



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Flocos microbianos como fonte de bactérias probióticas para o cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Walter Quadros Seiffert
Coorientador: José Luiz Pedreira Mouriño

Gabriela Soltes Ferreira

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Gabriela Soltes

Flocos microbianos como fonte de bactérias probióticas para o cultivo de *Litopenaeus vannamei* / Gabriela Soltes Ferreira ; orientador, Walter Quadros Seiffert ; coorientador, José Luiz Pedreira Mouriño. - Florianópolis, SC, 2014.

55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Bioflocos. 3. *Bacillus* sp. 4. Probiótico. 5. Camarão. I. Seiffert, Walter Quadros. II. Mouriño, José Luiz Pedreira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Flocos microbianos como fonte de bactérias probióticas para o cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Por

GABRIELA SOLTES FERREIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dr. Walter Quadros Seiffert – *Orientador*

Dra. Cleide Rosana Werneck Vieira

Dr. Edegar Roberto Andreatta

Dra. Katt Regina Lapa

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me dar a vida e trilhar o meu caminho, por não me deixar perder a Fé e acreditar que são os desafios que nos movem.

Ao meu exemplo de vida, dedicação e esforço, minha mãe, que sem ela nada disso seria possível, Obrigada mãe!

Ao meu porto seguro, minha irmã, por existir e me guiar com os seus conselhos e leito em todos os momentos. Amo você irmã!

A minha Tia, que mesmo de longe, nunca deixou de rezar por mim e por me apoiar a ser cada vez melhor.

Ao meu cunhado pelas palavras sábias e por fazer parte da nossa pequena grande família. Obrigada!

Ao meu namorado, que mesmo com tantas responsabilidades, nunca me deixou sozinha, nossa parceria é o que me fortalece a cada dia, Obrigada amor!

As minhas amigas de longa jornada Beatriz, Joanna, Erica, Vandressa, Shana, Elisa, Paula e Tati pelos desabafos, pelos momentos divertidos, pelo companheirismo e por ver que a cada dia somos mais mulheres, trilhando diferentes caminhos, mas não perdendo a essência da nossa amizade. Obrigada suas lindas!

As amigas e parceiras dessa jornada de dois anos, que valeram por uma vida, Mari, Norha, Josi, Scheila, Marysol, Jú, Jéssica, Karine, Marcela, Priscila, Gabi, Esmeralda, Cris, Ana, Isa. Vocês são mais do que mulheres são exemplo a ser seguido. Nunca desistam, eu acredito em vocês! Obrigada do fundo do coração, jamais esquecerei toda a dedicação e ajuda nessa caminhada.

Aos meus melhores amigos, Veck, Gustavo, Fê, que terão que chamar o chaveirinho de Mestre. Adoro vocês, obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos amigos da graduação, hoje engenheiros, Jeison, Ágata, Raquel, Alê, por não permitir que a distância afaste a amizade maravilhosa que criamos durante os quatro anos de curso.

Ao meu orientador, Walter, por acreditar no meu trabalho e me permitir fazer parte dessa grande equipe e família, que é o LCM.

Ao meu coorientador, Zé, pela amizade, pelos ensinamentos e conselhos durante todo o percurso desses três anos de microbiologia. E por me abrir portas na área de microbiologia, a qual, aprendi a amar e dedicar meus estudos.

Aos funcionários do Laboratório, Felipe, Carlos Manoel, Carlos Miranda, Davi, Ilsinho, Déia, Paulinho, João por me acolherem e ajudarem na realização deste trabalho, sem eles, nada seria possível.

Aos colegas de profissão e laboratório, Gabriel, Marcello, Efrayn, Douglas, Tárík, Bruno, que deixaram nossos cafés mais divertidos e garantiram a força bruta, quando foi necessário, o meu muito obrigada!

A empresa Comambio, pelo apoio financeiro na pesquisa e a Capes pelo incentivo da bolsa de estudo.

Ao laboratório de nutrição e toda sua equipe, por não medir esforços para nos ajudar a completar mais uma etapa do projeto, em especial ao Lula, Fernando, Sabrina e Camila, vocês são grandes profissionais.

A Universidade Federal de Campinas, pela agilidade na entrega dos relatórios.

"Um erro é a coisa mais valiosa
que se pode fazer. Não se
aprende nada sendo perfeito."
(Adam Osborne)

RESUMO

Objetivou-se isolar e identificar bactérias do gênero *Bacillus* sp. oriundas do sistema de cultivo superintensivo com flocos microbianos de *Litopenaeus vannamei* e avaliar seu potencial nos parâmetros de qualidade de água, zootécnicos e imunológicos quando adicionados na água e em dietas práticas. Os *Bacillus* spp. isolados foram avaliados *in vitro* quanto a capacidade de inibir patógenos, atividade antagonista e produção de protease. *In vivo*, os *Bacillus* spp. foram adicionados na água para avaliar a formação e manutenção de flocos microbianos no cultivo de pós-larvas e depois foram incorporados em dietas formuladas, afim de verificar o desempenho zootécnico e parâmetros hematoimunológicos do *L. vannamei* durante 42 dias. Foram isoladas quatro bactérias do sistema superintensivo de flocos microbianos (*Bacillus thuringiensis* CPQBA 571-12 DRM 06, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 08 e *Bacillus cereus* CPQBA 571-12 DRM 09). O *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07 foi o único isolado que apresentou característica inibitória *in vitro* frente ao patógeno *V. alginolyticus* com halo de inibição de 20 mm de diâmetro. Todos os isolados foram capazes de produzir protease e não apresentaram atividade antagonista entre eles. Para o ensaio de formação e manutenção de agregados microbianos gerados no sistema superintensivo de cultivo de pós-larvas foi observada diferença significativa ($p=0,017$) na contagem microbiológica da água no sétimo dia de ensaio, onde a contagem total de *Vibrio* spp. na água foi inferior nos grupos tratados com *Bacillus* spp. (1×10^4 UFC.mL⁻¹) e com o produto comercial Comambio (1×10^4 UFC.mL⁻¹) do que no controle, não houve diferença estatística na contagem total de bactérias heterotróficas viáveis ($p=0,62$). Já no ensaio de engorda a suplementação com *Bacillus* spp. não afetou o desempenho zootécnico dos camarões. Entretanto nos parâmetros imunológicos houve diferença significativa ($p<0,05$), as cepas de *Bacillus* spp. foram capazes de aumentar a contagem total de hemócitos, o título aglutinante do soro, as proteínas totais no soro e diminuir a atividade da fenoxidase (PO) da hemolinfa. Também foi observado um aumento ($p<0,05$) na produção intracelular de ânion superóxido estimulados pela laminarina (β -1,3 glicanas) e PMA (*Phorbol myristate acetate*) comparados ao basal. Conclui-se que as bactérias Gram-positivas, *Bacillus* spp. isoladas dos bioflocos microbianos, são importantes para o cultivo de *L. vannamei* e para a manutenção da saúde e crescimento,

podendo ser utilizadas como probiótico ou como biocontroladoras em águas de sistemas de cultivos superintensivos.

Palavras-chave: Bioflocos, *Bacillus* sp., camarão, saúde, probiótico.

ABSTRACT

This study aimed to isolate and identify bacteria of the genus *Bacillus* sp. from the biofloc system with *Litopenaeus vannamei* and evaluate its potential in the parameters of water quality, zootechnical and immunological when added in water and diet. *Bacillus* spp. were evaluated *in vitro* for the inhibit pathogens, production of protease and antagonist activity. *In vivo*, *Bacillus* spp. were added in water and evaluated the formation and maintenance of microbial flocs in the cultivation of post-larvae. *Bacillus* spp. were incorporated into formulated diets, in order to verify the performance and immunology parameters of *L. vannamei* for 42 days. Four bacteria were isolated from biofloc (*Bacillus thuringiensis* CPQBA 571-12 DRM 06, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 08 e *Bacillus cereus* CPQBA 571-12 DRM 09). The *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07 was the only isolate that had inhibitory *in vitro* against pathogenic *V. alginolyticus* with zone of inhibition of 20 mm diameter. All isolates were able of producing protease and showed no antagonist activity between them. On seventh day significant difference ($p=0.017$) was observed in the microbial count in water, total count of *Vibrio* spp. in water was lower in the groups treated with *Bacillus* spp. (1×10^4 UFC.mL⁻¹) and the commercial product Comambio (1×10^4 UFC.mL⁻¹) than in the control, there was no statistical difference in the total count of viable heterotrophic bacteria ($p=0.62$). Supplementation with *Bacillus* spp. did not affect the growth performance of shrimp, but there was a significant difference ($p<0.05$) in immunological parameters, with the strains of *Bacillus* spp. able of increasing the total number of hemocytes, serum agglutinating, total serum protein, decrease the activity of phenoloxidase (PO) from the hemolymph and an increase ($p<0.05$) in the intracellular production of superoxide anion was observed stimulated by PMA (*Phorbol myristate acetate*) and laminarin (β -1,3 glucans) compared to basal. It is concluded that Gram-positive bacteria, *Bacillus* spp. isolated from microbial biofloc are important

for the growth of *L. vannamei* to keep health and growth, and may be used as probiotic or as biocontrol in biofloc.

Keywords: Biofloc, *Bacillus* spp., shrimp, health, probiotic.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1. Histórico do cultivo de camarão	15
1.2. Probióticos na Aquicultura	16
1.3. O Uso de <i>Bacillus</i> spp.....	16
1.4. Sistema Imunológico dos Crustáceos	18
2. OBJETIVOS:.....	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. FORMATAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	19
4. ARTIGO CIENTÍFICO	20
4.1. INTRODUÇÃO	23
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.2.1. Obtenção das cepas	24
4.2.2. Identificação molecular	25
4.2.3. Inibição de patógeno	26
4.2.4. Antagonismo entre as cepas isoladas	26
4.2.5. Produção de protease.....	27
4.2.6. Formação e manutenção de agregados microbianos (bioflocos) gerados no sistema superintensivo de cultivo de pós- larvas de camarão marinho.....	27
4.2.7. Delineamento Experimental	28
4.2.8. Experimento de engorda.....	29
4.2.9. Preparação do inoculo	30
4.2.10. Desempenho Zootécnico do camarão.....	30
4.2.11. Análise dos parâmetros físico-químicos.....	30

4.2.12. Parâmetros hemato-imunológicos	31
4.2.12.1. Coleta de hemolinfa para preparação do soro	31
4.2.12.2. Contagem total de hemócitos (CTH)	31
4.2.12.3. Atividade da fenoloxidase (PO)	31
4.2.12.4. Determinação do título aglutinante do soro	32
4.2.12.5. Concentração de proteínas totais no soro (CP)	32
4.2.12.6. Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido.....	32
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.4.1. Identificação molecular	33
4.4.2. Inibição de patógeno	34
4.4.3. Antagonismo entre as cepas isoladas	34
4.4.4. Produção de protease.....	35
4.4.5. Formação e manutenção de agregados microbianos (bioflocos) gerados no sistema superintensivo de cultivo de pós- larvas de camarão marinho.....	35
4.4.6. Parâmetros físico-químicos	37
4.4.7. Resultados Zootécnicos.....	37
4.4.8. Parâmetros hemato-imunológicos	39
4.5. CONCLUSÃO	42
4.6. REFERÊNCIAS.....	43
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6. REFERÊNCIA DA REVISÃO DA LITERATURA	51

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Histórico do cultivo de camarão

De acordo com a FAO (2012) a aquicultura é o segmento da produção de alimentos de origem animal com o crescimento mais rápido, tendo alcançado 60 milhões de toneladas em 2010, sendo a produção de crustáceos dominada pela espécie do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), responsável por 71,8% da produção mundial de todas as espécies de camarões marinhos cultivados.

O cultivo de camarões marinhos, denominada carcinicultura, teve início na década de 1930 com êxito no cultivo larval do camarão marinho da espécie *Marsupenaeus japonicus*. No entanto, Japão e Equador iniciaram as atividades no setor comercial somente em meados da década de 1960 e, posteriormente, os Estados Unidos na década de 1970. A propagação da criação de camarões marinhos teve como principal percussor a possibilidade da reprodução do ciclo de vida dos camarões peneídeos em condições de laboratório (TREECE, 2000).

A atividade de carcinicultura marinha no Brasil teve início na década de 1970 com a produção de algumas espécies de camarões peneídeos: *Marsupenaeus japonicus*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. brasiliensis* e *F. paulensis*. A fase comercial da carcinicultura obteve destaque no início da década de 1990 com a espécie exótica de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, sendo atualmente a espécie mais cultivada no Brasil e no mundo (SANTOS, 2009). Algumas características foram fundamentais para o sucesso do cultivo, como a sua excelente adaptabilidade às diversas condições de cultivo, facilidade de nutrição, manejo, e as suas altas taxas de produtividade e rentabilidade (SANTOS et al., 2009).

No entanto, com o rápido desenvolvimento do cultivo de *L. vannamei*, tanto no Brasil como no mundo, houve o aparecimento de surtos de doenças causadas pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), Vírus da Síndrome da Taura (TSV), Vírus da Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infeciosa (IHHNV), entre outros micro-organismos, os quais causaram perdas econômicas elevadas na indústria do camarão (LIGHTNER & REDMAN, 1998; BACHÈRE, 2000; BRIGGS et al., 2005).

Portanto, foi imprescindível adotar práticas de produção ambientalmente responsáveis, minimizando os impactos (BOYD & CLAY, 2002), tornando-os mais biosseguros com a utilização de larvas SPF (*Specific Pathogen Free* - camarões livres de patógenos específicos) e reduzindo as taxas de renovação de água, que exigiram

cuidados de monitoramento e gerenciamento dos cultivos (FAO, 2014). Com a finalidade de conciliar a intensificação dos cultivos com a biossegurança, tem sido desenvolvidas pesquisas no desenvolvimento de novas estratégias de suplementação nas dietas comerciais que possam promover o crescimento e saúde dos animais utilizando compostos como: probióticos, prebióticos, simbióticos, fitoterápicos, entre outros suplementos dietéticos funcionais (PANDIYAN et al., 2013).

1.2. Probióticos na Aquicultura

Na aquicultura existe uma constante interação entre os organismos cultivados e os micro-organismos presentes no ambiente, o que torna essencial a compreensão dos mecanismos de ação dos probióticos (MOURIÑO et. al., 2010). Estudos realizados com dietas suplementadas com probióticos para distintas espécies aquáticas cultivadas obtiveram resultados positivos (WANG & HAN, 2007a; ZHOU, LIU & LI, 2009; LIU et al., 2010; VIEIRA, 2010). Verschuere *et al.* (2000) conceitua probiótico como sendo “micro-organismos vivos que ao serem ministrados nos tanques de cultivo, atuam benéficamente no organismo aquático, a ser produzido, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, balanço de bactérias no trato intestinal, ou o ambiente de cultivo”.

A aplicação de bactérias benéficas tem sido considerada uma alternativa para a profilaxia ao uso de antibióticos para o controle de infecções bacterianas, sendo que há uma diversidade de micro-organismos sendo utilizada como probiótico, mas os verdadeiros probióticos são micro-organismos que ocorrem naturalmente no hospedeiro, e em seus ambientes (DECAMP & MORIARTY, 2006). Esses probióticos podem ser administrados como um suplemento alimentar ou como aditivo para a água (MORIARTY, 1998).

1.3. O Uso de *Bacillus* spp.

As bactérias do gênero *Bacillus*, que têm sido utilizadas como probiótico e em formulações comerciais (VIEIRA, 2010), são gram-positivas, em formato de bastonete, formadoras de esporos e podem ser encontradas em diversos ambientes como, por exemplo, no solo, água, poeira e ar (MADIGAN et al., 2002).

A maior vantagem na utilização deste grupo de bactérias como probióticos está relacionada com a facilidade de ser produzida em massa e incorporada em produtos comerciais, pois possuem a capacidade de esporulação, facilitando sua inclusão em dietas e produtos comerciais (OCHOA-SOLANO & OLMOS-SOTO, 2006). Os *Bacillus* são capazes

de secretar substâncias, tais como: toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos das vias metabólicas primárias, substâncias antibióticas e bacteriocinas que poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático (SCHULZ, BONELLI & BATISTA, 2005). Devido a estas características, quando presentes, são capazes de disponibilizar estes nutrientes no trato intestinal do camarão, aumentando sua absorção e consequentemente seu crescimento (LIU et al., 2009).

Na literatura, já estão descritos vários exemplos de que o gênero *Bacillus* atua de forma positiva no crescimento de camarões marinhos, seja na inibição *in vitro* de patógenos (BALCAZAR et al., 2006), no aumento do crescimento (FAR et al., 2009; LIU et al., 2009), no aumento da resistência a infecção bacteriana (RENGPIPAT et al., 2000; BALCAZAR et al., 2006; TSENG et al., 2009), no aumento da digestibilidade (LIN et al., 2004; LIU et al., 2009), no aumento da sobrevivência (WANG, et al., 2005b; ZIAEI-NEJAD et al., 2006; EL-SERSY et al., 2006; FAR et al., 2009; ZHOU et al., 2009), no aumento da resposta imune (RENGPIPAT et al., 2000; GULLIAN et al., 2004; LI et al., 2007a, 2009b; TSENG et al., 2009), na melhora da microbiota intestinal (GULLIAN et al., 2004; LI et al., 2007a, 2009b), no aumento da resistência a infecção viral (LI et al., 2009), na diminuição da conversão alimentar (WANG, et al., 2005b), no aumento da sobrevivência da larvicultura (ZIAEI-NEJAD et al., 2006; GUO et al., 2009; SILVA et al., 2013) e no aumento da atividade de enzimas digestivas (ZIAEI-NEJAD et al., 2006; ZHOU et al., 2009). A maioria dos relatos está associada ao uso de produtos comerciais que utilizam bactérias que não são oriundas do animal de estudo e acabam reduzindo a especificidade entre o probiótico (bactéria) e hospedeiro (camarão).

Portanto, uma alternativa para o uso de probióticos comerciais (exóticos) seria o isolamento e cultivo de probióticos nativos do ambiente, ou do trato intestinal dos organismos que estão sendo cultivados (VERSCHUERE et al., 2000). Um micro-organismo capaz de colonizar e dominar um sítio de adesão do organismo seria um bom candidato para competir com micro-organismos patogênicos, assim como a adição de um determinado grupo de bactérias na água de cultivo poderia competir por nutrientes com possíveis linhagens patogênicas. Apesar de não existir evidências que probióticos isolados do próprio ambiente ou hospedeiro apresentam uma melhor desempenho quando comparados a micro-organismos isolados de espécies ou ambientes diferentes, supõem-se que os riscos são consideravelmente menores.

1.4. Sistema Imunológico dos Crustáceos

A primeira linha de defesa dos crustáceos é a presença de uma carapaça rígida que protege contra agressões e invasão de patógenos. Os crustáceos contam com apenas seu sistema imunológico inato ou natural, o qual está intimamente ligado a hemolinfa, que consiste de uma fração celular, representada pelas células circulantes (hemócitos), e de uma fração líquida, constituída pelo plasma e fatores humorais nele dissolvidos. Esse sistema atua de forma integrada, protegendo os crustáceos da invasão de micro-organismos e parasitas garantindo sua integridade corpórea (BARRACCO et al., 2008).

Diversos estudos relatam o efeito da imunoestimulação através do uso de probiótico nos parâmetros imunológicos dos camarões (GULLIAN et al., 2004; LI et al., 2007; TSENG et al., 2009). Em relação a este enfrentamento dos probióticos contra patógenos, o mecanismo de ação está relacionado ao auxílio que estas bactérias podem dar a microbiota do trato intestinal, protegendo a mucosa intestinal (MOURIÑO et al., 2012). Como os probióticos podem modificar esta microbiota por diversas formas, auxiliam também na imunomodulação do sistema de defesa dos animais. Contudo, o uso de ferramentas que fortaleçam o sistema imune inato dos camarões é uma importante estratégia para melhorar sua resistência à infecção por patógenos (VIEIRA, 2010).

A utilização de cepas probióticas propiciam a imunomodulação, tanto molecular como celular, nos animais tratados, e cepas como as de *Bacillus* sp. possuem a capacidade de influenciar as respostas imunológicas, tanto nos níveis locais como nos sistêmicos (PANIGRAHI et al., 2004). A estimulação dos mecanismos de defesas pode aumentar a resistência do hospedeiro contra enfermidades (BACHÈRE, 2003), principalmente quando há um desafio experimental, onde os parâmetros imunes são mais evidentes comparados ao controle, adquirindo, portanto, uma imunocompetência.

Portanto, independentemente do modo de ação do probiótico, espera-se que o uso do probiótico contemple melhorias dos índices zootécnicos e/ou imunológicos no cultivo de camarões marinhos. Desta forma, para um melhor entendimento dos efeitos destas bactérias no cultivo do camarão marinho, torna-se essencial avaliar o potencial do probiótico isolado do próprio ambiente de cultivo em sistema de água clara, onde o único alimento disponibilizado é a ração.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Geral

Objetivou-se isolar e identificar bactérias do gênero *Bacillus* sp. oriundas do sistema de cultivo superintensivo com flocos microbianos de *L. vannamei* e avaliar seu potencial como probiótico suplementado em água e via dieta.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar *Bacillus* spp. do sistema de cultivo superintensivo de camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) em bioflocos microbianos;
- Caracterizar *in vitro* as cepas isoladas quanto ao potencial de inibição de bactérias patogênicas (*Vibrios* sp.) e antagonismo entre elas;
- Avaliação da produção de proteases *in vitro* dos *Bacillus* spp. isolados;
- Avaliar a formação e manutenção de flocos microbianos no cultivo superintensivo de pós-larvas de camarão com adição das bactérias isoladas nas etapas anteriores;
- Avaliar a engorda em água clara de camarões marinhos (*L. vannamei*) com o uso de dietas suplementadas com *Bacillus* spp. avaliando seu desempenho zootécnico e saúde (parâmetros imunes).

3. FORMATAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está dividida em dois capítulos, o primeiro compreende a revisão da literatura e o segundo foi escrito de acordo com as normas da revista “Aquaculture” para envio do artigo científico.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Flocos microbianos como fonte de bactérias probióticas para o cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Gabriela Soltes Ferreira*, Norha Constanza Bolívar, Scheila Anelise Pereira, Cristhiane Guertler, Felipe do Nascimento Vieira, José Luiz Pedreira Mouriño, Walter Quadros Seiffert.

Departamento de aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.*Autor para correspondência. E-mail: gabisoltes@yahoo.com.br

Artigo formatado segundo as normas da revista Aquaculture.

RESUMO:

Objetivou-se isolar e identificar bactérias do gênero *Bacillus* sp. oriundas do sistema de cultivo superintensivo com flocos microbianos de *Litopenaeus vannamei* e avaliar seu potencial nos parâmetros de qualidade de água, zootécnicos e imunológicos quando adicionados na água e em dietas práticas. Os *Bacillus* spp. isolados foram avaliados *in vitro* quanto a capacidade de inibir patógenos, atividade antagonista e produção de protease. *In vivo*, os *Bacillus* spp. foram adicionados na água para avaliar a formação e manutenção de flocos microbianos no cultivo de pós-larvas e depois foram incorporados em dietas formuladas, afim de verificar o desempenho zootécnico e parâmetros hematimunológicos do *L. vannamei* durante 42 dias. Foram isoladas quatro bactérias do sistema superintensivo de flocos microbianos (*Bacillus thuringiensis* CPQBA 571-12 DRM 06, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 08 e *Bacillus cereus* CPQBA 571-12 DRM 09). O *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07 foi o único isolado que apresentou característica inibitória *in vitro* frente ao patógeno *V. alginolyticus* com halo de inibição de 20 mm de diâmetro. Todos os isolados foram capazes de produzir protease e não apresentaram atividade antagonista entre eles. Para o ensaio de formação e manutenção de agregados microbianos gerados no sistema superintensivo de cultivo de pós-larvas foi observada diferença significativa ($p=0,017$) na contagem microbiológica da água no sétimo dia de ensaio, onde a contagem total de *Vibrio* spp. na água foi inferior nos grupos tratados com *Bacillus* spp. (1×10^4 UFC.mL⁻¹) e com o produto comercial Comambio (1×10^4 UFC.mL⁻¹) do que no controle, não houve diferença estatística na contagem total de bactérias heterotróficas viáveis ($p=0,62$). Já no ensaio de engorda a suplementação com *Bacillus* spp. não afetou o desempenho zootécnico dos camarões. Entretanto nos parâmetros imunológicos houve diferença significativa ($p<0,05$), as cepas de *Bacillus* spp. foram capazes de aumentar a contagem total de hemócitos, o título aglutinante do soro, as proteínas totais no soro e diminuir a atividade da fenoloxidase (PO) da hemolinfa. Também foi observado um aumento ($p<0,05$) na produção intracelular de ânion superóxido estimulados pela laminarina (β -1,3 glicanas) e PMA (*Phorbol myristate acetate*) comparados ao basal. Conclui-se que as bactérias Gram-positivas, *Bacillus* spp. isoladas dos bioflocos microbianos, são importantes para o cultivo de *L. vannamei* e para a manutenção da saúde e crescimento,

podendo ser utilizadas como probiótico ou como biocontroladoras em águas de sistemas de cultivos superintensivos.

Palavras-chave: Bioflocos, *Bacillus* sp., camarão, saúde, probiótico.

4.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento acelerado e intercontinental do cultivo de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* contribuiu para o aparecimento de surtos de doenças que levaram a perdas econômicas incalculáveis mundialmente (LIGHTNER & REDMAN, 1998; BACHÈRE, 2000; BRIGGS et al., 2005). Para enfrentar esta realidade, atualmente é imprescindível adotar boas práticas de manejo ambientalmente amigáveis que contribuam para uma maior biossegurança nos cultivos (BOYD & CLAY, 2002).

O sistema superintensivo com focos microbianos desponta como uma promissora tecnologia aplicada à sustentabilidade em cultivos de camarões marinhos (CARVALHO, 2011). Esse sistema é dependente de uma comunidade bacteriana para manter a estabilidade dos níveis de nutrientes na água (WASIELESKY et al., 2006).

A comunidade bacteriana estabelecida no sistema superintensivo com focos microbianos pode inibir a proliferação de agentes patogênicos por exclusão competitiva por alimento e espaço (CRAB et al., 2010), além de incrementar a dieta dos animais cultivados (McINTOSH et al., 2000). No entanto, a comunidade microbiana também pode ser composta por bactérias patogênicas e oportunistas (SCHULZE et al., 2006).

Dentre as bactérias oportunistas encontradas no sistema de cultivo, destacam-se as bactérias marinhas do gênero *Vibrio* (SONG & LEE, 1983). O *Vibrio parahaemolyticus* é o mais recente micro-organismo a causar mortalidades em sistemas de cultivos de *L. vannamei*, conhecido como doença da síndrome de mortalidade precoce (EMS) ou síndrome da necrose hepatopancreática aguda (AHPNS) (LEAÑO & MOHAN, 2012). Portanto, a ameaça de *Vibrio* spp. para os cultivos de peneídeos é mais uma vez evidente, visto que, são bactérias oportunistas que afetam o crescimento e a sobrevivência dos camarões cultivados em todos os seus estágios de vida (COSTA et al., 2008).

Na tentativa de controlar tais patógenos, os antibióticos têm sido usados indiscriminadamente, levando a uma seleção de micro-organismos resistentes e dificultando o tratamento dessas doenças a cada ciclo produtivo (SZE, 2000). Neste contexto, o uso de bactérias probióticas é reconhecido como uma ferramenta útil no combate a tais doenças, minimizando o uso desenfreado destas drogas (ZHOU & WANG, 2012). Portanto, os objetivos dos estudos foram: isolar e identificar bactérias do gênero *Bacillus* sp. oriundas do sistema de cultivo superintensivo com focos microbianos de *L. vannamei* e avaliar

seu potencial probiótico nos parâmetros de qualidade de água, zootécnicos e imunológicos com a mesma espécie.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), no Departamento de Aquicultura na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situada geograficamente a 27°34'54"N, 48°26'32"W, no Município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Foram realizados testes com *Bacillus* sp. isolados, selecionados e identificados do sistema de cultivo superintensivo de camarões marinhos com flocos microbianos avaliando *in vitro* sua capacidade de inibir patógenos, atividade antagonista e produção da protease. Posteriormente foi realizado um ensaio *in vivo* adicionando as bactérias isoladas na água e na ração, afim de, verificar o potencial probiótico e seus resultados no desempenho zootécnico e parâmetros hematoimunológicos no *Litopenaeus vannamei*.

4.2.1. Obtenção das cepas

Foram realizadas duas coletas para o isolamento e seleção de bactérias do gênero *Bacillus* sp., a primeira ocorreu no mês de março de 2010, onde foram coletadas amostras de 10 mL de água com auxílio de tubos de ensaio estéreis de 15 mL com tampa de rosca coletadas de uma unidade de cultivo superintensivo de flocos microbianos de 50 m² e a segunda foi realizada no mês de agosto de 2010, onde foram coletadas amostras de um decantador de sólidos cilíndrico-cônico acoplado de 700 L. Na sequência, foram semeadas em meio de cultura bacteriológico “Caldo L” (Composição: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 3 g de NaCl para 1 L de água destilada) e incubadas em estufa de crescimento bacteriológico a 30°C por 24 h seguindo a metodologia adaptada de TRAVERS et al., (1987). De acordo com POLANCZYK et al., (2004) para o isolamento de bacilos esporulados é necessário o choque térmico que foi realizado da seguinte forma: primeiramente os tubos recém crescidos mantidos em 30°C de temperatura foram colocados em recipiente de vidro de 500 mL de água a 80°C por 15 min e posteriormente transferidos à outro recipiente de vidro de 500 mL com água a 0°C por mais 15 min. Na sequência ao ensaio, os tubos contendo as amostras foram repicados assepticamente em capela de fluxo laminar unidirecional para novos tubos de 10 mL contendo o meio de cultura bacteriológico Caldo L, sendo este procedimento repetido por mais três vezes, garantindo assim somente o isolamento de bactérias esporuladas que resistiram aos choques térmicos seguidas vezes.

Após o último choque térmico os isolados foram repicados para tubos de ensaio com Caldo L e após as 24 horas a 30°C de temperatura de crescimento em estufa bacteriológica. Na sequência a coleta de amostras para tinção visando observar a morfologia bacteriana existente através do método de Gram foi realizada (MADIGAN et al., 2002). Após confirmação de bactérias Gram positivas no formato de bastonetes esporulados, alíquotas de 0,1 mL dos tubos foram semeadas por esgotamento em placa de Agar L (Composição: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, e 15 g de Agar agar por litro de água destilada) e incubadas a 30°C por 24 h (TRAVERS et al., 1987). Foram selecionadas unidades formadoras de colônias que possuíram as características de bacilos esporulados Gram-positivos confirmados através do método descrito por Wirtz-Conklin (apud HAMOUDA et al., 2002) com auxílio de verde malaquita.

4.2.2. Identificação molecular

Os isolados bacterianos foram enviados para identificação molecular utilizando o sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S e do gene da girase na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Suas sequências foram confrontadas com as sequências de organismos depositadas no Genbank. A metodologia consiste na amplificação do gene RNA ribossomal 16S e da girase pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da cultura, segundo protocolo descrito por Van Soolinger *et al.* (1993). Os *primers* (iniciadores) utilizados para a reação de PCR são p10f e p1100r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S, e UP1/UP2r, homólogos a uma região do gene da girase de bactérias. Os produtos das amplificações foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI 3500XL Séries (Applied Biosystems). Os *primers* que foram utilizados para o sequenciamento são o 10f e o 1100r para o gene RNA ribossomal 16S e UP1/UP2r para o gene da girase. As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S e do gene da girase obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao micro-organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) e as análises

filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0, sendo essa uma ferramenta integrada para a realização de alinhamento de sequências, que infere nas árvores filogenéticas.

4.2.3. Inibição de patógeno

O teste de inibição de patógenos *in vitro* foi realizado com os seguintes micro-organismos patogênicos do banco de cepas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM): *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *V. alginolyticus* BCCM 2068 e *Vibrio* sp. CPQBA 378-12 DRM 01. Cada cepa isolada de *Bacillus* spp. foi incubada em 10 mL de meio de cultura bacteriológico BHI a 30°C por 24 horas. Posteriormente, foram semeados 100 µL dos isolados em placas de Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubadas a 28°C por 24 horas. Os patógenos foram diluídos 100 vezes, em fator de série 1:10 em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração “Brain Heart Infusion” (HiMedia, Mumbai), semeados 100 µL da bactéria patogênica no meio de cultura TSA e incubados por 2 horas a 30°C. Após este período, foram retirados discos com halos de um cm de diâmetro em triplicata das placas de TSA dos *Bacillus* spp. e transferidas para outra placa de TSA com os patógenos. Os patógenos foram incubados novamente junto com os discos de *Bacillus* spp. a 30°C por 24 h, e o halo de inibição foi medido no dia seguinte com auxílio de um paquímetro (BAUER, 1966).

4.2.4. Antagonismo entre as cepas isoladas

O teste antagonismo foi realizado com o intuito de averiguar a possibilidade de utilização conjunta dos isolados bacterianos otimizando a produção de compostos inibitórios e outros possíveis gamas de efeitos produzidos pelas diferentes cepas como enzimas, ácidos orgânicos, bacteriocinas e outros compostos possivelmente benéficos para manutenção de qualidade de água e saúde animal.

Neste teste qualitativo, foi utilizada a técnica de estria cruzada “Cross streak” (MADIGAN et al., 2002) para verificar o antagonismo entre as cepas de *Bacillus* sp. Cada cepa de *Bacillus* sp. foi incubada em 10 mL de caldo de cultura bacteriológico BHI a 30°C por 24 h. Passado esse período, com auxílio de alça de platina, foi retirada uma alíquota do tubo de ensaio contendo a bactéria para ser então semeado em placas de

Petri contendo meio de cultura bacteriológico TSA, pela técnica de estrias, sendo que cada cepa de *Bacillus* sp. foi semeada com o intuito de formar cruzamentos nas placas. Este teste foi realizado em triplicata.

4.2.5. Produção de protease

Todas as bactérias isoladas foram testadas para produção de protease usando placas de Ágar de Leite Desnatado e incubadas a 40°C, a produção da enzima foi calculada após 24 h (OCHOA-SOLANO & OLMOS- SOTO, 2006). A zona clara ao redor da colônia foi medida com auxílio de um paquímetro.

4.2.6. Formação e manutenção de agregados microbianos (bioflocos) gerados no sistema superintensivo de cultivo de pós-larvas de camarão marinho

Para o ensaio de formação e manutenção do bioflocos foram utilizados doze aquários retangulares (35 cm × 70 cm × 25 cm) com capacidade de 60 L, os aquários estavam equipados individualmente com sistema de aeração através do uso de pedra porosa e controle térmico com aquecedores (RoxinTM HT-1900) de 100W, mantendo a temperatura a ±28°C, através de termostatos. Os tratamentos foram mantidos sem troca de água, havendo somente a reposição da água perdida por evaporação, cerca de 1% por semana. O ensaio teve duração de 22 dias, consistindo de dois tratamentos e um grupo controle. O primeiro tratamento consistia de um mix de micro-organismos isolados do bioflocos na concentração 1×10^4 UFC.mL⁻¹ (cepas utilizadas: *Bacillus thuringiensis* CPQBA 571-12 DRM 06, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 08 e *Bacillus cereus* CPQBA 571-12 DRM 09) e o segundo tratamento com o produto comercial Comambio[®] (Comam, São Paulo, Brasil) na concentração de 1×10^4 UFC.mL⁻¹, que contém em sua fórmula o *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente em um delineamento unifatorial em quadruplicata. Os aquários foram povoados com 36.000 pós-larvas (PL 10) de camarões marinhos (*L. vannamei*) de aproximadamente $0,002087 \pm 0,000196$ g. A água dos aquários foi fertilizada quatro dias antes do povoamento com melaço de cana e ração na proporção carbono e nitrogênio de 15:1. Os camarões foram alimentados cinco vezes ao dia (09:00; 11:00; 13:00; 15:00; 17:00) com ração específica para esta fase de desenvolvimento (EPAK PL:XL e EPAK XL, INVE, EUA).

Os micro-organismos isolados do sistema superintensivo de camarões marinhos com bioflocos microbianos (*Bacillus* spp.) foram

cultivados em frascos de 100 mL esterilizados com caldo bacteriológico BHI durante 24 h a 30°C em estufa bacteriológica. O produto comercial Comambio® (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*) não precisou ser cultivado em meio de cultura bacteriológico sendo utilizado em sua forma comercial em pó. Posteriormente, os micro-organismos foram separados dos meios de cultura por centrifugação a 4000 ×g durante 30 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em água salina estéril com 3% de NaCl (Synth®, Diadema, SP) e foi ajustada a concentração para 10⁴ UFC.ml⁻¹, para cada 100 mL de água destilada como solução estoque. Após o preparo das soluções, as mesmas foram adicionadas na concentração de 10⁴ UFC.ml⁻¹ nos aquários de cultivo de pós-larvas. Foram analisados os parâmetros microbiológicos da água de cultivo em bioflocos. Amostras de 10 mL de água de cada tratamento foram coletadas a cada cinco dias do experimento com auxílio de tubos de ensaio estéreis de 15 mL com tampa de rosca para a realização da contagem microbiológica da água (contagem de bactérias heterotróficas viáveis e vibriónicas). Amostras de 1 mL foram inoculadas em diluições seriadas através de tubos de solução salina (3% NaCl) e 100 µL das amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura bacteriológico Agar Marinho e Agar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS) para contagem de bactérias heterotróficas viáveis e vibriónicas, respectivamente. Posteriormente foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 24 h e realizada sua contagem no dia seguinte através do método de contagem das placas em unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹).

4.2.7. Delineamento Experimental

Para o experimento de engorda em água clara foram utilizados camarões marinhos da espécie *L. vannamei* provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos da linhagem SPF (livre de patógenos específicos) adquiridas da Empresa Genearch Aquacultura Ltda.

O delineamento experimental foi totalmente ao acaso, sendo um grupo tratado com dieta suplementada com *Bacillus* spp. (1,15×10⁴ UFC.g⁻¹) e o grupo controle, todos em quadruplicata. A água dos tanques foi renovada, diariamente a uma taxa de 50%, para a retirada de restos de alimento, fezes e mudas. Os camarões de cada unidade experimental foram alimentados quatro vezes ao dia (8:00, 12:00, 14:00 e 17:00 h) utilizando bandejas de alimentação com 6% da biomassa de cada tanque. Após 1 hora, a sobra de ração era checada e os cálculos de ajuste de alimentação eram refeitos somente depois de duas alimentações de acordo com a taxa de consumo.

4.2.8. Experimento de engorda

A dieta foi elaborada usando o software Feedsoft® Professional version 3.14 (Feedsoft Corporation, Richardson, TX, USA), de acordo com as exigências nutricionais da espécie (NRC, 2011; ZHOU et al., 2012; XIE et al., 2012). A formulação e composição centesimal da dieta em porcentagem de matéria seca estão apresentadas na Tabela 1. A formulação e extrusão foram efetuadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (UFSC).

Tabela 1 – Níveis de inclusão de ingredientes utilizados na formulação e a composição centesimal da dieta basal em porcentagem de matéria seca para o cultivo de *L. vannamei*.

Ingredientes	(%)	Composição centesimal (%)	
Farelo de soja ^a	12	Umidade	88,15
Farelo de trigo ^a	30,51	Proteína Bruta	33,48
Farinha de resíduo de peixe ^a	35,41	Extrato Etéreo	11,51
Óleo de fígado de bacalhau ^b	0,98	FDA	10,52
Óleo de soja ^b	1,45	Cinzas	27,39
Caulim ^c	14	Fósforo	0,94
CMC ^c	0,5		
Fosfato monocálcico ^c	2		
Lecitina de soja ^d	1,53		
Premix micro-mineral-vitamínico ^e	1,5		
Vitamina C ^a	0,06		

^a Nicoluzzi Rações. (Penha, SC)

^b Importadora Química Delaware Ltda (Porto Alegre, RS)

^c LabSinth® (Diadema, SP)

^d IMCOPA Importação, Exportação e Indústria de Óleo S.A. (Araucária, PR)

^e Povimix Camarão Intensivo. DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. (São Paulo, SP). Níveis de garantia por Kg do produto (segundo o fabricante): Vitamina A, 1.250.000 UI; Vitamina D3, 350.000 UI, Vitamina E, 25.000 UI; Vitamina K3, 500,0 mg; Vitamina B1, 5.000,0 mg; Vitamina B2, 4.000,0 mg; Vitamina B6, 10,0 mg; Ácido nicotínico, 15.000,0 mg; Vitamina C, 25.000,0 mg; Colina, 50.000,0 mg; Inositol, 20.000,0 mg; Ferro, 2.000,0 mg; Cobre, 3.500,0 mg; Cobre quelado, 1.500,0 mg; Zinco, 10.500,0 mg; Zinco quelado, 4.500,0 mg; Manganês, 4.000,0 mg; Selênio, 15,0 mg; Selênio quelado 15,0 mg; Iodo, 150,0 mg; Cobalto, 30,0 mg; Cromo, 80,0 mg; Veículo, 1.000,0 g.

Foram utilizados oito tanques de fibra de vidro com volume de 850 L de água (área de fundo de 1,0 m²), povoados com 30 camarões com o peso de 3,03±0,11 g. As unidades experimentais estavam localizadas em uma estufa com iluminação natural, e a temperatura dos tanques foi controlada por um termostato Full Gauge (MT512 RI, Porto Alegre, RS) regulado para a manutenção da temperatura a ±28° C através de aquecedores de titânio de 1.000 watts de potência. A aeração foi mantida constante através de mangueiras de difusão (aero-tube[®]) ligadas a um soprador de ar de 7,5 CV (Ibram Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamento, São Paulo, SP).

4.2.9. Preparação do inoculo

Os *Bacillus* spp. foram incorporados na dieta através da centrifugação do inoculo a 4000 ×g por 10 min a 4°C, posteriormente foi realizada a aspersão de 400 mL do inoculo (na concentração de 10⁷ UFC.mL⁻¹) em 400 g de ração, transferida para uma estufa com circulação de ar (Marconi, Piracicaba, SP) para a secagem a 30° C por 24 h, atingindo a concentração de 1,15×10⁴ UFC.g⁻¹. Após a secagem, foi adicionado em ambas as dietas, 1% de óleo de fígado de bacalhau (LabSynth[®], Diadema, SP) para proteção do pellet.

4.2.10. Desempenho Zootécnico do camarão

Biometrias semanais durante o estudo foram realizadas utilizando 10 camarões por tanque, pesados em balança de precisão com duas casas decimais (BEL equipamentos analíticos, Piracicaba, SP) e a média das amostras foram adotados como peso semanal. Ao final do experimento foram avaliados os seguintes parâmetros zootécnicos:

Peso médio final (g): Biomassa/Número final de camarões;

Sobrevivência (%): (Número final de camarões/Número inicial de camarões)×100;

Produtividade (g/m³): Biomassa final/área total;

Fator de Conversão Alimentar (FCA): Alimento ofertado (g)/ganho de peso (g);

Taxa de Crescimento Específico (TCE): 100×(ln Peso final – Peso inicial)/dias de cultivo;

Ganho de Peso Semanal (g): (Peso médio final – Peso médio inicial)/semanas de cultivo;

4.2.11. Análise dos parâmetros físico-químicos

Foram monitorados duas vezes por dia o oxigênio dissolvido e a temperatura e uma vez por semana a amônia, nitrito e nitrato e o pH. O oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram monitorados com um

medidor de oxigênio YSI modelo 55. Para o pH foi utilizado um pHmetro digital Alfakit AT350 pelo método eletrométrico. As concentrações de amônia ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) - N, nitrito (NO_2) - N, nitrato (NO_3) - N, foram analisados pelo método colorimétrico de acordo com procedimento descrito por Strickland & Parsons (1972).

4.2.12. Parâmetros hemato-imunológicos

4.2.12.1. Coleta de hemolinfa para preparação do soro

Para obtenção de soro, a hemolinfa dos camarões de cada tratamento ($n=20$ para cada grupo) foi coletada através de uma seringa (1 ml) com agulha (13 x 0,4 mm), inserida na região ventral do primeiro segmento abdominal dos camarões. Foram feitos 4 *pools* de 5 animais por grupo analisado. Para a preparação do soro, a hemolinfa coletada foi deixada coagular por 2 h a temperatura ambiente. O coágulo formado foi quebrado com o auxílio de um bastão de vidro e repetidamente centrifugado a 6.000 xg por 10 min. O sobrenadante correspondente ao soro (contendo fatores plasmáticos e celulares) foi removido e congelado a -20°C para uso posterior nos ensaios de concentração proteica e atividade da fenoloxidase.

4.2.12.2. Contagem total de hemócitos (CTH)

A contagem total de hemócitos (CTH) foi estimada em câmara de Neubauer, de modo semelhante à realizada para glóbulos brancos (BEÇAK & PAULETE, 1976). Para tal, a hemolinfa dos animais (4 *pools* de 5 animais por grupo) foi coletada em solução fixadora constituída de 4% de formaldeído em solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever Modificada) (336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) a uma diluição conhecida.

4.2.12.3. Atividade da fenoloxidase (PO)

A determinação da atividade da PO nas amostras de soro foi realizada colorimetricamente, através da formação do pigmento vermelho coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do substrato enzimático L-DOPA pela PO do soro. Amostras de 50 μl do soro previamente diluído (15 x) em TBS (50 mM Tris, 5 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl, pH 7,4), foram pré-incubadas com um volume igual de tripsina (SIGMA) ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), indutor da atividade enzimática, durante 5 min a temperatura ambiente, em uma microplaca de 96 poços de fundo chato. Nos controles, o indutor ou o soro foram substituídos por um volume equivalente de TBS. Em seguida, os poços receberam 50 μl de L-DOPA ($3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a formação do pigmento DOPA-cromo quantificado em leitor de microplacas (Tecan, Barueri, SP) na

absorbância de 490 nm, após 5, 10, 15 e 20 min. A atividade enzimática da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteínas, onde uma unidade da atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20°C (SÖDERHÄLL & HÄLL, 1984). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.12.4. Determinação do título aglutinante do soro

Para determinar o título de aglutininas/lectinas, inicialmente foram depositados 50 µl de uma solução de TBS (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7,4) em todos os poços de uma microplaca (fundo em “U”). Em seguida adicionou-se no primeiro poço 50 µl do soro previamente diluído (12x) em TBS, seguindo-se de uma diluição seriada nos poços subsequentes. Por fim, 50 µl de uma solução de eritrócitos de cão a 2% (em NaCl 0,15 M) foram adicionados em cada poço e a mistura incubada por 2 h em câmara úmida a temperatura ambiente. Nos controles, o soro dos camarões foi substituído por TBS. O título aglutinante do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.12.5. Concentração de proteínas totais no soro (CP)

A concentração proteica do soro (4 *pools* de 5 animais por grupo) foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. Para tal, 20 µl de soro (diluído 6000x em água milliQ) foi depositado em poços de uma microplaca (fundo chato) e acrescidos de 200 µl de solução de Bradford. A mistura foi então incubada por 15 min, a temperatura ambiente e a CP determinada após mensurar a absorbância (595 nm), em leitor de microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.2.12.6. Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido

A produção de ânion superóxido (O₂⁻) pelos hemócitos foi quantificada pelo método de redução do NBT (*nitro-blue-tetrazolium*) de acordo com o método adaptado de Guertler *et al.*, 2010. Como ativadores celulares foram usados o PMA (*Phorbol myristate acetate*), a laminarina (β-1,3 glicanas) e os LPS (lipopolissacarídeos).

Brevemente, a hemolinfa foi coletada em solução anticoagulante (400 mM NaCl, 100 mM glicose, 30 mM citrato de sódio, 10 mM EDTA, 26 mM ácido cítrico, pH 5,5), centrifugada a 800 *xg*, por 10 min a 4°C e os hemócitos recuperados e ressuspensos em solução salina para *Penaeus* (SS-P: 5,4 mM KCl, 2,6 mM MgCl₂, 3 mM

CaCl₂, 400 mM NaCl, 2 mM NaHCO₃, pH 7,6). Em seguida, 100 µl da suspensão de hemócitos (2,5x 10⁶ cél/mL) foram depositados nos poços de uma microplaca estéril de 96 poços (fundo chato) para adesão celular. As monocamadas celulares foram lavadas com SS-P, e adicionou-se um volume de 100 µL contendo o NBT a 0,3% e um dos indutores (concentrações finais: PMA 10 µg/mL, LPS 100 µg/mL, laminarina 2 mg.mL⁻¹). As monocamadas controle receberam NBT e SS-P ou apenas SS-P (branco), sem indutores. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com metanol absoluto. Após secagem, adicionou-se KOH 2M e DMSO para solubilizar o precipitado azul de formazan produzido. A produção do pigmento púrpura (formazan), gerado pela redução do NBT pelos ânions superóxido produzidos, foi então quantificada em uma leitora de microplacas a 630 nm. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicatas.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade (teste de Bartlett, com significância de 5%) e quando esta não foi alcançada os dados foram transformados em Log₁₀ (x+1) no caso do peso final e em Log₁₀ (x) para o ensaio microbiológico da água do biofoco. Posteriormente foi aplicado ANOVA unifatorial, e caso necessário quando detectada diferença de p≥0,05 foi aplicado o teste de separação de médias Tukey para os parâmetros zootécnicos e Student Newman Keuls (SNK) para o ensaio microbiológico da água do biofoco, todos com significância de 5%.

Os resultados obtidos nos parâmetros hemato-imunológicos foram analisados pelo teste-t, sendo admitidas diferenças significativas se as médias apresentarem diferenças ao nível de significância de 5%. Os valores da atividade aglutinante foram transformados para log₂. Os resultados obtidos da produção de ânion superóxido foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas no programa STATISTICA 12.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Identificação molecular

Foram isoladas três bactérias do sistema superintensivo de biofocos microbianos, sendo identificadas molecularmente como *Bacillus thuringiensis* CPQBA 571-12 DRM 06, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 08 e uma

do decantador de sólidos *Bacillus cereus* CPQBA 571-12 DRM 09, todas Gram-positivas e no formato de bastonete. O cultivo superintensivo de flocos microbianos contém uma comunidade microbiana diversificada que incluem bactérias patogênicas e oportunistas, bem como bactérias benéficas e neutras (SHULZE et al., 2006). Ballester *et al.* (2010), observaram que o biofilme é composto de detritos de matéria floculada colonizada por bactérias heterotróficas, cianobactérias filamentosas, dinoflagelados, ciliados, flagelados e rotíferos. Anand *et al.* (2014), afim de, estimular a formação do biofilme utilizou farinha de trigo como fonte de carbono na proporção de 10:1 de Carbono e Nitrogênio para ocorrer a sucessão microbiológica e relataram que os principais micro-organismos encontrados foram *Vibrio*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e fungos.

4.4.2. Inibição de patógeno

O *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07 foi o único isolado que apresentou característica inibitória frente ao patógeno *V. alginolyticus* BCCM 2068 com halo de inibição de 20 mm de diâmetro, podendo vir a ser uma cepa probiótica em testes *in vivo* no cultivo de camarões marinhos. Uma maneira comum de selecionar candidatas probióticas é a realização de testes de inibição *in vitro* (LUIS-VILLASEÑOR et al., 2011). Gullian *et al.* (2004) reportaram que a cepa de *Bacillus* P64 isolada do hepatopâncreas de *L. vannamei*, teve um bom efeito inibitório contra *Vibrio harveyi* S2 com halo de inibição de 15,3 mm de diâmetro. Resultados similares tem sido demonstrado por Luis-Villaseñor *et al.* (2011) com *Bacillus* spp. utilizando o patógeno *V. parahaemolyticus* (CAIM 170) e *V. harveyi* (CAIM 1793) com halo de inibição de 11-17,5 mm de diâmetro, respectivamente. Os efeitos inibitórios de *Bacillus* são atribuídos à capacidade dessas bactérias em secretar substâncias, tais como: toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos das vias metabólicas primárias, substâncias antibióticas e bacteriocinas que poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático sobre uma ampla gama de bactérias Gram positivas e Gram negativas, que também explica o efeito inibitório sobre o *Vibrio* (SCHULZ et al., 2005).

4.4.3. Antagonismo entre as cepas isoladas

O teste de atividade antagonista entre as cepas isoladas não demonstrou qualquer efeito inibitório entre as cepas. Isto demonstra seu potencial para ser utilizado em conjunto, o que aumentaria seu poder inibitório contra patógenos e a sua produção de compostos voláteis (GULLIAN et al., 2004).

4.4.4. Produção de protease

No teste de produção de protease foi observada a presença de uma zona clara ao redor do meio de cultura de Leite Desnatado, o que sugere a produção de protease pela bactéria. O *Bacillus cereus* CPQBA 571-12 DRM 09 apresentou o maior halo com 1,8 cm de diâmetro, seguido pelo *Bacillus thuringiensis* CPQBA 571-12 DRM 06 com 1,75 cm, *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 07 com 1,62 cm e o *Bacillus licheniformis* CPQBA 571-12 DRM 08 com 1,4 cm.

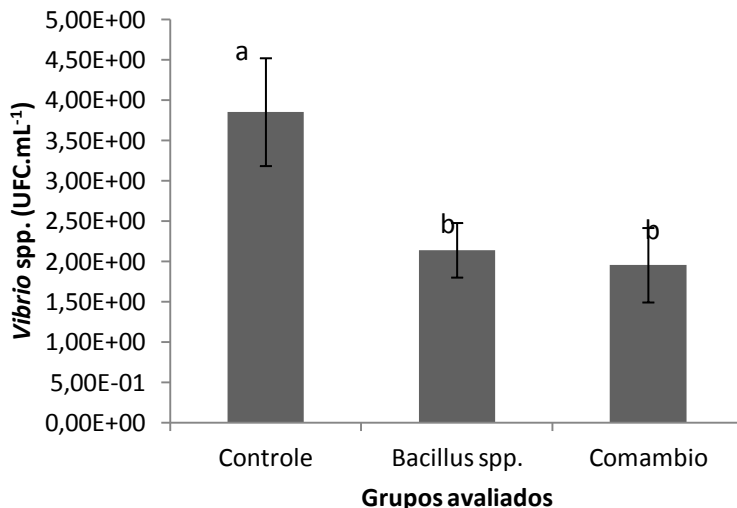
Dentre as diversas substâncias produzidas pelas bactérias, as enzimas são as que despertam maior interesse comercial, sendo as enzimas proteolíticas em destaque, principalmente as encontradas no gênero *Bacillus* sp. (KUMAR & TAKAGI, 1999). Além do efeito inibitório contra bactérias patogênicas, as enzimas produzidas pelas bactérias podem complementar a atividade da protease do camarão, aumentando a digestibilidade dos alimentos. Isto também pode ser explicado devido ao fato de que essas enzimas probióticas têm atividade em um intervalo de pH mais amplo do que as enzimas encontradas no trato digestivo do camarão (OCHOA-SOLANO & OLMOS-SOTO, 2006). *Bacillus* spp. isolados de soja fermentada apresentaram produção de protease em testes *in vitro* com halos de 1,0-4,8 cm (LIU et al, 2009), assim como Ochoa-Solano & Olmos-Soto (2006) isolaram *Bacillus* spp. de ambiente marinho e observaram uma produção de protease com halo de 0,7-1,0 cm² com diferentes meio de cultura utilizados. A produção de protease está intimamente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (JOHNVESLY & NAIK, 2001).

4.4.5. Formação e manutenção de agregados microbianos (bioflocos) gerados no sistema superintensivo de cultivo de pós-larvas de camarão marinho

O oxigênio dissolvido dos aquários no ensaio de formação e manutenção de agregados microbianos ficou entre 5,80 e 5,84 mg.L⁻¹ e a temperatura ficou entre 26,7 e 29,6°C em todos os tratamentos e o controle. Foi observada diferença significativa (p=0,017) somente na contagem microbiológica da água no sétimo dia de ensaio, onde a contagem total de *Vibrio* spp. na água foi inferior nos grupos tratados com *Bacillus* spp. (1×10^4 UFC.mL⁻¹) e com o produto comercial Comambio (1×10^4 UFC.mL⁻¹) do que no controle (Figura 1), não houve diferença estatística na contagem total de bactérias heterotróficas viáveis. Esses resultados corroboram com os dados de inibição *in vitro* de *Vibrio alginolyticus* pelos *Bacillus* spp. isolados. Diversos estudos

foram realizados com *Bacillus* spp., sendo conhecida a inibição de patógenos em cultivos de peixes e camarões, através de seu efeito indireto na melhoria de qualidade de água e do solo. *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis* apresentaram a redução sinérgica na carga de patógenos e nas concentrações de resíduos de íons *in vitro* e *in vivo* em cultivo de peixes ornamentais *Cyprinus carpio* (LALLOO et al., 2007). Aplicações semanais do biorremediador comercial (BZT aquaculture), com estirpes de *Bacillus* e *Nitrobacter*, reduziram o número de espécies de *Vibrio* em comparação ao controle (sem adição do produto) e também aumentaram a sobrevivência e produção do *Penaeus monodon* (JANEJO et al., 2009). Nimrat et al. (2008) observaram que o tratamento com secagem do solo e a adição do produto comercial (A Probiotic), sendo o *Bacillus* spp. o principal micro-organismo, diminuíram a contagem de espécies de *Vibrio* e *Pseudomonas* em solos de fazenda de *Penaeus monodon*. A utilização de consórcios de *Bacillus pumilus* e microalgas perifíticas no cultivo de *Penaeus monodon* diminuiu a contagem de *Vibrio* comparados ao controle (BANERJEE et al., 2010). Portanto, a aplicação de micro-organismos para reduzir o número de bactérias patogênicas oferece uma grande vantagem aos cultivos de camarões marinhos.

Figura 1 - Concentração de *Vibrio* spp. na água de cultivo de pós-larvas de *L. vannamei* no sistema superintensivo de flocos microbianos avaliada no sétimo dia de ensaio sob condições de $28,3\pm 0,49^\circ\text{C}$ de temperatura e $5,82\pm 0,29\text{ mg.L}^{-1}$ de O_2 .



Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa pelo teste SNK de separação de média ($p < 0,05$) entre o grupo tratado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. e o controle.

4.4.6. Parâmetros físico-químicos

Não houve diferença estatística na temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total, nitrito e nitrato entre o grupo alimentado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. ($1,15 \times 10^4 \text{ UFC.g}^{-1}$) e o controle ($p \geq 0,05$). Os parâmetros físico-químicos encontrados neste estudo estão dentro das condições ideais para o cultivo de *L. vannamei* (LOURENÇO et al., 2009).

4.4.7. Resultados Zootécnicos

Após 42 dias de cultivo, onde os animais atingiram o peso de 10 g (valor comumente utilizado em uma engorda comercial), não foram observadas diferenças estatísticas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros zootécnicos (peso final, sobrevivência, produtividade, fator de conversão alimentar, taxa de crescimento específico e ganho de peso semanal) entre o grupo alimentado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. ($1,15 \times 10^4 \text{ UFC.g}^{-1}$) e o controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros zootécnicos: peso final (g), sobrevivência (%), produtividade (g/m^3), fator de conversão alimentar (FCA), taxa de crescimento específico (g) e ganho de peso semanal (g) do cultivo de camarões *L. vannamei* em água clara com dieta suplementada com *Bacillus* spp. e o controle durante os 42 dias de experimento.

Parâmetros Zootécnicos	Probiótico <i>Bacillus</i> spp.	Controle
Peso inicial (g)	3,03±0,12	3,03±0,12
Peso final (g)	10,8±0,18	10,42±0,03
Sobrevivência (%)	95,8±3,19	99,2±1,66
Produtividade (g/m^3)	362,6±26,0	375,2±36,5
Fator de Conversão Alimentar (FCA)	2,18±0,21	1,96±0,15
Taxa de Crescimento específico (g)	2,97±0,11	2,93±0,18
Ganho de Peso Semanal (g)	1,23±0,03	1,17±0,13

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey de separação de média ($p > 0,05$) entre o grupo tratado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. e o controle.

Zokaeifar *et al.* (2012) avaliaram a inclusão da mistura de duas cepas de *Bacillus subtilis* (L10 e G1) em duas doses 10^8 e 10^5 UFC.g⁻¹ na ração para *L. vannamei* durante oito semanas de cultivo e não observaram diferença estatística no fator de conversão alimentar entre os grupos tratados com probiótico e o controle, porém houve diferença estatística no peso final dos grupos tratados com probiótico e nos demais índices: taxa de crescimento específico e sobrevivência, quando suplementado na concentração 10^8 UFC.g⁻¹.

Gullian *et al.*, (2004) observaram diferença estatística no peso de camarões *L. vannamei* inoculando bactérias probióticas *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 e *V. alginolyticus* (Ili) na concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹ na água do cultivo. Assim como Rengpipat *et al.*, (1998) reportaram um maior crescimento e uma maior sobrevivência em pL 30 de *P. monodon* usando *Bacillus* S11 como probiótico na ração, após 100 dias de cultivo.

Os resultados obtidos nesse estudo podem estar relacionados com a baixa concentração do probiótico na ração e as boas condições experimentais. Visto que, Liu *et al.* (2009) testaram *B. subtilis* em três concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC.g⁻¹ na ração para *L. vannamei* e observaram excelentes resultados no crescimento somente no grupo tratado com 10^8 UFC.g⁻¹ na ração.

Para uma maior concentração da bactéria na ração seria necessário liofilizá-la ou adicionar o meio de cultura na ração, o que não foi possível de ser efetuado neste estudo.

4.4.8. Parâmetros hemato-imunológicos

A contagem total de hemócitos (CTH) foi significativamente superior ($p < 0,05$) no grupo alimentado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. ($1,15 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) comparado ao controle (Figura 2a), corroborando com os resultados encontrados por Li *et al.*, (2007a) que adicionaram *Bacillus licheniformis* em três concentrações na água de cultivo de *L. vannamei*. De acordo com Jiravanichpaisal *et al.* (2006), o aumento da CTH pode proporcionar uma maior proteção dos crustáceos contra infecções, visto que, os hemócitos são os principais responsáveis pelas diferentes reações imuno-celulares.

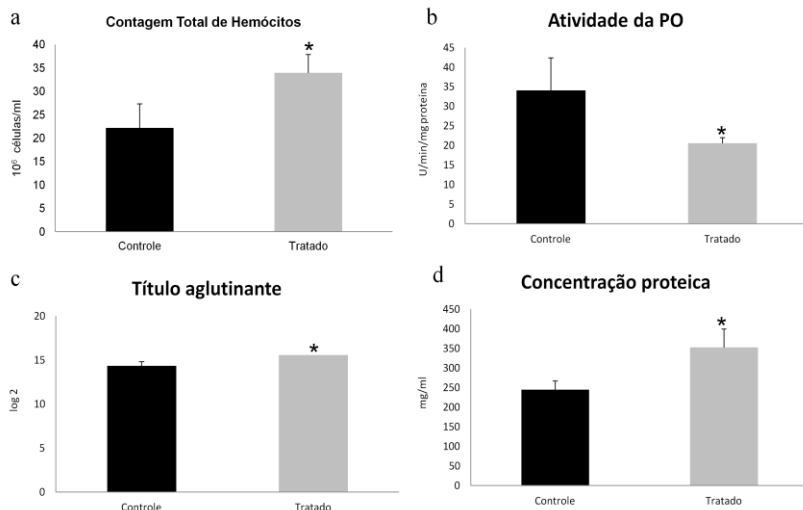
A concentração de proteínas totais no soro (CP) foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. comparado ao controle (Figura 2b). Gullian *et al.*, (2004) e Li *et al.*, (2007a) não observaram diferença significativa na concentração de proteínas totais no plasma de camarões *L. vannamei* alimentados com *Bacillus* sp.

A atividade da fenoloxidase (PO) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), sendo menor no grupo tratado com dieta suplementada com probiótico (*Bacillus* spp.) comparada ao controle (Figura 2c). Em contraste aos resultados encontrados, Gullian *et al.*, (2004) e Li *et al.*, (2007a) observaram um aumento da atividade da fenoloxidase em camarões alimentados com probiótico, assim como Chiu *et al.*, (2007), Li *et al.*, (2009b) e Tseng *et al.*, (2009) relataram um aumento na atividade da fenoloxidase dos grupos tratados com probióticos somente depois de desafiar o camarão com *Vibrio* spp. e Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Portanto, é importante ressaltar que a presença de tantas moléculas tóxicas potentes, como as quinonas, hemiquinonas e os radicais livres (ROIs e RNIs) em ausência de um processo infeccioso, leva a uma sobrecarga energética desnecessária e inútil para o camarão, podendo causar danos aos tecidos (BARRACCO *et al.*, 2008). É provável que no início do nosso experimento os camarões tenham tido uma elevação na atividade da PO, mas como estavam sendo alimentados com dieta contendo bactérias durante 42 dias, pode ter acontecido uma redução nessa resposta, por estar muito tempo em contato com o padrão molecular do patógeno, ao contrário do controle que foi maior.

A determinação do título aglutinante do soro foi maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com dieta suplementada com probiótico (*Bacillus* spp.) do que no controle (Figura 2d). Ramírez *et al.*, (2013) também relataram um aumento no título aglutinante do soro contra o *V. alginolyticus* no grupo tratado com probiótico (*Lactobacillus plantarum*) e no grupo simbiótico (*Lactobacillus plantarum* + inulina) antes da infecção. O

aumento do título aglutinante reflete no aumento da capacidade de reconhecimento destas proteínas nos camarões tratados com dieta suplementada com probiótico (*Bacillus* spp.), pois a lectinas são proteínas de reconhecimento padrão (PRP) capazes de aglutinar células que apresentam carboidratos em sua composição, tanto de bactérias Gram-positivas como de Gram-negativas (BARRACCO et al., 2008). Um grupo de aglutininas que se liga a LPS (lipopolissacarídeo) bacterianos do tipo LBP foi isolada e caracterizada no lagostim *P. leniusculus* (KOPÁCEK et al., 1993), nos camarões *F. californiensis* (VARGAS-ALBORES et al., 1993), *L. schmitti* (COMINETTI et al., 2002) e *P. monodon* (LUO et al., 2006). Todas elas se ligam a LPS, sugerindo que tenham um importante papel no controle de infecções causadas por bactérias Gram-negativas como as do gênero *Vibrio*, que podem ser patogênicas para camarões. Lectinas de *P. monodon* (RATANAPO & CHULAVATNANOL, 1992; LUO et al., 2006), *F. californiensis* (VARGAS-ALBORES et al., 1993), *Parapenaeus longirostris* (FRAGKIADAKIS & STRATAKIS, 1995) e *M. rosenbergii* (VÁZQUEZ et al., 1997), foram capazes de aglutinar diferentes espécies de bactérias, sendo algumas capazes de aglutinar espécies patogênicas do gênero *Vibrio*.

Figura 2 – (a) Contagem total de hemócitos (CTH); (b) Concentração de proteínas totais no soro (CP); (c) Atividade da fenoloxidase (PO) e (d) Determinação do título aglutinante do soro de camarões tratados com dieta suplementada com probiótico (*Bacillus* spp.) e dieta controle após 42 dias de experimento.

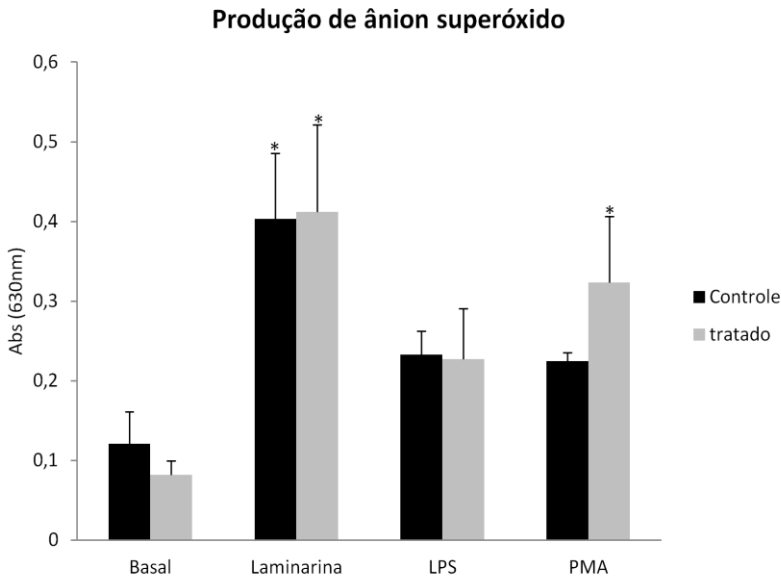


O asterisco (*) indica diferença significativa entre o grupo tratado com dieta suplementada com probiótico *Bacillus* spp. e o controle ($p < 0,05$).

A quantificação da produção intracelular de ânions superóxido estimulada pelos indutores utilizados só demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) no indutor laminarina em relação ao basal no grupo controle, enquanto que no grupo tratado com probiótico *Bacillus* spp. todos os indutores foram capazes de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a produção de O_2^- , exceto o indutor de LPS (Figura 3). Portanto, a laminarina foi o melhor indutor para ambos os grupos. Guertler *et al.*, (2010) observaram uma maior ($p < 0,05$) produção basal de ânion superóxido em animais da espécie *L. vannamei* visualmente debilitados que em animais saudáveis de *L. vannamei*, *L. schmitti*, *F. paulensis*. Estes autores também relataram que os indutores que apresentaram uma melhor imunoestimulação *in vitro* foram a laminarina (β -1,3 glicanas) e o LPS (lipopolissacarídeo). Resultados semelhantes foram vistos por Costa *et al.*, (2009), eles utilizaram *zymosan* como indutor da produção de O_2^- intracelular em *L. vannamei* com sinais avançados da doença IMNV e observaram um aumento tanto no nível basal, quanto após a indução. Neste trabalho, não foram observadas

diferenças estatísticas no indutor de LPS, o que seria bastante relevante, visto que, o LPS é o componente de bactérias Gram-negativas, que são os principais micro-organismos patogênicos para o camarão, como por exemplo, as vibrionáceas. Possivelmente estes resultados estão relacionados ao sistema de bioflocos que os camarões estavam sendo mantidos antes do experimento, onde há uma considerável quantidade de bactérias na água, o que pode explicar uma baixa resposta dos animais quando submetidos ao indutor de LPS.

Figura 3 - Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido estimulados por diferentes indutores (Laminarina, LPS e PMA) de camarões tratados com dieta suplementada com probiótico (*Bacillus* spp.) e dieta controle após 42 dias de experimento.



O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) dos indutores Laminarina, LPS e PMA com relação ao basal dentro de cada grupo.

4.5. CONCLUSÃO

Bacillus licheniformis CPQBA 571-12 DRM 07 foi capaz de inibir o patógeno *V. alginolyticus* BCCM 2068 *in vitro*. Todas as cepas isoladas foram capazes de produzir protease em testes *in vitro*. A utilização das cepas isoladas adicionadas na água de cultivo de sistema superintensivo diminuiu a concentração de *Vibrio* spp. na água. A

suplementação com probiótico *Bacillus* spp. na dieta aumentou a resposta dos parâmetros hemato-imunológicos nos camarões marinhos.

4.6. REFERÊNCIAS

Anand, P.S.S., Kohli, M.P.S., Kumar, S., Sundaray, J.K., Roy, S.D., Venkateshwarlu, G., Sinha, A., Pailan, G.H., 2014. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 418–419, 108–115.

BACHÈRE, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191, 3-11.

Ballester, E.L.C., Abreu, P.C., Cavalli, R.O., Emerenciano, M., de Abreu, L., Wasielesky, J.W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquaculture Nutrition*. 16, 163-172.

Banerjee, S., Khatoon, H., Shariff, M., Yusoff, F.M., 2010. Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. *Fisheries Science*. 76, 481-487.

Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosa, R.D. 2008. Inmunologia del camarón. *In: Vielka, M.Q., Cuéllar-Anjel, J. (Eds.), Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos, CYTED.* 169-224p.

Bauer, A.W., Kioby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493–496.

Beçak, W., Paulete, J., 1976. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. 327p.

Boyd, C. E., Clay J.W., 2002. Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Superintensive Shrimp Aquaculture System. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 17p.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 249-254.

Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R.P., Phillips, M., 2005. Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. FAO Fisheries Technical Paper. 476 p.

Carvalho, Rodrigo Aantônio Ponce de Leon Ferreira, 2011. Desenvolvimento de um sistema de recirculação sobre estudos de digestibilidade em condições de alto desempenho para camarões marinhos: avaliação de ingredientes alternativos a farinha de peixe em diferentes níveis de inclusão em dietas para juvenis de *Litopenaeus vannamei*. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 267p.

Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish & Shellfish Immunology. 23, 364-377.

Cominetti, M.R., Marques, M.R.F., Lorenzini, D.M., Lofgren, S.E., Daffre, S., Barracco, M.A. 2002. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. Developmental and Comparative Immunology. 26, 715-721.

Costa R.A., Vieira G.H.F., Silva G.C., Vieira R.H.S.F., Sampaio, S.S., 2008. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará. Braz J Vet Res Anim Sci. 45, 458-62.

Costa, A.M., Buglione, C.C., Bezerra, F.L., Martins, P.C.C., Barracco, M.A., 2009. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. Aquaculture. 291, 141–146.

Crab R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete W., 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemiafranciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. Journal of Applied Microbiology. 109, 1643-1649.

Fragkiadakis, G.A., Stratakis, E.K. 1995 Characterization of hemolymph lectins in the prawn *Parapenaeus longirostris*. Journal of Invertebrate Pathology. 65, 111-117.

- Guertler, C., Schleder, D.D, Barracco, M.A., Perazzolo, L.M. 2010. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. *Aquaculture Research*. 41, 1082-1088.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 233, 1-14.
- Hamouda, T., Shih, A.Y., Baker, J.R., 2002. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in applied microbiology*. 34, 86-90.
- Janeo, R.L., Corre Jr, V.L., Sakata, T., 2009. Water quality and phytoplankton stability in response to application frequency of bioaugmentation agent in shrimp ponds. *Aquacultural Engineering*. 40, 120-125.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Soderhall, K., 2006. Cell-mediated in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211, 213-236.
- Johnvesly, B., Naik, G.R., 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Proc. Biochem*. 37, 139-144.
- Kimura, M., 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111-120.
- Kopáček P., Grubhoffer, L., Soderhall, K. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 17, 407-418.
- Kumar, C.G., Takagi, H., 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17, 561-594.
- Laloo, R., Ramchuran, S.O., Ramduth, D.M., Gorgens, J., 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 1471-1479.

Leaño, E.M., Mohan, C.V., 2012. Early Mortality Syndrome Threatens Asia's Shrimp. *Global Aquaculture Advocate*. 4, 38-39.

Li, J., Tan, B., Mai, K., 2009b. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 291, 35–40.

Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., Hong, H., 2007a. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnology Letters*. 29, 525–530.

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

Liu, C.H., Chiu, C.S., Ho, P.L., Wang, S. W., 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*. 107, 1031-1041.

Lourenço, J.A., Santos, C.H.A., Braga neto, F.H.F., Arena, M.L., Igarashi, M.A., 2009. Influência de diferentes dietas no desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em berçários intensivos. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, 31, 1-7.

Luis-Villaseñor, I.E., Macías-Rodríguez, M.E., Gómez-Gil, B., Ascencio-Valle, F., Campa-Córdova, A.I., 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 321, 136-144.

Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., Xu, X. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 30, 607-617.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2002. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River. 991 p.

McIntosh, D., Samocha, T.M., Jones, E.R., Lawrence, A.L., Mckee, D.A., Horowitz, S., Horowitz, A., 2000. The effect of a commercial

bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquaculture Engineering*. 21, 215–227.

National Research Council (Estados Unidos da América), 2011. Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Nutrient requirements of fish and shrimp, Washington: National Academic Press. 376p.

Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P., Vuthiphandchai, V., 2008. Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*. 285, 123-129.

Ochoa-Solano, J.L., Olmos-Soto, J., 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*. 23, 519–525.

Polanczyk, R.A., Silva, R.F.P., Fiuza, L.M., 2004. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMith) (Lepidoptera: noctuidae). *Revista Brasileira de Agrociência*, 2, 209-214.

Ramírez, N.B., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Jesus, G.F.A., Ferreira, G.S., Andreatta, E.R., 2013. Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. *Pesq. agropec. bras.* 8, 913-919.

Ratanapo, S., Chulavatnatol, M. 1992 Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comparative and Biochemistry Physiology*. 97, 515-20.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 1998. Effects of a probiotic bacterium on black Tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. 167, 301–313.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

Schulz, D., Bonelli, R.R., Batista, C.R.V., 2005. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição*. 4, 403-411.

Schulze, A.D., Alabi, A.O., Tattersal-Sheldrake, A.R., Miller, K.M. 2006. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*. 256, 50-73.

Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta*. 797, 99–104.

Song, Y.L., Lee, S.P., 1983. Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Bulletin Institute Zoology*. 3, 217-220.

Strickland, J. D. H., Parsons, T. R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2 ed. Ottawa: Queen`s Printer, 310p.

Sze, C.P., 2000. Antibiotics use in aquaculture. *Infofish Internacional*. 19, 24-28.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596-1599.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins., 1997, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 24, 4876-4882.

Travers, R.S., Phyllis, A.W.M., Reichelderfer, C.F., 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 1263-1266.

Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L, Chiu, C.S., Liu, C.H., 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology*. 26, 339–344.

Van Soolinger, D., De Haas, Pew., Hermans, Pwm., Groenen, P., Van Embden, Jda., 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 31, 1987-95.

Vargas-Albones, F., Guzman, M.A.; Ochoa, J.L. 1993. A lipopolysaccharide binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 104, 407-413.

Vázquez, L., Maldonado, G., Agundis, C., Pérez, A., Cooper, E.L., Zenteno, E. 1997. Participation of a sialic acid-specific lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes, in the recognition of non-self cells. *Journal of Experimental Zoology*. 279, 265-272.

Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A.; Browdy, C., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 258, 396-403.

Xie, F., Zeng, W., Zhou, Q., Wang, H., Wang, T., Zheng, C., Wang, Y., 2012. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 358-359, 116-121.

Zhou, Q., Zeng, W., Wang, H., Wang, T., Wang, Y., Xie, F., 2012. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 364-365, 252-258.

Zhou, X., Wang, Y., 2012. Probiotics in Aquaculture – Benefits to the Health, Technological Applications and Safety. *Health and Environment in Aquaculture*. 215-226.

Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 683-689.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Pesquisas devem ser feitas com diferentes concentrações do probiótico *Bacillus* spp., assim como avaliar outras formas de inclusão do probiótico na dieta de *L. vannamei*.
- A realização de um teste de infecção com Vírus ou *Vibrio* depois de um período de suplementação na dieta com o probiótico, seria interessante para esclarecer os efeitos dessas bactérias no sistema hemato-imunológico do camarão marinho.
- Outro fator importante na avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos seria a contagem diferencial dos hemócitos, para saber quais deles (hialinos ou granulares) o probiótico conseguiu efetivamente aumentar.
- Avaliar os parâmetros hemato-imunológicos com mais frequência e não somente no final do experimento, para observar em qual momento seria importante aplicar o probiótico.
- A microscopia eletrônica poderia elucidar ainda mais os resultados, sendo também recomendada para outros estudos.

6. REFERÊNCIA DA REVISÃO DA LITERATURA

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p.3–11, 2000.

BACHÈRE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, v. 227, n. 1-4, p. 427-438, 2003.

BALCAZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. **The role of probiotics in aquaculture**, v.114, p.173-186, 2006.

BARRACCO, M.A; PERAZZOLO, L.M; ROSA, R.D. Inmunología del camarón. *In*: VIELKA, M.Q; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), **Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos**, CYTED, 2008, pp. 169-224.

BOYD, C. E.; CLAY J.W. Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Superintensive Shrimp Aquaculture System. **Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium**, 2002. 17p.

BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.P.; PHILLIPS, M. Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. **FAO Fisheries Technical Paper**, 2005. 476 p.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. Safety of Aquaculture Probiotics, *In*: Health Management. **Global Aquaculture Advocate**, p.86-87, 2006.

EL-SERSY, N.A.; ABDELRAZEK, F.A.; TAHA, S.M. Evaluation of various probiotic bacteria for the survival of *Penaeus japonicus* larvae. **Fresenius Environmental Bulletin**, v.15, n.12A, p.1506-1511, 2006.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fisheries and Aquaculture Department**. Acessado em 17 de jan. 2014. Online. Disponível em:

<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en>.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: Sofia, 2012. 230 p.

FAR, H.Z.; SAAD, C.R.B.; DAUD, H.M.; HARMIN, S.A.; SHAKIBAZADEH, S. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.3369-3376, 2009.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, n.1-4, p.1-14, 2004.

GUO, J. J.; LIU, K.; CHENG, S.; CHANG, C.; LAY, J.; HSU, Y.; YANG, J.; CHEN, T. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. **Aquaculture Research**, v.40, n.5, p.609-618, 2009.

LI, J.; TAN, B.; MAI, K. Dietary probiotic Bacillus OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.291, p.35–40, 2009b.

LI, K.; ZHENG, T.; TIAN, Y.; XI, F.; YUAN, J.; ZHANG, G.; HONG, H. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Biotechnology Letters**, v.29, p.525–530, 2007a.

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

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.; CHIU, C.S.; HO, P.L.; WANG, S. W. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by

a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.1031-1041, 2009.

LIU, K.; CHIU, C.; SHIU, Y.; CHENG, W.; LIU, C. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish & Shellfish Immunology**, v.28, p.837-844, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, 2002. 991 p.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164, p.351-358, 1998.

MOURIÑO, J.L.P.; BEZERRA, A.J.M.; CORRÊA, B.; VIEIRA, F.N. Utilização de probióticos na carcinicultura Parte 1: Panorama Geral. **Panorama da Aquicultura**, Botafogo, RJ, v., p., abr. 2010.

MOURIÑO, J.L.P.; JATOBÁ, A.; CORRÊA, B.; VIEIRA, F.N.; MARTINS, M.L. Probióticos na aquicultura. In: SOUZA, A.T.S.; LIZAMA, M.L.A.P.; TAKEMOTO, R.M. (Org.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. 1ªed. MARINGÁ, PR: ABRAPOA, 2012, v.1, p.381-404.

OCHOA-SOLANO, J.L.; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiology**, v.23, p.519-525, 2006.

PANDIYAN, P.; BALARAMAN, D.; THIRUNAVUKKARASU, R.; GEORGE, E.G.J.; SUBARAMANIYAN, K.; MANIKKAM, S.; SADAYAPPAN, B. In: Review Article: Probiotics in aquaculture. **Drug Invention Today**, v.5, p.55-59, 2013.

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; KOBAYASHI, T. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. **Veterinary Immunopathology**, v.102, p.379-388, 2004.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a

probiotic bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p. 271-288, 2000.

SANTOS, C.H.A.; LOURENÇO, J.A.; BAPTISTA, R.B.; IGARASHI, M.A. Crescimento e Sobrevivência do Camarão-Branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em Diferentes Salinidades. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p.783-789, jul./set. 2009.

SANTOS, Elaine Cristina Batista. **Desempenho produtivo do camarão cinza *Litopenaeus vannamei*, utilizando técnicas de povoamento direto e indireto.** 47 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recursos Pesqueiros, Recife, 2009.

SCHULZ, D.; BONELLI, R.R.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.4, p.403-411, 2005.

SILVA, E. F.; SOARES, M. A.; CALAZANS, N. F. VOGLEY, J. L.; DO VALLE, B. C.; SOARES, R.; PEIXOTO, S. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 44, 13-21, 2013.

TREECE, G.D. Shrimp Culture. **Encyclopedia of aquaculture**, p.805-868, 2000.

TSENG, D.Y.; HO, P.L.; HUANG, S.Y.; CHENG, S.C.; SHIU, Y.L., CHIU, C.S.; LIU, C.H. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish & Shellfish Immunology**, v.26, p.339-344, 2009.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Journal Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000a.

VIEIRA, Felipe do Nascimento. **Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha**. 133 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2010.

WANG Y.B.; HAN, J.Z. The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation of aquaculture. **Aquaculture**, v.269, p.349-354, 2007a.

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.1034–1039, 2005b.

ZHOU, Q.; LI, K.; JUN, X.; LIU, B. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource Technology**, v.100, p.3780-3786, 2009.

ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M.H.; TAKAMI, G.A.; LOVETT, D.L.; MIRVAGHEFI, A.; 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, n.2-4, p.516-524, 2006.