 3 camarões \pm EP.

* Todos os coeficientes são significativos pelo teste t.

** Diferenças significativas pelo teste tukey de separação de médias ($p < 0,05$).

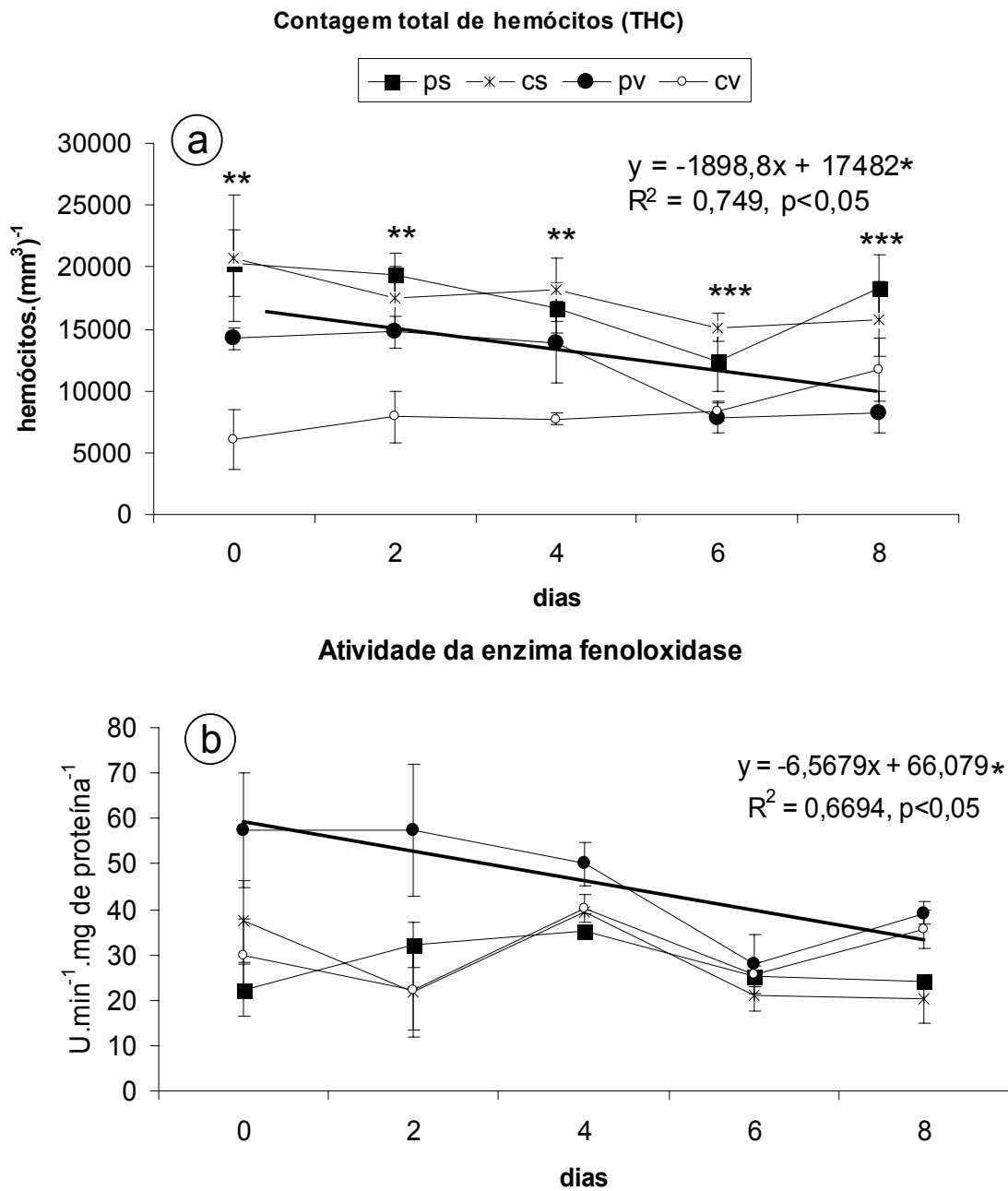


Figura 6: Contagem total de hemócitos (a) e atividade da enzima fenoloxidase (b) 3 horas após a injeção de *V. harveyi* e solução salina 1,5% estéril em camarões após a retirada da alimentação suplementada com probióticos e de camarões alimentados com ração sem a adição de probióticos. PS: alimentado com probiótico e inoculado com solução salina; PV: alimentado com probiótico e inoculado com *V. harveyi*; CS: alimentado com ração sem adição de probióticos e inoculado com solução salina estéril; CV: alimentado com ração sem adição de probióticos e inoculado com *Vibrio harveyi*. Cada ponto representa a média de 4 pools de 3 camarões \pm EP.

* Todos os coeficientes são significativos pelo teste t ($p < 0,05$).

** Tratamento PS=CS=PV e diferentes de CV pelo teste tukey de separação de médias ($p < 0,05$).

*** tratamento PS=CS e diferentes de PV=CV pelo teste tukey de separação de médias ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A flora bacteriana intestinal de organismos aquáticos, ao contrário dos organismos terrestres, é constituída predominantemente por bactérias Gram-negativas (Leaño et al., 1998, Gomez-Gil et al., 1998, Vine et al., 2006). Esta composição pode mudar bruscamente frente a mudanças ambientais (Ringo et al., 1997), escassez de algum nutriente (Ringo e Gatesoup, 1998) ou pelo uso de bactérias probióticas (Rengpipat et al., 1998).

O fornecimento de bactéria probióticas Gram-positivas na alimentação pode diminuir a presença de bactérias do gênero *Vibrio* no trato digestivo de camarões (Ziaei-Nejad et al., 2006). Este fato parece se confirmar neste trabalho, cujo resultado sugerem que a bactéria *Lactobacillus* B6 fornecida na alimentação diminui a carga de vibrios e enterobactérias no trato digestivo dos camarões, apesar de não ter influenciado a contagem total de bactérias. Esta modificação pode trazer vantagem para os camarões, uma vez que existem indícios que a flora bacteriana de camarões dominada por vibrios pode prejudicar o crescimento dos animais (Yasuda e Kitao, 1980).

A inibição da proliferação de bactérias, resultante do fornecimento das cepas probióticas na alimentação normalmente esta relacionada à produção de compostos inibitórios (Vaseeharan e Ramasamy, 2003, Ramirez et al, 2006) ou à competição exclusiva (Gomez-Gil et al., 2000). Li et al., (2006) reportaram que o uso da bactéria probiótica *Arthrobacter* XE-7 teve um efeito inibitório em *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* e em *V. nereis* semelhante ao do antibiótico Cloramfenicol. As bactérias lácticas são produtoras de diversas substâncias bactericidas de alto (Bacteriocinas) e baixo peso molecular (Reuterim) que podem estar associadas aos resultados inibitórios observados neste trabalho (Ringo e Gatesoup, 1998). Contudo, a bactéria *Lactobacillus* B6 parece não ter uma grande capacidade de competição exclusiva, uma vez que após 4 dias da substituição do fornecimento de ração suplementada com probiótico por ração comercial não foi observada diferença entre a quantidade de vibrios e enterobactérias do trato digestivo dos camarões que haviam sido alimentados com probióticos e do controle. No sexto dia de avaliação, as bactérias lácticas representavam apenas uma pequena quantidade da população total de bactérias do trato digestivo, não sendo diferente do tratamento controle, confirmando a baixa capacidade de competição desta cepa. O tempo de permanência de uma bactéria no trato digestivo é influenciado por diversos fatores, entre eles os componentes da dieta alimentar (Ringo e Gatesoup, 1999). Assim, a inclusão na dieta de substratos para o crescimento de bactérias lácticas (pré-bióticos), pode aumentar o tempo de permanência desta cepa no trato digestivo dos camarões.

Os camarões possuem um sistema imunológico *inato* ou *natural* não específico, com respostas imunes celulares e humorais atuando de forma integrada, protegendo-o da invasão por microorganismos e garantindo a sua integridade corpórea (Bachère, 2003, Barracco, 2004). Esta ação integrada do sistema imune diminui de forma eficiente à concentração de bactérias injetadas diretamente na hemolinfa (Martin et al., 1993, Van de Braak et al., 2002b). A contagem total de hemócitos (THC) é um dos parâmetros mais utilizados para descrever o estado de saúde em crustáceos (Perazzolo e Barracco, 2002). Observou-se neste experimento que a THC dos camarões inoculados com *Vibrio harveyi* foi inferior a dos camarões injetados com SSE. Este resultado parece

estar associado a uma resposta inflamatória dos hemócitos que migram para a região da inoculação, saindo assim da circulação (Lorenzon et al., 2002; Van de Braak et al., 2002b). Adicionalmente, os hemócitos podem se agregar formando varias camadas que aprisionam microorganismos em seu interior (Barracco, 2004) e que podem ser retirados de circulação pelas brânquias por processos mecânicos (Martin et al., 2000). Os hemócitos podem também se fixar em outros órgãos como órgão linfóide (Van de Braak et al., 2002b) e hepatopâncreas (Alday-Sans et al., 2002), diminuindo assim o número de hemócitos circulantes.

Observou-se neste trabalho que a queda na contagem de hemócitos dos camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos e inoculados *V. harveyi* foi inferior ao dos animais do controle inoculados com a mesma bactéria nos dias 0, 2 e 4. Este resultado pode estar relacionada a uma reposição mais rápida dos hemócitos na circulação pelo tecido hematopoiético (Van de Braak et al., 2002a) dos camarões cuja dieta foi suplementada com *Lactobacillus* B6. Outra possibilidade pode estar relacionada a uma reação mais rápida dos hemócitos para combater a infecção, resultando em uma menor queda na quantidade de hemócitos circulantes após 3h.

Sabe-se que o sistema proPO é ativado por quantidades mínimas de lipopolissacarídeos (LPS) de parede celular de bactérias Gram negativas, culminando na ativação da proPO em enzima ativa PO, que por sua vez resulta na produção de melanina (Sritunyalucksana e Söderhäll, 2000). A maior atividade da PO nos animais inoculados com *V. harveyi* pode estar relacionado a produção de enzimas PO após a inoculação com a bactéria patogênica. Inúmeros trabalhos têm relatado mudanças na atividade da PO em camarões submetidos a tratamento com imunestimulantes (Xuxiong et al., 2006; Yeh et al., 2006) e probióticos (Rengpipat et al., 2000 e GULLIAN et al., 2004). Porém, embora fosse observada uma tendência da PO dos camarões alimentados com dieta suplementada com probióticos e inoculados *V. harveyi* ser superior nas avaliações dos dias 0 e 2, não foi possível detectar diferenças na PO de camarões alimentado ou não com dieta suplementada com probiótico, possivelmente devido a grande variação nos valores da atividade desta enzima.

Muitas das bactérias do gênero *Vibrio* são produtoras de exotoxinas, como proteases, lipases e hemolisinas (Austim e Zhang, 2006), que podem imunodeprimir os camarões. Assim, o aumento exponencial da carga de *Vibrio* e enterobactérias no trato digestivo dos camarões, após a substituição do fornecimento de dieta suplementada com *Lactobacillus* B6 por dieta sem probióticos pode estar relacionado à queda linear observada na THC e na atividade da PO deste tratamento após a inoculação com *Vibrio harveyi*. Este resultado pode ser também consequência da queda exponencial na contagem de bactérias lácticas no trato digestivo destes camarões, uma vez que as bactérias lácticas são conhecidas pela produção de compostos extracelulares que estimulam respostas imunes não específicas (Ringo e Gatesoupe, 1998). Itami et al., (1998) reportaram que o uso na alimentação com o peptidoglicanas, isoladas da bactéria láctica *Bifidobacterium thermophilum*, na alimentação melhorou os índices imunológicos de *Marsupenaeus japonicus* e a resistência destes camarões à infecção por *V. penaeicida*. As peptídiosglicanas da parede celular do *Lactobacillus* B6 também podem ser as responsáveis pela imunoestimulação, e com a queda da população desta bactéria, pode ter havido a queda na resposta imune.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a cepa de bactéria *Lactobacillus* B6 suplementada na dieta de camarões resulta em uma diminuição da carga de vibrios e enterobactérias no trato digestivo de *Litopenaeus vannamei*, modificando a respostas da contagem total de hemócitos após a inoculação com *V. harveyi*. Contudo, o tempo de atuação desta cepa na flora bacteriana do trato digestivo de *Litopenaeus vannamei*, e sua possível atuação como imunoestimulante após a substituição da dieta suplementada com *Lactobacillus* B6 por dieta sem suplementação foi de apenas 6 dias. Assim, o fornecimento contínuo de dieta suplementada com a cepa *Lactobacillus* B6 aos camarões parece ser a melhor estratégia para manter a quantidade de vibrios e enterobactérias no trato digestivo dos camarões baixa e manter o animais imunoestimulados.

AGRADECIMENTOS

Somos agradecidos à professora Cristina Ramirez pela assistência nas técnicas microbiológicas, ao professor Maurício Laterça Martins da UFSC pela utilização da estrutura do laboratório de Patologia/UFSC, a professora Carla Bonetti da UFSC pela utilização dos equipamentos do Laboratório de Oceanografia Costeira, ao aluno de mestrado do curso de aqüicultura da UFSC Delano Sheleder pelo auxílio nas técnicas imunológicas, a CAPES pela bolsa de estudos fornecida ao aluno Felipe do Nascimento Vieira e a Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS

- Abrahama, T.J., Palaniappan, R. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India, *Aquaculture*, 232, 81–90.
- Alday-Sanz, V., Roque, A., Turnbull, J.F., 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 48, 91–99.
- Austin, B., Zhang, X.H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 119–124.
- Bachère, E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*, 227, 427–438.
- Barracco, M.A. 2004. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos, In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A..P. (Eds), *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Editora Varela, São Paulo, pp. 49 – 72.
- Boyd, C.E., Massaut, L. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture, *Aquaculture*, 20, 13–132.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248– 254.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. A medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 23, 130–135.
- Fooks, L. J., Gibson, G. R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *Brit J Nutr*, 1, 39–49.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147–165.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., Decker, S. 2006. Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*, *Aquaculture*, 253, 105–113.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. E Turnbull, J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191, 259–270.
- Gomez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Inglis, V., Guerra-Flores, A.L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus Vannamei*. *Aquaculture*, 163, 1–9.
- Gullian, M., Thompson, F. E Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233:1–14.

- Hauton, C., Williams, J.A., Hawkins, E., 1997. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 211,115– 128.
- Itami, T, Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. E Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164, 277-288.
- Karunasagar, I., PAI, R., Malathi, G.R., E Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128, 203-209.
- Leaño, E.M., Lavilla-Pitogo, C.R., Paner, M.G. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. Aquaculture, 164,367–374.
- Li, J.,Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Xu, W., Liufu, Z., Ma, H., 2006. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios, Aquaculture, 253, 140-147.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture, 164:201–220.
- Lorenzon, S., Pasqual, P., Ferrero, A., 2002. Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaeomon elegans*, Fish Shellfish Immun., 13, 27-45.
- Marin, G.G., Quintero, M., Quigley, M., Khosrovian, H., 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. J. of Crustac. Biol., 20, 209–217.
- Martin, G.G., Poole, D., Hose, J.E., Arias, M., Reynolds, L., McKrell, N., whang, A., 1993. Clearance of Bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. of Invertebr. Pathol., 62, 3008-315.
- Nappi, A.J., Vass, E., 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. Pigment. Cell. Res., 6, 117–126.
- Pasharawipas, T., Thaikua, S., Sriurairatana, S., Ruangpan, L., Direkbusarakum, S., Manopvisetcharean, J., Flegel, T.W., 2005. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand, Virus Research, 114,63–69.
- Perazzolo L. M., Barracco, M.A., 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunol., 21, 385-395.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, 214, 19-33.

- Pérez-Farfante, J., Kensle, B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Key of Diagnoses for the Families and Genera. NOAA, Washington. 233 pp.
- Ramírez, C., Bolívar, A., Ciffoni, G.A., Pancheniak, E.M.G., Soccol, E.F.R. C. 2006. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico, **La Alimentación Latino Americana**, 264, p.70-78.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. E Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167,301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. E Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191, 271-288.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.O.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160, 177–203.
- Ringo, E., Olsen, R.E., Overli, O., Lovik, F., 1997. Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Res*, 28, 901–904,
- Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta.*, 797, 99–104.
- Song, Y.L., Cheng, W., Wang, C.H. 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured Shrimp in Taiwan, *J. of Invertebr. Pathol*, 61,24-31.
- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans, *Aquaculture*, 191,53–69.
- Sung, H.H.; Li, H.C.; Tsai, F.M.; Ting, Y.Y.; Chão, W.L. 1999. 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.*, 236,261–271.
- Van De Braak, C.B., Botterblom M.H., Liu, W., Taverne N., Van Der Knaap W.P., Rombout, J.H., 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Fish Shellfish Immunol*, 12, 253-272.
- Van De Braak, C.B.T., Botterblom, M.H.A., Taverne, N., Van Muiswinkel, W.B., Rombout, J. H. W. M., Van Der Knaap, W.P.W. 2002a. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp, *Fish Shellfish Immunol*, 13, 293–309.
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H.S., Swings, J., 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis*/ Crustacea: Decapoda larvae in Chinese shrimp hatcheries, *Aquaculture*, 169,121–132.

- Vaseeharan, B., Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol., 36, 83–87.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., 2004. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquac. Res., 35, 501-507.
- Vieira, F.N., Pedrotti, F.S., Buglione, C.C., Mouriño, J.L.P., Beltrame, E., Martins, M.L., Ramirez, C., Vinatea, L.A., 2006. Effect of use of acid-lactic probiotic bacterias in the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hatchery survival and microbiology of the water and larvae. B. J. Ocean. (in press).
- Vijayan, K.K., Bright Singh, I.S., Jayaprakash, N.S., Alavandi, S.V., Somnath-Pai, S., Preetha, R., Rajan, J.J.S., Santiago, T.C., 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquaculture, 251:192-200.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larvicultura, FEMS, 30, 404–427.
- Xuxiong, H., Zhou, H., Zhang, H., 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, Fish Shellfish. Immun., 20, 750-757.
- Yasuda, K., Kitao, T.. 1980. Bacterial flora in the digestive tract on prawns *Penaeus japonicus*. Bate. Aquaculture, 19, 229-234.
- Yeh, S.T., Lee, C.S., Chen, J.C., 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Fish Shellfish. Immun., 20, 332-345.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., 2006. Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., Shakouri, M., The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*, Aquaculture, 252:516– 524.

REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO

ABRAHAMA, T.J.; PALANIAPPAN, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India, **Aquaculture**, v.232, p.81–90, 2004.

ALAVANDI, S.V.; VIJAYAN, K.K.; SANTIAGO, T.C.; POORNIMA, M.; JITHENDRAN, K.P.; ALI, S.A.; RAJAN, J.J.S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, p.115-120, 2004.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**, John Wiley & Sons, West Sussex, 364 p., 1987.

AUSTIN, B.; ZHANG, X.H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates, **Letters in Applied Microbiology**, v.43, p.119–124, 2006.

BACHERÉ, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Identification of defence parameters in the haemolymph of crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus*, prospects and applications, **Fish Shellfish Immunology**, v.5, p.597:612, 2000.

BARRACCO, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos, In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M. de los A.P. (Eds) **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Editora Varela, p. 49 – 72, 2004.

BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture, **Aquaculture**, v.20, p.13-132, 1999.

Buglione, C.C.; Vieira, F.N; Martins, M.L.; Pedrotti, F.S; Schweitzer, R.; Jatobá, A.; Beltrame, E. ¹; Mouriño, J.L.P. Teste de patogenicidade de cepa isolada de hemolinfa de reprodutores de *Litopenaeus vannamei*, IN: ANAIS DO IX ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Maceió, 2006a, meio eletrônico.

CHENG, S.Y.; HSU, S.W.; CHEN, J.C.; Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*, **Fish & Shellfish Immunology**, in press, 2006.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the Cultivation of Lactobacilli, **J. Appl. Bact.**, v.23, p.130-135, 1960.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHERÉ, E. Peneidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei*, **The journal of Biological Chemistry**, v.272, p.28398-28406, 1997.

FARZANFAR, A.; The use of probiotics in shrimp aquaculture, **Federation of European Microbiological Societies**, in press, 2006.

FULLER R., Probiotics in man and animals, a review, **J. Appl. Bacteriol**, v.66, p.365–378, 1989.

GARGIONI, R.; BARRACCO, M.A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, 236:209-221, 1998.

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

LE MOULLAC, G.; SOYEZ, C.; SAULNIER, D.; ANSQUER, D.; AVARRE, J.C.; LEVY, P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish and Shellfish Immunology**, 8: 621-629, 1998.

VARGAS-ALBORES, F.; HINOJOSA-BALTAZAR, P.; PORTILLO-CLARK, G.; MAGALLÓN-BARAJAS, F. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. **Aquaculture Research**, 29:549-553. 1998.

PINHEIRO, V.B.; ELLAR, D.J. How to kill a mocking bug?. **Cellular Microbiology**, 8(4):545-557, 2006.

GARCIA, A.F.; MASSAM, J.P.; Elimination of antibiotic in hatcheries while improving production levels by use of probiotic, **Word Aquaculture**, v.25, p.57-59, 2005.

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

GEORGE, M.R.; JOHN, K.R.; IYAPPAN, T.; JEYASEELAN, M.J.P. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting, **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.369–372, 2005.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotic, **Journal of Nutrition**, v.125, 1401-1412, 1995.

GOARANT, C.; ANSQUER, D.; HERLIN, J.; DOMALAIN, D.; IMBERT, F.; DECKER, S. Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*, **Aquaculture**, v.253, p.105-113, 2006.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A. E 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.

GRIFFITH, D.R.W. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: Lavens, P.; Jaspers, E.; Roelands, I., **Larvi '91 — fish and crustacean larviculture symposium**, Editors, European Aquaculture Society, Gent, p. 478 Special publication no. 24. 1995.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F. E RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*, **Aquaculture**, v.233, p.1-14, 2004.

HAUTON; C.; WILLIAMS; J.A.; HAWKINS; E.; The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.211, p.115– 128, 1997.

JOHANSSON, M.W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v.191, p.45-52, 2000.

KANG, D., LIU, G., LUNDSTROM, A., GELUIS, E., STEINER, H. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.10078–10082, 1998.

KARUNASAGAR, I., PAI, R., MALATHI, G.R., E KARUNASAGAR, I. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection, **Aquaculture**, v.128, p.203-209. 1994.

KAUTSKY, P.; RÖNBÄCK, M.; TEDENGREN E TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming, **Aquaculture**, v.191, p.145–161, 2000.

LEE, W.J., LEE, D.J., KRAVCHENKO, V.V., ULEVITCH, R.J., BREY, P.T. Purification and molecular cloning of an inducible Gram negative bacteria-binding protein from the silkworm *Bombyx mori*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.7888–7893, 1996.

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

LIGHTNER, D.V.; Redman, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods, **Aquaculture**, v.164, p.201–220, 1998.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, **Science**, v.147, p.747–748, 1965.

LIN, H.Z.; GUO, Z.; YANG, Y.; ZHENG, W.; LI, Z.J. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, **Aquaculture Research**, v.35, p.1441-1447, 2004.

LIU, C.H.; CHEN, J.C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*, **Fish & Shellfish Immunology**, v.16, p.321-34, 2004.

MAEDA, M.; LIAO, C.I., Microbial processes in aquaculture environment and their importance for increasing crustacean production, **Jap. Agr. Res**, v.28, p.283–288, 1994.

MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. The concept of biological control methods in aquaculture, **Hydrobiologia**, v.358, p.285–290, 1997.

MARTIN, G.G.; POOLE, D.; HOSE, J.E.; ARIAS, M.; REYNOLDS, L.; MCKRELL, N.; WHANG, A. Clearance of Bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*, **Jornal of Invertebrated Pathology**, v.62, p.3008-315, 1993.

MEUNPOL, O.; LOPINYOSIRI, K.; MENASVETA, P. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), **Aquaculture**, v.220, p.437-448, 2003.

MONTGOMERY, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Role of chitinbinding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin, **Appl Environ Microbiol**, 59:373–379, 1993.

MUÑOZ, M.; CEDEÑO, R.; RODRIGUEZ, J.; VAN DER KNAAP, W.P.W.; MIALHE, E.; BACHERE, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*, **Aquaculture**, v.191, p.89–107, 2000.

NAPPI, A.J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions, **Pigment Cell Research**, v.6, p.117-126, 1993.

PADILHA, P.J.M. **Efeito da utilização de probiótico sobre aspectos microbiológicos e parâmetros de qualidade da água e produtividade aquática em viveiros de cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*)**, 2005, Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

PASHARAWIPAS, T.; THAIKUA, S.; SRIURAIRATANA, S.; RUANGPAN, L.; DIREKBUSARAKUM, S.; MANOPVISETCHAREAN, J.; FLEGEL, T.W. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand, **Virus Research**, v.114, p.63–69, 2005.

PERAZZOLO L. M.; BARRACCO, M.A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors, **Developmental & Comparative Immunology**, v.21, n.5, p.385-395, 1997.

PERAZZOLO, L.M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCOA, M.A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress, **Aquaculture**, v.214, p.19-33, 2002.

RAMIREZ, C. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**, 2005, Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G.A.; PANCHENIAK, E.M.G.; SOCCOL, E.F.R. C. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico, **La Alimentación Latino Americana**, v.264, p.70-78, 2006

RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W; PIYATIRATITIVORAKUL, S. E MENASVETA, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v.167, p.301-313, 1998.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. E MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p.271-288 , 2000.

RINGO, E.; GATESOUBE, F.O.J., Lactic acid bacteria in fish: a review, **Aquaculture**, v.160, p.177–203, 1998.

ROBERTSON, P.A.W.; CALDERON, J.; CARRERA, L.; STARK, J.R.; ZHERDMANT, M.; AUSTIN, B. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae, **Dis Aquat Org**, v.32, p.151–155, 1998.

RODRIGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp, **Aquaculture**, v.108, p.1043-1050, 2000.

SHARIFF, M.; YUSOFF, F.M.; DEVARAJA, T.N.; SRINIVASA RAO, P.S. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), ponds, **Aquaculture Research**, v.32, p.181-187, 2001.

SKJERMO, J. E VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae, **Aquaculture**, v.177, p.333-343, 1999.

SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity, **Current Opinion in Immunology**, v.10, p.23-28, 1998.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean Immunity. **Annual Review of Fish Disease**, v.2, p.3-23, 1992.

SÖDERHÄLL, K.; ROGENER, W.; SÖDERHÄLL, I., NEWTON, R.P., RATCLIFFE, N.A. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1,3-glucan, **Insect Biochem.**, v.32, p.323–330, 1988.

SONG, Y.L.; CHENG, W.; WANG, C.H. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for cultured Shrimp in Taiwan, **Journal of Invertebrate Pathology**, v.61, p.24-31, 1993.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans, **Aquaculture**, v.191, p.53–69, 2000.

SUNG, H.H.; LI, H.C.; TSAI, F.M.; TING, Y.Y.; CHÃO, W.L. 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, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.236, p.261–271, 1999.

VAN DE BRAAK, C.B.T.; BOTTERBLOM, M.H.A.; HUISMAN, E.A.; ROMBOUT, J.H.W.M.; VAN DER KNAAP, W.P.W. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*, **Diseases of Aquatic Organisms**, v.51, p.149–155, 2002b.

VAN DE BRAAK, C.B.; BOTTERBLOM, M.H.A.; TAVERNE, N.; VAN MUISWINKEL, W.B.; ROMBOUT, J.H.W.M.; VAN DER KNAAP, W.P.W. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v.13, p.293-309, 2002a.

VANDENBERGHE, J.; LI, Y.; VERDONCK, L.; LI, J.; SORGELOOS, P.; XU, H.S.; SWINGS, J.; Vibrios associated with *Penaeus chinensis*/ Crustacea: Decapoda larvae in Chinese shrimp hatcheries, **Aquaculture**, v.169, p.121–132, 1998.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*, **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.83–87, 2003.

VAZQUEZ, J.A.; GONZALEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish, **Aquaculture**, v.245, p.149–161, 2005.

VAZQUEZ, L., JARAMILLO, L., LASCURAIN, R., COOPER, E.L., ROSAS, P., ZENTENO, E. Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*, **Comp. Biochem. Physiol**, v.113, p.355–359, 1996.

VENKAT, H.K.; SAHU, N.P.; JAIN, K.K. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), **Aquaculture Research**, v.35, p.501-507, 2004.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000.

VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; PEDROTTI, F.S.; BELTRAME, E.; MOURIÑO, J.L.P. Metodología para suplementação de bactérias probióticas em náuplius de *Artemia sp.* IN: ANAIS DO IX ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Maceió, 2006a, meio eletrônico.

VIEIRA, F.N.; MOURINO, J.L.P.; BUGLIONE, C.C., RAMIREZ, C.; BELTRAME, E.; PEDROTTI, F.S.; VINATEA, L.A. Avaliação da capacidade de cepas de bactérias lácticas isoladas de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) NO sul do Brasil na inibição *in vitro* de *Vibrio harveyi*, IN: RESÚMENES DO V SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, URUGUAI, 2005, p.401-401.

VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; BELTRAME, E.; MARTINS, M.L.; RAMIREZ, C.; VINATEA, L.A. Effect of use of acid-lactic probiotic bacterias in the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hatchery survival and microbiology of the water and larvae, **Brazilian journal of oceanography**, in press, 2006.

VIJAYAN, K.K.; BRIGHT SINGH, I.S.; JAYAPRAKASH, N.S.; ALAVANDI, S.V.; SOMNATH-PAI, S.; PREETHA, R.; RAJAN, J.J.S.; SANTIAGO, T.C. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems, **Aquaculture**, v.251, p.192-200, 2006.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of fish candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus, **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.145-152, 2004.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; Probiotics in marine larviculture, **Federation of European Microbiological Societies**, v.30, p.404–427, 2006.

WANG, F.I.; CHEN, J.C.; The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress, **Aquaculture**, v.258, p.34–41, 2006.

WANG, Y.B.; XU, Z.R.; XIA, M.S. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds, **Fisheries Science**, v.71, p.1036–1041, 2005.

ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M.H.; TAKAMI, G.A.; Lovett, D.L.; Mirvaghefi, A.R.; Shakouri, M.; The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*, **Aquaculture**, v.252, p.516– 524, 2006.