

**Tamiris Henrique Ferreira**

**PROBIÓTICOS AUTÓCTONES EM *Crassostrea gasar* DE  
CULTIVO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação  
em Aquicultura da Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção de grau de mestre em  
Aquicultura

Orientador: José Luiz Pedreira Mouriño

Coorientador: Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque

**Florianópolis  
2016**

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

Ferreira, Tamiris Henrique

Probióticos autóctones em *Crassostrea gasar* de cultivo /  
Tamiris Henrique Ferreira ; orientador, José Luiz  
Pedreira Mourião ; coorientador, Marcos Caivano Pedroso de  
Albuquerque . - Florianópolis, SC, 2016.  
70 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Enterococcus. 3. sobrevivência  
larval. 4. Imunologia. 5. ostra nativa. I. Pedreira  
Mourião, José Luiz . II. Caivano Pedroso de Albuquerque ,  
Marcos. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

# Probióticos autóctones em *Crassostrea gasar* de cultivo

Por

TAMIRIS HENRIQUE 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 Aquicultura.

---

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

Banca Examinadora:

---

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño – *Orientador*

---

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães - UFSC

---

Dr. Eduardo Carginin Ferreira - IFSC

---

Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC



*Dedico aos meus pais, M<sup>a</sup> Eglair e Wesley, por todo incentivo, carinho e ensinamentos. Sem vocês nada seria possível e certamente são de grande importância nas minhas realizações.*



“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Percebi que era necessário, uma vez em minha vida, desconsiderar tudo em que acredito e começar novamente desde os fundamentos, se quisesse estabelecer um conhecimento firme e constante.”

René Descartes

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível. Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, a oportunidade.”

Victor Hugo

“A qualidade da vida de uma pessoa é diretamente proporcional ao seu comprometimento com a excelência, independentemente do campo de atividade escolhido por ela.”

Vince Lombardi

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.”

William Shakespeare

“Celui qui déplace une montagne commence par déplacer de petites pierres.”

Confucius



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida.

Às minhas irmãs Thalita e Thaís que sempre estiveram ao meu lado nos piores e melhores momentos.

Aos queridos Delano Schleder e Cristhiane Guertler, minha eterna gratidão, o mérito dos resultados deste são, sem dúvidas, consequência de todo ensinamento, paciência e dedicação de vocês, creio que sem todo esse apoio nada teria se concretizado. Pessoas que, além de toda parceria, me fizeram acreditar que a empatia ainda existe e que a capacidade de exercê-la vem sempre acompanha de seres humanos maravilhosos. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de trabalhar e conviver com vocês, estes me fizeram crescer intelectualmente e espiritualmente.

Ao Dr. José Luiz Pedreira Mouriño pela orientação e confiança em mim depositada durante os dois anos de mestrado e na realização deste trabalho. Sou muito grata pelo aprendizado, pela experiência, pela convivência que tivemos e principalmente pela paciência.

Ao coorientador Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque pela experiência em campo e por estar sempre disponível para me auxiliar.

À família Laffitte Fernandes (segunda família) por todo carinho e incentivo nos momentos difíceis.

À família nordestina que surgiu em Florianópolis: Hortência, Renata, Gicella, Paula, Priscila e Lincoln (paulista agregado) tenho vocês no coração. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, pelas brigas, pelas gargalhadas e principalmente pela amizade e compreensão. Selvaaaaaa !!!!

Às eternas amigas Emanuely, Érica, Nathalia e Viviane Medeiro, por toda paciência e por sempre se mostrarem presente nos momentos que eu mais precisei. Mesmo longe fizeram questão de mostrar que a amizade é verdadeira e que eu tenho um espacinho reservado no coração de cada uma.

Ao eterno mestre Dr. Pedro Carlos Cunha Martins por conceder uma pequena parte do material para execução deste trabalho, pelo incentivo ao crescimento profissional e por sempre acreditar e me fazer ver que eu sou capaz afinal, no meio acadêmico, tudo tem um “pelinho de sapo”.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Oscarina de Souza do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado e o Dr. Rodrigo Maggione, do Centro de Diagnóstico para Enfermidades de Organismos Aquáticos, do

Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, por gentilmente ceder parte do material utilizado nas análises deste experimento.

Aos queridos integrantes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM): Norha, Vitor Pontinha, Marco veterinário, Fernanda Marques, Fernanda Moreira, Nicole, Felipe Vieira, Marysol, Dimas, Carlos Miranda, Carlos biólogo, Janaina, Ilsinho e Davi, por serem tão prestativos nos momentos em que precisei.

À equipe do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), em especial ao Chico, por toda paciência para transmitir conhecimentos fundamentais para desenvolvimento deste.

À equipe do laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS): Ana Carolina, Natália Locks, Mony, Maria Luiza, Marcela, Gabriel, Marco, Hugo, Paula, Zé Victor, William, Lilian e Mayara (visitante) por se disponibilizarem sempre que necessário.

Ao técnico do laboratório AQUOS, Lucas Cardoso, por toda ajuda e companheirismo.

À Grazi Vieira por toda ajuda durante o mestrado.

À Scheila Anelise por toda ajuda na fase final da escrita deste.

À Colaboradora Patrícia Garcia pelo auxílio na histologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida durante os dois anos de mestrado.

A todos aqueles que não foram citados, mas ajudaram de alguma forma, meu muito obrigada!

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar cepas de bactérias da gônada e da parte final do intestino de *Crassostrea gigas* e avaliar sua utilização como probiótico na *Crassostrea gasar* desafiada com *Vibrio parahaemolyticus* a fim de melhorar a resposta imune de ostras adultas e a sobrevivência das larvas após desafio experimental. Apenas duas cepas de bactérias foram isoladas, uma a partir da gônada (*Enterococcus faecium*) e outra do intestino (*Enterococcus durans*), que seguiram para testes *in vitro* de antagonismo, taxa de crescimento, tempo de duplicação e contagem de células viáveis. Quanto a eventuais melhorias nos parâmetros imunológicos, microbiológicos e histológicos, as cepas de *E. faecium* e de *E. durans* foram aplicadas na água na concentração de  $10^5$  UFC  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> durante 15 dias para ostras adultas da espécie *C. gasar*, alimentadas com *Chaetoceros muelleri*. *Enterococcus durans* foi a única cepa utilizada para a sobrevivência das larvas "D". As larvas foram divididas em quatro grupos, Controle, tratado com *E. durans*, Controle desafiado com *Vibrio parahemolyticus* e *E. durans* desafiado com *V. parahemolyticus*. *E. durans* apresentou melhores resultados *in vitro*. Análises imunológicas das ostras demonstraram que a aplicação das cepas de *E. durans* mostrou maior título aglutinante e atividade de fenoxidase após 15 dias de tratamento do que o grupo controle e o grupo tratado com *E. faecium*. A aplicação de *E. faecium* e *Enterococcus durans* promoveu o aumento do número de bactérias heterotróficas totais e ácido-láctico totais. A sobrevivência das larvas tratadas com o *E. durans* mostrou-se maior do que dos demais grupos. Tendo isso em vista, a cepa probiótica com o maior potencial para a cultura de *C. gasar* é a *E. durans*.

**Palavras chave:** *Enterococcus*, sobrevivência larval, imunologia, ostra nativa.



## ABSTRACT

The aim of this work was to isolate strains of bacteria from the gonad and final part of the intestine of *Crassostrea gigas* and evaluate its use as probiotic on *Crassostrea gasar* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*, in order to improve the immune response of adult oysters and larval survival after experimental challenge. Only two bacterial strains were isolated, one from the gonad (*Enterococcus faecium*) and the other from the intestine (*Enterococcus durans*), which were followed by *in vitro* tests of antagonism, growth rate, doubling time and viable cell count. Towards possible improvements in the immune, microbiological and histological parameters, *E. faecium* (TG) and *E. durans* (TI) strains were enforced in water at a concentration of  $10^5$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> during 15 days for adult oysters of the specie *C. gasar* which were fed with *Chaetoceros muelleri*. *E. durans* was the only strain used for larval survival "D". The larvae were divided into four groups, Control, treated with *E. durans*, Control challenged with *Vibrio parahemolyticus* and *E. durans* challenged with *V. parahemolyticus*. The strain that showed best *in vitro* results was *E. durans* bacteria. Immunological analyzes of oysters demonstrated that the application of *E. durans* strain showed higher binding capacity and phenoloxidase activity after 15 days of treatment than control groups and the one treated with *E. faecium*. The application of *E. faecium* and *E. durans* increased the numbers of total heterotrophic bacteria and the total lactic acid. The survival of the larvae treated with *E. durans* showed higher than that of other groups. In view of this, the probiotic strain with the highest potential for the cultivation of *C. gasar* is *E. durans*.

**Keywords:** *Enterococcus*, larval survival, immunology, native oyster.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Halos de inibição das cepas TG selecionadas da gônada e TI selecionadas do intestino frente às bactérias patogênicas..... 45
- Figura 2:** Contagem total de hemócitos de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI)... 46
- Figura 3:** Título aglutinante de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas mais cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). ..... 47
- Figura 4:** Concentração proteica do soro de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI)... 48
- Figura 5:** Atividade da enzima PO ( $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ) na hemolinfa total de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). ..... 49
- Figura 6:** Corte histológico da ostra *Cassostrea gasar* tratada com bactérias probióticas..... 51



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentração de bactérias no intestino e gônada de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI)..... 50
- Tabela 2:** Área total, área do epitélio e área do lúmen de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). ..... 50
- Tabela 3:** Sobrevivência larval 24h após infecção com *Vibrio parahaemolyticus* ..... 52



## SUMÁRIO

RESUMO .....	31
ABSTRACT .....	33
Principais doenças em cultivo de moluscos bivalves .....	22
Métodos para controle de patógenos na larvicultura.....	23
Probiótico .....	24
Sistema imune de moluscos bivalves .....	25
Proteínas de reconhecimento.....	26
Atividade da fenoloxidase (PO).....	26
2.JUSTIFICATIVA.....	29
3.OBJETIVOS .....	31
Objetivo geral.....	31
Objetivos específicos .....	31
PROBIÓTICOS AUTÓCTONES EM <i>Crassostrea gasar</i> DE CULTIVO .....	33
RESUMO .....	34
ABSTRACT .....	35
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
2.1 Isolamento e caracterização <i>in vitro</i> de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico.....	37
2.1.1 Obtenção dos animais .....	37
2.1.2. Obtenção das cepas bacterianas .....	37
2.1.3 Atividade da catalase .....	38
2.1.4 Cinética de crescimento .....	38
2.1.5 Inibição de patógenos <i>in vitro</i> .....	39
2.1.6 Identificação bioquímica e molecular das cepas .....	39
2.2 Utilização das cepas potencialmente próbióticas em ostras <i>C.</i> <i>gasar</i> adultas .....	40
2.2.1 Preparo do inóculo de cepas potencialmente probióticas.....	40
2.2.2 Material biológico.....	40
2.2.3 Delineamento experimental .....	40
2.2.4 Parâmetros imunológicos.....	41
2.2.4.1 Contagem total de hemócitos (THC) .....	41
2.2.4.2 Capacidade aglutinante de hemolinfa (Lectina).....	41

2.2.4.3	Concentração de proteína do soro .....	42
2.2.4.4	Atividade da fenoloxidase (PO) .....	42
2.2.5	Contagem bacteriana na gônada e trato intestinal da ostra ..	42
2.2.6	Histologia.....	42
2.3	Sobrevivência de larvas de ostra <i>Crassostrea gasar</i> submetidas a tratamento com bactérias potencialmente probióticas.	43
2.3.1	Delineamento experimental .....	43
2.3.2	Sobrevivência e pós-infecção .....	44
2.4	Análises estatísticas .....	44
3.	RESULTADOS.....	44
3.1	Isolamento e caracterização <i>in vitro</i> de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico .....	44
3.2	Atividade da catalase .....	45
3.3	Cinética de crescimento .....	45
3.4	Inibição de patógenos <i>in vitro</i> .....	45
3.5	Identificação bioquímica e molecular .....	46
3.6	Parâmetros imunológicos.....	46
3.6.1	Contagem total de hemócitos (THC) .....	46
3.6.2	Capacidade aglutinante de hemolinfa (Lectina) .....	47
3.6.3	Concentração de proteína do soro.....	47
3.7	Contagem bacteriana na gônada e trato intestinal da ostra .....	49
3.8	Histologia.....	50
3.9	Sobrevivência de larvas de ostra <i>Crassostrea gasar</i> submetidas a tratamento com bactérias potencialmente probióticas.	51
4.	DISCUSSÃO .....	52
5.	CONCLUSÃO .....	55
6.	REFERÊNCIAS.....	55
7.	REFERÊNCIA DA INTRODUÇÃO GERAL.....	61
APÊNDICE A	.....	67
APÊNDICE B	.....	68
ANEXO 1	.....	69
ANEXO 2	.....	70

## 1.INTRODUÇÃO

A aquicultura vem se expandindo de forma rápida e sustentável sendo um dos segmentos mais importantes do setor pesqueiro mundial. Constitui a alternativa de maior viabilidade para suprir a crescente demanda de pescado, tornando-se um grande destaque na produção mundial. Nos últimos anos, o aumento médio anual foi de 6,2%, mostrando que a produção mais do que duplicou, passando de 32,4 milhões de toneladas em 2000 para 70,1 milhões em 2013 (FAO, 2016).

Dentre os países maiores produtores aquícolas, destacam-se a China, em 1º lugar com 43 milhões de ton, a Índia com 4,5 milhões de ton, a Indonésia com 3,8 de ton, o Vietnã com 3,2 milhões de ton, seguidos por Bangladesh, Noruega, Egito, Tailândia, Chile, Mianmar, Filipinas, Japão e Brasil. Os organismos aquáticos cultiváveis com maior volume são os peixes, com produção de 47 milhões de toneladas, seguido pelos moluscos, com 15,5 milhões de toneladas e crustáceos, 6,7 milhões de toneladas (FAO, 2016).

Na atualidade, o Brasil ocupa a 13ª posição entre os maiores produtores aquícolas mundiais, com uma produção de 474.159 toneladas em 2013 (FAO, 2016), sendo a mesma dividida em três principais tipos: a piscicultura, a carcinicultura e a malacocultura (EPAGRI, 2013).

A produção de moluscos (malacocultura) destaca-se pelo rápido desenvolvimento da tecnologia de cultivo, baixo custo de implantação e manutenção, acelerado crescimento dos animais e baixa taxa de mortalidade (DORE, 1991; COVA, 2013).

A malacocultura é praticada intensivamente no mundo desde e primeira metade do século XX. Porém, somente na década de 70 esta atividade teve início em diversas partes do Brasil, sem um motivo aparente, a não ser o científico ou econômico, já que não havia nenhum plano de incentivo governamental (POLI, 2004).

Comercialmente, a malacocultura começou a desenvolver-se na década de 90, inicialmente em Santa Catarina e posteriormente no Paraná, em São Paulo, no Rio de Janeiro, no Espírito Santo, em Pernambuco, em Alagoas, em Sergipe e na Paraíba. Embora praticamente todos os estados litorâneos apresentem alguma produção de moluscos, a região Sul concentra a maior produção nacional, sendo Santa Catarina o principal produtor (OCEANOS, 2008).

Dentre as espécies de moluscos cultiváveis, a ostra-do-Pacífico *Crassostrea gigas* é uma das espécies de maior interesse comercial devido à sua rusticidade, rapidez de crescimento e valor comercial (DORE, 1991).

A *Crassostrea gigas* é uma espécie originária de águas frias e salinas, pouco tolerantes ao clima tropical e temperaturas altas. Dessa forma, adaptou-se muito bem às condições de cultivo na região Sul do Brasil (POLI, 2004). Para melhor aproveitamento dos ambientes costeiros brasileiros, as pesquisas estão avançando visando ao aumento da produção de espécies nativas, que possuem grande potencial produtivo, com contínua fecundidade proporcionando disponibilidade de sementes ao longo do ano (NASCIMENTO, 1991).

Das espécies nativas brasileiras destaca-se o cultivo *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757) encontrada principalmente fixada nas raízes aéreas da árvore do mangue *Rhizophora mangle* ou sobre zonas intertidais e costões rochosos (NASCIMENTO, 1983).

Apesar da espécie *C. gasar* (= *C. brasiliana* (LAMARCK, 1819)) apresentar potencial para ostreicultura, ainda não há tecnologia capaz de manter a constância na produção de sementes desta espécie em laboratório. Por isso, pesquisas estão sendo desenvolvidas visando garantir a disponibilidade contínua das sementes, sendo necessário obter-se reprodutores sexualmente maduros, aptos a desovarem o ano inteiro (RAMOS, 2011).

### **Principais doenças em cultivo de moluscos bivalves**

Em muitos locais a história da produção de ostras tem sido de ciclos de crescimento e perdas, causadas por doenças, predadores ou outros riscos naturais (DORE, 1991). Porém, nas criações a quantidade de patógenos pode se tornar um fator de risco em virtude da limitação do espaço físico.

As enfermidades são importantes fatores ecológicos, podem afetar o desenvolvimento do animal bem como a eficiência metabólica, alterando taxas de crescimento, reprodução e morfologia. Surtos epidemiológicos podem causar alterações nas estruturas populacionais, reduzir seu tamanho, distribuição e abundância, afetar de forma espacial e temporal, diminuir a reprodução podendo causar a extinção das populações (DAME, 1996).

Dentre os principais agentes patogênicos em bivalves marinhos estão os vírus, bactérias, fungos, protozoários, trematódeos, poliquetas e copépodes (KINNE, 1983). As maiores mortalidades e morbidades em bivalves cultivados são promovidas por bactérias e protozoários dos gêneros *Bonamia*, *Mikrocytos*, *Marteilia*, *Perkinsus* e *Haplosporidium* (DA SILVA, 2008).

Na costa brasileira, os principais registros de patógenos em moluscos bivalves dizem respeito àqueles ocasionados por bactérias e organismos semelhantes à Rickettsiae; protozoários como *Sphenophrya* sp., *Trichodina* sp., *Ancistrocoma* sp., *Nematopsis* sp., *Perkinsus* sp. e *Steinhausia mytilovum*; fungos não identificados e metazoários: *Urustoma* sp., *Bucephalus margaritae*, *Tylocephalum* sp., *Polydora websteri*, *Pseudomyicola spinosus* (BOEHS et al. 2012).

Enfermidades ocasionadas por vírus e bactérias também são comumente encontradas em larvicultura de moluscos, acarretando elevadas perdas. Dentre os vírus que causam mortalidade nesta fase está o *Oyster Velar Virus Disease* e o *Herpes viruses* (ELSTON 1979; ELSTON e WILKINSON, 1985; NICOLAS, 1992) e o gênero *Vibrio* para as bactérias. As vibreonáceas causam mortalidade em todos os estágios larvais e muitas vezes estão associadas às condições de cultivo em massa, altas temperaturas, estresse e falta de assepsia durante o manejo (ELSTON, 1990).

Os víbrios predominantemente encontrados e associados ao cultivo de moluscos são o *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashii* e *V. splendidus*. Estes microrganismos podem colonizar o manto dos hospedeiros e causar doenças que promovam natação anormal, atrofia visceral, lesões nos órgãos, aglutinação de larvas no fundo dos tanques, entre outros (DE SALVO, 1978; LAMBERT, 1998; PRADO et al., 2005). Além destas espécies, outros víbrios têm sido identificados nas últimas duas décadas: o *V. neptunius*, pela primeira vez descrito como um patógeno de moluscos, e outras duas espécies que foram isoladas e classificadas como *Vibrio* sp., as quais, apesar de apresentar semelhanças com *V. orientalis* e *V. vulnificus*, não poderiam ser atribuídas a estas espécies (PRADO et al., 2005).

### **Métodos para controle de patógenos na larvicultura**

As instalações de um laboratório de larvicultura de molusco são propícias à proliferação bacteriana, devido à presença de cultivos de microalgas, matéria orgânica e temperatura constante, que favorecem o crescimento bacteriano (LODEIROS, 1988).

Alguns métodos profiláticos são utilizados para controlar a incidência de patógenos na larvicultura de organismos bivalves. Dentre elas estão o uso de fluxo contínuo de água e o tratamento da mesma com filtração, pasteurização, ozonização e radiação ultravioleta (UV) (VERSCHUERRE et al., 2000; PRADO, 2006). Estas estratégias de controle são muito eficazes na redução dos níveis de matéria orgânica,

matéria em suspensão e carga bacteriana. No entanto, não é tão eficaz microbiologicamente, pois podem eliminar tanto as bactérias patogênicas como as benéficas, favorecendo a colonização por microrganismos oportunistas (PRADO et al. 2010).

Um dos métodos para controlar a proliferação de patógenos em larvicultura é a utilização de antibióticos (AVENDAÑO; RIQUELME, 1999; BEM, 1999), pois este quimioterápico aumenta a porcentagem de sobrevivência das larvas, apesar de este método poder selecionar cepas bacterianas resistentes aos antibióticos (FITT et al., 1992; MADIGAN et al. 1997).

A utilização de diversos tipos de antibióticos na produção animais tem sido abolida em diversos países, assim como na União Europeia desde o ano de 2006 (LÜCKSTÄDTS, 2006).

Contudo, métodos profiláticos alternativos têm sido testados para o controle de enfermidades na larvicultura, como limpeza dos equipamentos com produtos naturais e utilização de bactérias probióticas.

## **Probiótico**

Probióticos são microrganismos vivos que, ao serem ministrados nos tanques de cultivo, atuam benéficamente no organismo aquático a ser produzido, melhorando o consumo ou absorção do alimento, o sistema imunológico, o balanço de bactérias no trato intestinal ou no ambiente de cultivo (VERSCHUERE et al., 2000).

O efeito benéfico da utilização de probióticos pode ser alcançado de diferentes formas, seja como complemento nutricional, aumento da resposta imune, atividade antibacteriana ou estimulação dos processos biológicos e melhoria da qualidade da água (PRADO et al., 2010).

Os probióticos de uso aquático possuem alguns fatores que devem ser considerados importantes quando comparados aos probióticos desenvolvidos para ambientes terrestres. Os animais aquáticos têm uma relação muito mais próxima com o meio em que vivem, tornando a ação de agentes patogênicos maior, já que os mesmos são capazes de se manter na água e proliferar independentemente de haver um animal hospedeiro (HANSEN e OLAFSEN, 1999; VERSCHUERE et al., 2000a).

Dentre as características desejáveis de uma cepa probiótica, está a condição do microrganismo, sendo aconselhável que o mesmo seja extraído do mesmo ambiente onde será utilizado, ou seja, autóctone (RIQUELME et al., 1996; VERSCHUERE et al., 2000). Este fato

garante a capacidade de a cepa se desenvolver no ambiente e minimiza os riscos decorrentes da introdução de organismos alóctones no sistema. Deve ser observado também o efeito benéfico, a falta de patogenicidade e toxicidade, não só para o organismo alvo, mas para outros organismos vivos que podem estar presentes no ambiente, como o fitoplâncton. Além disso, não devem proliferar até níveis perigosos quando inoculados na água (PRADO, 2010).

Na literatura existem poucos exemplos da utilização de bactérias probióticas em bivalves que atuam de forma positiva na inibição *in vitro* (GIBSON et al., 1998; LONGEON et al., 2004; PRADO et al., 2009), na atividade antibacteriana, na produção de substâncias bactericidas (JORQUERA et al., 1999), na atividade antibacteriana na água do mar demonstrando a inibição do crescimento de víbrios (PRADO et al., 2009), no fornecimento de cepa potencialmente probiótica misturadas a microalgas que impede a proliferação de víbrios (PRADO et al., 2002) e na diminuição de infecção causada por *Vibrio anguillarum* em larvas (RIQUELME et al., 1996).

### **Sistema imune de moluscos bivalves**

Os moluscos, como todos os invertebrados, dispõem de um sistema imunológico que os protege contra patógenos. Este sistema restringe-se a uma imunidade inata que está ligada à hemolinfa, não ocorrendo o sistema adaptativo altamente específico dos vertebrados, que inclui a imensa variedade de anticorpos, receptores específicos e as células de memória (SCHLEDER, 2007).

Hemócitos são células imunofetoras presentes no líquido circulante, onde se pode encontrar moléculas solúveis no plasma, denominada hemolinfa, que atuam no reconhecimento e degradação de agentes não-próprios (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001; SONG et al., 2010). Dentre os imunoparâmetros mais utilizados para expressar condição de saúde em bivalves estão os hemogramas, representados pela a contagem total (THC – “total haemocytes count”) e diferencial de hemócitos (DHC – “differential haemocytes count”) VARGAS-ALBORES e BARRACCO (2001).

Os hemócitos são os principais responsáveis pelas reações imuno-celulares, como a fagocitose de microrganismos, a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas em torno dos invasores e sua destruição pela produção e/ou liberação de moléculas tóxicas e microbicidas (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001). Patógenos como

parasitas são identificados através dos padrões moleculares e posteriormente neutralizados ou destruídos pela produção de moléculas tóxicas e microbicidas a partir dos hemócitos circundantes (VARGAS-ALBORES e BARRACCO, 2001). Dentre estas moléculas, destacam-se as enzimas lisossomais, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM). A resposta inflamatória em bivalves se dá pela infiltração de hemócitos no tecido infectado e no agente estranho, formando cápsulas ou nódulos. Nestes processos, os hemócitos utilizam o mesmo mecanismo microbicida da fagocitose (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001).

Já os fatores humorais presentes na hemolinfa compreendem moléculas de reconhecimento como as lectinas, o sistema pró-fenoloxidase (proPO) que envolve a geração de vários compostos citotóxicos intermediários, que levam à neutralização ou destruição dos patógenos invasores colaborando na prevenção e controle de infecções nos moluscos (ENGELMANN et al., 2005; MUTA, 2006).

### **Proteínas de reconhecimento**

Situações de estresse causadas por fatores ambientais, fisiológicos ou infecções podem resultar em alteração dos níveis de lectinas na hemolinfa de moluscos. As lectinas estão entre as proteínas humorais de maior destaque as quais são glicoproteínas naturalmente encontradas no plasma dos bivalves, e possuem a capacidade de ligar-se a açúcares específicos presentes na superfície de diferentes células, causando sua aglutinação. (MARQUES e BARRACCO, 2000). Estas funcionam como proteínas de reconhecimento de padrões moleculares específicos associados a carboidratos presentes na superfície de patógenos e dão início às respostas imunes efetoras, como a aglutinação dos microrganismos invasores e a opsonização facilitando a fagocitose dos patógenos (MARQUES e BARRACCO, 2000).

### **Atividade da fenoloxidase (PO)**

O sistema proPO é uma cascata proteolítica muito estudada em crustáceos e insetos. A enzima chave neste processo é a fenoloxidase (PO), enzima envolvida na melanização durante processo de encapsulamento, formação de nódulos e cicatrização de feridas. A PO desencadeia a produção do pigmento escuro que se deposita principalmente nas regiões centrais dos nódulos e cápsulas celulares

formados em torno de patógenos invasores (LERCH, 1988; NAPPI e SEYMOUR, 1991; NAPPI e VASS, 1993; SODERHALL e CERENIUS, 1998; CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008; CERENIUS et al., 2010). A PO é parte de um sistema de ativação da cascata proteolítica chamada pró-fenoloxidase (proPO). Este sistema é ativado por componentes da parede da célula fúngica ( $\beta$  1,3-glucanos) e bactérias Gram negativas (LPS), fazendo com que estes componentes sejam reconhecidos como estranhos e desencadeando a ativação dos hemócitos e liberação da enzima proPO (JOHANSSON e SODERHALL, 1989; SODERHALL, 1982, 1992; CERENIUS e SODERHALL, 2004; CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008; CERENIUS et al., 2010).

O sistema proPO ainda não foi bem estabelecido para imunologia de bivalves, diferindo dos crustáceos e insetos. Alguns autores afirmam que a superfície de microrganismos em algumas espécies de bivalves não parece ser ativada, além do que os nódulos e cápsulas de moluscos não apresentam melanização (BARRACCO e DA SILVA, 2008).

O artigo científico foi formatado segundo as normas da revista “Aquaculture”.



## 2.JUSTIFICATIVA

A utilização de probiótico na aquicultura tem sido estudada principalmente na área da carcinicultura e pisciculturas com o intuito de melhorar a interação entre ambiente de cultivo e organismo cultivado. A aplicação de probióticos autóctones para diversos organismos na aquicultura tem demonstrado melhorias nos parâmetros zootécnicos, saúde dos animais e resposta imune frente a patógenos. Tendo em vista seu potencial de aplicação e a escassez de estudos sobre a seleção e a aplicação de cepas autóctones potencialmente probióticas para moluscos bivalves, esta pesquisa se mostra de suma importância. Além disto, a espécie nativa *Crassostrea gasar* apresenta grande potencial para ostreicultura nacional, no entanto ainda não há estratégias tecnológicas capazes de manter boas taxas de sobrevivência e constância na produção de sementes em laboratório. Por isso, o uso de cepas autóctones com potencial probiótico pode ser aplicado e melhorar tais parâmetros. Dessa forma, o presente estudo contribuirá para o desenvolvimento de nova estratégia de manipulação bacteriana que poderá ser aplicada em larvicultura auxiliar no desenvolvimento do cultivo de moluscos bivalves.



### 3.OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Contribuir para o desenvolvimento de tecnologia capaz de auxiliar na melhora de resposta imunológica de ostras adultas e no aumento da sobrevivência de larvas da ostra nativa brasileira *Crassostrea gasar*.

#### Objetivos específicos

- Isolar, selecionar e identificar cepas de bactérias autóctones potencialmente probióticas do intestino e gônada de ostra do gênero *Crassostrea gasar* e *C. gigas*;
- Verificar *in vitro* o potencial de inibição das cepas de bactérias autóctones potencialmente probióticas quando confrontadas com diversas bactérias patogênicas;
- Analisar o efeito da incorporação das cepas de bactérias autóctones potencialmente probióticas em água de cultivo da ostra nativa *Crassostrea gasar*, por histologia, microbiologia e avaliação dos parâmetros imunológicos.
- Verificar a sobrevivência de larvas da ostra nativa tratada com a cepa bacteriana autóctone potencialmente probiótica após desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus*.



## PROBIÓTICOS AUTÓCTONES EM *Crassostrea gasar* DE CULTIVO

Tamiris H. Ferreira<sup>a\*</sup>, Delano D. Schleder<sup>b</sup>, Cristhiane Guertler<sup>b</sup>, Vitor de A. Pontinha<sup>b</sup>, Lincoln G. Coronel<sup>b</sup>, Marysol S. Rodrigues<sup>b</sup>, Natália L. Ferreira<sup>a</sup>, Norha C. B. Ramírez<sup>b</sup>, Marcos C. P. de Albuquerque<sup>c</sup>, José L. P. Mouriño<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis -SC, CEP:88062-601, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis -SC, CEP:88062-601, Brasil

<sup>c</sup>Laboratório de Moluscos Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 88062-601, Brasil

(\* ) As correspondências devem ser endereçadas para:

e-mail: [tamirishenrique@hotmail.com](mailto:tamirishenrique@hotmail.com)

Fone: +55 48 3721-4102

Fax: +55 48 3221-5472

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar cepas de bactérias da gônada e da parte final do intestino de *Crassostrea gigas* e avaliar sua utilização como probiótico na *Crassostrea gasar* desafiada com *Vibrio parahaemolyticus* a fim de melhorar a resposta imune de ostras adultas e a sobrevivência das larvas após desafio experimental. Apenas duas cepas de bactérias foram isoladas, uma a partir da gônada (*Enterococcus faecium*) e outra do intestino (*Enterococcus durans*), que seguiram para testes *in vitro* de antagonismo, taxa de crescimento, tempo de duplicação e contagem de células viáveis. Quanto a eventuais melhorias nos parâmetros imunológicos, microbiológicos e histológicos, as cepas de *Enterococcus faecium* e de *Enterococcus durans* foram aplicadas na água na concentração de  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> durante 15 dias para ostras adultas da espécie *C. gasar*, alimentadas com *Chaetoceros muelleri*. *Enterococcus durans* foi a única cepa utilizada para a sobrevivência das larvas "D". As larvas foram divididas em quatro grupos, Controle, tratado com *Enterococcus durans*, Controle desafiado com *Vibrio parahemolyticus* e *Enterococcus durans* desafiado com *V. parahemolyticus*. *Enterococcus durans* apresentou melhores resultados *in vitro*. Análises imunológicas das ostras demonstraram que a aplicação das cepas de *Enterococcus durans* mostrou maior título aglutinante e atividade de fenoloxidase após 15 dias de tratamento do que o grupo controle e o grupo tratado com *Enterococcus faecium*. A aplicação de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* promoveu o aumento do número de bactérias heterotróficas totais e ácido-láctico totais. A sobrevivência das larvas tratadas com o *Enterococcus durans* mostrou-se maior do que dos demais grupos. Tendo isso em vista, a cepa probiótica com o maior potencial para a cultura de *C. gasar* é a *E. durans*.

**Palavras chave:** *Enterococcus*, sobrevivência larval, imunologia, ostra nativa.

## ABSTRACT

The aim of this work was to isolate strains of bacteria from the gonad and final part of the intestine of *Crassostrea gigas* and evaluate its use as probiotic on *Crassostrea gasar* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*, in order to improve the immune response of adult oysters and larval survival after experimental challenge. Only two bacterial strains were isolated, one from the gonad (*Enterococcus faecium*) and the other from the intestine (*Enterococcus durans*), which were followed by *in vitro* tests of antagonism, growth rate, doubling time and viable cell count. Towards possible improvements in the immune, microbiological and histological parameters, *Enterococcus faecium* (TG) and *Enterococcus durans* (TI) strains were enforced in water at a concentration of  $10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup> during 15 days for adult oysters of the specie *C. gasar* which were fed with *Chaetoceros muelleri*. *Enterococcus durans* was the only strain used for larval survival "D". The larvae were divided into four groups, Control, treated with *Enterococcus durans*, Control challenged with *Vibrio parahemolyticus* and *Enterococcus durans* challenged with *V. parahemolyticus*. The strain that showed best *in vitro* results was *Enterococcus durans* bacteria. Immunological analyzes of oysters demonstrated that the application of *Enterococcus durans* strain showed higher binding capacity and phenoloxidase activity after 15 days of treatment than control groups and the one treated with *Enterococcus faecium*. The application of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* increased the numbers of total heterotrophic bacteria and the total lactic acid. The survival of the larvae treated with *Enterococcus durans* showed higher than that of other groups. In view of this, the probiotic strain with the highest potential for the cultivation of *C. gasar* is *E. durans*.

**Keywords:** *Enterococcus*, larval survival, immunology, native oyster.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a ostreicultura está baseada na produção de três principais espécies: *Crassostrea gigas*, *C. rhizophorae* e *C. gasar*. Dentre estas espécies, a *C. gigas* está bem difundida no Estado de Santa Catarina, compondo a maior produção de ostras cultivadas no país, com 98% do total nacional (IBGE, 2014). No entanto, os problemas ocasionados pelo clima tropical afetam o desenvolvimento desta espécie em outras regiões do país (Gomes et al., 2014).

Desta forma, pesquisas estão sendo realizadas a fim de aumentar a produção de moluscos no país. Para tal, tem se buscado a utilização de espécies nativas, que possuem elevado potencial para garantir a disponibilidade de sementes ao longo do ano (Nascimento, 1983). Dentre as espécies nativas, destaca-se a *Crassostrea gasar*, que está distribuída por toda costa brasileira (Nascimento, 1991).

Apesar da espécie *C. gasar* apresentar potencial para ostreicultura, ainda não há tecnologia capaz de manter a constância na produção de sementes desta espécie em laboratório (Ramos, 2011). Outro fator que interfere diretamente no desenvolvimento desta espécie é a ocorrência de enfermidades que podem afetar o desenvolvimento do animal, a eficiência do seu metabolismo, alterar suas taxas de crescimento, reprodução e morfologia.

As bactérias são os principais agentes patogênicos responsáveis pelas elevadas taxas de mortalidade na fase larval, sendo as do gênero *Vibrio* as de maior ocorrência na larvicultura de moluscos bivalves, podendo estar associadas às condições de manejo e assepsia inadequados (Elston, 1990).

Alguns métodos profiláticos vêm sendo utilizados a fim de diminuir a mortalidade no estágio larval e controlar a incidência de patógenos de organismos bivalves, dentre eles estão: o uso de fluxo contínuo de água, filtração, pasteurização, ozônio, radiação UV e a utilização de antibióticos (Avendaño; Riquelme, 1999; Bem, 1999; Verschuere et al., 2000; Prado, 2006). Este último mecanismo age benéficamente aumentando o percentual de sobrevivência das larvas, mas pode propiciar maior resistência de cepas bacterianas patogênicas, tornando este quimioterápico ineficaz (Fitt et al., 1992; Madigan et al. 1997).

Um método profilático alternativo que vem sendo utilizado em organismos aquáticos são as bactérias probióticas, que atuam benéficamente, melhorando a absorção do alimento, o sistema

imunológico, o equilíbrio de bactérias no trato intestinal e/ou no ambiente de cultivo (Verschuere et al., 2000).

Alguns microrganismos já foram isolados e utilizados com probióticos para larvicultura de moluscos bivalves como: *Flavobacterium* sp. P14 (Lodeiros et al., 1989), *Alteromonas* sp. CA2 (Douillet e Langdon, 1993), *Alteromonas* sp. CA2 (Douillet e Langdon, 1994), *Pseudoalteromonas haloplanktis* INH (Riquelme et al., 1996), *Vibrio* sp. C33 e *Pseudomonas* sp. 11 (Riquelme et al., 1997), *Aeromonas media* A199 (Gibson et al., 1998), *Vibrio* sp. C33 (Avenidaño e Riquelme, 1999), S21 (Nakamura et al., 1999), *Phaeobacter gallaeciensis* BS107 (Ruiz-Ponte et al., 1999), *Vibrio* sp. C33 *Pseudomonas* sp. 11 (Riquelme et al., 2001), *Bacillus* sp. B2 e *Pseudoalteromonas* sp. X153 (Longeon et al., 2004) e *Phaeobacter gallaeciensis* 154 (Prado, 2006).

No entanto, a maioria dos estudos sobre probióticos na aquicultura estão direcionados para cultivos de peixe e crustáceos. Poucas são as literaturas mostrando a sua aplicação para moluscos bivalves com resultados positivos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é selecionar e aplicar cepas autóctones potencialmente probióticas para *Crassostrea gasar*, a fim de melhorar a resposta imunológica de ostras adultas e aumentar a sobrevivência de larvas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Isolamento e caracterização *in vitro* de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico**

#### **2.1.1 Obtenção dos animais**

Foram coletadas 10 ostras da espécie *Crassostrea gigas* e 10 ostras da espécie *C. gasar*, provenientes da sala de condicionamento de reprodutores do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e encaminhadas para o setor de Microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM).

#### **2.1.2. Obtenção das cepas bacterianas**

Para a obtenção das cepas, os animais foram escovados manualmente, lavados com água do mar filtrada e esterelizada (UV) e separados para remoção dos organismos incrustantes. Posteriormente, as ostras foram abertas assepticamente com o auxílio de uma espátula

estéril para a retirada de amostras da gônada e parte final do intestino. Estas foram imersas em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com 3% de NaCl estéril e incubadas em estufa de crescimento bacteriológico a 35°C por 24h. Após este período foram coletadas amostras de cada tubo, com auxílio de uma alça de platina, para esgotamento por estria em placas de Petri contendo ágar MRS com 3% de NaCl e 1% de azul de anilina, as quais foram incubadas em estufa de crescimento bacteriológico a 35°C por 48h. Em seguida, foram selecionadas as unidades formadoras de colônias com características de bactérias ácido-láticas a fim de observar a morfologia bacteriana existente utilizando o método de coloração Gram.

### 2.1.3 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi testada utilizando uma gota de peróxido de hidrogênio 40% sobre as colônias das bactérias previamente selecionadas e cultivadas em ágar MRS com 3% de NaCl (Condon, 1987).

### 2.1.4 Cinética de crescimento

As cepas foram incubadas em triplicata em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura líquido MRS com 3% de NaCl e mantidos a 35°C durante 24h. O monitoramento do crescimento bacteriano foi realizado a cada duas horas, pela leitura de 100µL de amostra de cada tubo em leitor de microplacas a 630nm. A concentração do inóculo foi transformada em unidades formadoras de colônia (UFC·mL<sup>-1</sup>) a partir de uma curva padrão previamente realizada para cada cepa. A partir destes resultados, foi calculada a velocidade máxima de crescimento e o tempo de duplicação das cepas, de acordo com as seguintes equações:

Velocidade máxima:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln(Z) - \ln(Z_0)}{dt}$$

Onde:

$\mu_{m\acute{a}x}$  = velocidade máxima de crescimento

Z = concentração (UFC·mL<sup>-1</sup>)

Z<sub>0</sub> = concentração inicial do inóculo (UFC·mL<sup>-1</sup>)

dt = tempo de cultivo (horas)

Tempo de duplicação:

$$t_{dup} = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}$$

Onde:

$t_{dup}$  = tempo de duplicação (horas)

$\mu_{max}$  = velocidade máxima de crescimento

Após 16h de crescimento bacteriano, amostras de todos os tubos de ensaio foram semeadas em meio de cultura ágar MRS pela técnica de diluições seriadas e incubadas a 35°C por 48h para determinar a viabilidade celular. Passado este período, foram estimadas as unidades formadoras de colônia (UFC·mL<sup>-1</sup>).

### 2.1.5 Inibição de patógenos *in vitro*

Para o teste de inibição de patógeno *in vitro* foram utilizadas bactérias patogênicas provenientes do cepário da microbiologia do LCM: *Vibrio harveyi* (ATCC 14126), *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V. vulnificus* (LAM 64 Canadá), *V. anguillarum* (ATCC 19264). As mesmas foram reativadas em caldo “Infuso de Cérebro e Coração” (BHI) com 3% de NaCl e incubadas a 30°C por 24h.

As cepas potencialmente probióticas selecionadas foram avaliadas quanto à inibição do crescimento das bactérias patogênicas, de acordo com a técnica de Difusão de Discos em Ágar descrito por Ramiréz et al. (2006). As cepas candidatas a probióticas foram semeadas em placas de Petri contendo MRS Agar com 3% de NaCl e 1% de azul de anilina e incubadas a 35°C por 48h. Após este período, foram retirados discos de aproximadamente 0,8mm, posicionados invertidos sobre as placas contendo os patógenos semeados e então as placas foram incubadas a 30°C por 24h. O halo de inibição foi medido com o auxílio de um paquímetro.

### 2.1.6 Identificação bioquímica e molecular das cepas

Para esta análise, foi utilizado um kit de identificação fenotípica, API 50 CHL (BioMérieux®) de acordo com a metodologia do fabricante. Já a análise molecular foi realizada pela empresa Biotecnologia Pesquisa e Inovação (BPI). O sequenciamento foi

automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidos foi comparado com as sequências depositadas no GenBank.2.

## **2.2 Utilização das cepas potencialmente próbióticas em ostras *C. gasar* adultas**

### **2.2.1 Preparo do inóculo de cepas potencialmente próbióticas**

Para o preparo do probiótico, as cepas TG e TI foram repicadas em caldo MRS com 3% de NaCl e incubadas a 35°C por 48h. Passado esse período, foram centrifugadas a 1800 x *g* a 4°C por 10 minutos, excluindo o sobrenadante, ressuspensando o *pellet* em solução salina estéril (NaCl 3%) e ajustando a concentração para  $1,00 \times 10^5$  UFC·ml<sup>-1</sup> Kesarcodi-Watson et al. (2012).

### **2.2.2 Material biológico**

Foram utilizados indivíduos adultos com  $2,95 \pm 0,46$ cm de altura e comprimento de  $8,37 \pm 1,00$ cm da espécie *Crassostrea gasar*, provenientes do cultivo experimental do LMM, localizado na Baía Norte de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°35'S e 48°32'W).

### **2.2.3 Delineamento experimental**

As ostras adultas (n=180) foram coletadas em campo e transportadas até o Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). Os animais foram distribuídos em caixas de polietileno com capacidade para 20L, abastecidas com 12L de água do mar filtrada, esterilizada (UV), com aeração constante, temperatura de 21°C e fotoperíodo natural para aclimação por 24h. Elas foram divididas em três tratamentos com quatro réplicas, totalizando 12 unidades experimentais, contendo 15 animais cada. Os tratamentos consistiam em: grupo controle alimentado somente com microalga (*Chaetoceros muelleri*); grupo alimentado com microalga (*C. muelleri*) e bactérias ácido-láticas extraídas da gônada (TG) e grupo alimentado com microalga (*C. muelleri*) e bactérias ácido-láticas extraídas do intestino (TI). As ostras foram alimentadas duas vezes ao dia com concentração de  $30 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup> de microalgas *C. muelleri* e os grupos tratados receberam adicionalmente bactérias ácido-láticas à concentração de  $1,00 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Diariamente, 50%

da água foi renovada, o oxigênio dissolvido e a temperatura verificados com o auxílio de um oxímetro. O pH, alcalinidade, amônia e nitrito foram analisados a cada sete dias. O experimento teve duração de 15 dias. A primeira coleta foi realizada na chegada dos animais ao bioensaio (CI), e a segunda e terceira coletas ocorreram, respectivamente, sete e 15 dias após o início dos tratamentos, ou seja, após o período de alimentação com microalga (C) e microalga acrescida de bactérias potencialmente probióticas (TG e TI). Todas as análises descritas a seguir foram realizadas nas três coletas (Apêndice A).

#### **2.2.4 Parâmetros imunológicos**

Para os parâmetros imunológicos das ostras, foi coletada hemolinfa do músculo adutor com o auxílio de agulha e seringas estéreis de 1 mL resfriadas. Foram coletados quatro *pools* de três animais de cada grupo. Para Contagem Total de Hemócitos (THC) foram retirados 30 $\mu$ L destas amostras e fixados em 90 $\mu$ L de solução de Alsever modificada com 4% de formol (336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2). Para o preparo do soro, a hemolinfa coletada foi congelada e descongelada duas vezes para o rompimento das células e o extravasamento do conteúdo intracelular, posteriormente armazenado a -20°C até a realização das análises descritas na sequência.

##### **2.2.4.1 Contagem total de hemócitos (THC)**

A contagem total de hemócitos foi estimada em câmara de Neubauer. Conforme detalhado anteriormente, as amostras foram diluídas quatro vezes para a realização da contagem.

##### **2.2.4.2 Capacidade aglutinante de hemolinfa (Lectina)**

Para determinar o título de aglutininas/lectinas, foram depositados 50 $\mu$ L de uma solução de TBS (50 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4) em todos os poços de uma microplaca (fundo em “U”). Em seguida adicionou-se no primeiro poço 50 $\mu$ L do soro seguindo-se de uma diluição seriada nos poços subsequentes. Por fim, 50 $\mu$ L de uma solução de eritrócitos de cão a 2% (em NaCl 0,15 M) foram adicionados em cada poço e a mistura incubada por 2h em câmara úmida à temperatura ambiente. Nos controles, o soro das ostras 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.

### **2.2.4.3 Concentração de proteína do soro**

A concentração de proteína do soro foi estipulada utilizando o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

### **2.2.4.4 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. A atividade da fenoloxidase foi verificada incubando-se 50µl do soro acrescido de 50µL de L-DOPA (3 mg.ml<sup>-1</sup>) e 50µL de TBS (50 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 9,0) em microplacas de 96 poços com fundo chato e monitorada em leitora de microplaca a 490nm após 5, 10 e 20 minutos. A atividade enzimática da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteínas, onde a unidade de atividade enzimática equivale ao aumento de 0,001 na absorbância por min a 20°C. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

### **2.2.5 Contagem bacteriana na gônada e trato intestinal da ostra**

Em cada coleta foram feitos quatro *pools* de três animais, os quais foram abertos assepticamente para amostragem da parte final do intestino e gônada que, após serem pesados separadamente, foram macerados com o auxílio de um gral com pistilo estéril e diluídos serialmente na proporção de 1:10. Posteriormente, as diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> foram semeadas em MRS 3% com azul de anilina e em Triptona de Soja (TSA) com 3% de NaCl, para quantificar bactérias ácido-láticas e heterotróficas totais nos respectivos meios.

### **2.2.6 Histologia**

Utilizando-se os mesmos animais do item anterior, foi retirado um corte transversal em relação à massa visceral, contendo glândula digestiva, brânquias, intestino, manto e gônada, e fixado em solução de Davidson por 24h. Posteriormente, realizou-se o procedimento padrão para histologia: desidratação, diafanização, parafinização e inclusão em

parafina. Os blocos foram cortados com auxílio de um micrótomo manual na espessura de  $5\mu\text{m}$  e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para verificar a normalidade dos tecidos analisados. As lâminas coradas foram analisadas em microscópio de luz.

## **2.3 Sobrevivência de larvas de ostra *Crassostrea gasar* submetidas a tratamento com bactérias potencialmente probióticas**

Para esta etapa, foram utilizadas 30 mil larvas “D” da ostra nativa *C. gasar* provenientes do LMM, e encaminhadas para o Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS).

### **2.3.1 Delineamento experimental**

Para a consecução do delineamento experimental, a metodologia utilizada foi adaptada a partir de Kesarcodi-Watson et al. (2012), como segue.

Após a chegada das larvas, iniciou-se um tratamento com Eritromicina a 5 ppm e as mesmas permaneceram em um recipiente plástico contendo 5L de água filtrada e esterilizada, mantidas a  $30^{\circ}\text{C}$  e sob aeração constante por 20h. Passado este período, as larvas foram lavadas três vezes com auxílio de uma peneira de malha de  $35\mu\text{m}$  e água do mar filtrada e autoclavada. Em seguida as larvas foram ressuspensas em 1L de água do mar autoclavada e redistribuídas em recipientes plásticos cilíndricos preenchidos com 20 ml de água do mar estéril e larvas “D” na proporção de 14 larvas· $\text{mL}^{-1}$ .

Para este teste, foi utilizada apenas a cepa de bactérias isolada do intestino, com base nos resultados obtidos no experimento anterior.

Os tratamentos, apresentando quatro réplicas, foram divididos em grupo controle (C), grupo tratado com a cepa potencialmente probiótica na concentração  $1,00 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (TI- $10^5$ ), grupo desafiado com *V. parahaemolyticus* na concentração  $1,00 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (V- $10^5$ ), grupo tratado com probiótico na concentração  $1,00 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  e desafiado com *V. parahaemolyticus* na concentração  $1,00 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  (TI- $10^5$ + V $10^5$ ).

Durante 48h, a cepa probiótica foi adicionada (1 vez ao dia) seguindo a concentração determinada para cada tratamento. Após este período, foi cessada a adição da cepa probiótica e, nos tratamentos com desafio, foi adicionada a cepa de *V. parahaemolyticus* nas respectivas concentrações, e as larvas mantidas por mais 24h (Apêndice B).

### 2.3.2 Sobrevivência e pós-infecção

A contagem para verificar a sobrevivência das larvas foi feita 72h após o tratamento com a cepa potencialmente probiótica (TI-10<sup>5</sup>) e 24h após a infecção. As contagens foram feitas em quadruplicatas, utilizando 0,5ml de cada amostra em uma câmara de Sedgewick Rafter com auxílio de microscópio óptico no aumento de 10x. Os inóculos da cepa potencialmente probiótica foram preparados de acordo com a metodologia utilizada no item 2.2.1.

O inóculo da cepa de *Vibrio parahaemolyticus* foi ativado em caldo de BHI a 3% de NaCl e incubado em estufa bacteriológica a 30°C. Após 24h, o meio contendo esta bactéria foi centrifugado a 1000 x g, descartado o sobrenadante, o *pellet* ressuspensionado e a concentração do inóculo ajustada para 1,00 x 10<sup>5</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> em solução salina estéril com 3% NaCl.

### 2.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por ANOVA unifatorial e, quando necessário, transformados em Log<sub>2</sub>. Para inibição de patógenos *in vitro*, THC, atividade da PO, concentração de proteínas, atividade aglutinante da hemolinfa e análises histológicas os dados foram separados pelo teste Tuckey. Já os dados de microbiologia e sobrevivência de larvas pós-infecção foram separados pelo teste Scheffé. Todos os testes utilizaram nível de significância de 5% (p<0,05) e foram realizados com auxílio do Software Statistica 10.0<sup>®</sup>. Os dados são apresentados em termos de média ± desvio padrão.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Isolamento e caracterização *in vitro* de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico

Foram isoladas 20 cepas bacterianas da ostra *Crassostrea gigas*, através da morfologia, coloração de Gram e formação de colônias azuis em ágar MRS com azul anilina, pela produção de ácido-lático. Entretanto, para a *Crassostrea gasar*, utilizando-se a mesma metodologia, não foi possível isolar cepas bacterianas com as características desejadas.

### 3.2 Atividade da catalase

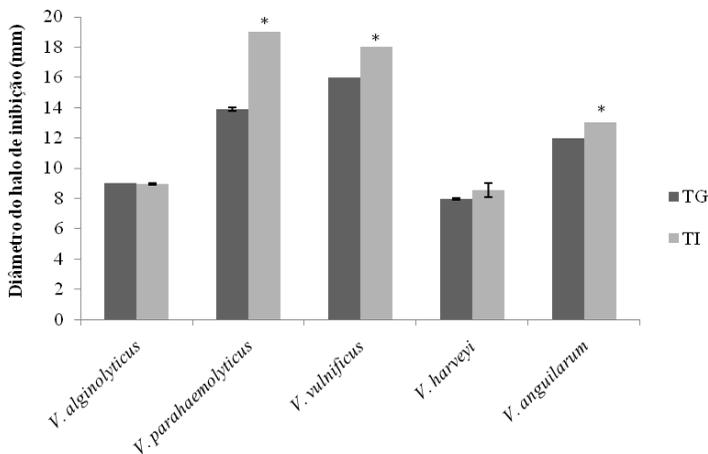
Para o teste de catalase, das 20 cepas isoladas, 18 foram positivas e apenas duas negativas, uma da gônada (TG) e uma do intestino (TI), as quais foram selecionadas.

### 3.3 Cinética de crescimento

As cepas potencialmente probióticas apresentaram respectivamente velocidade de crescimento, tempo de duplicação e concentração final similares:  $0,196 \pm 0,00 \cdot h^{-1}$ ,  $3,53 \pm 0,00 \cdot h$  e  $7,8 \pm 0,00 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  para TI e  $0,294 \pm 0,00 \cdot h^{-1}$ ,  $2,35 \pm 0,00 \cdot h$  e  $1,70 \pm 0,00 \times 10^9 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  para TG.

### 3.4 Inibição de patógenos *in vitro*

Os maiores halos de inibição foram encontrados utilizando a TI contra os *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. anguillarum* (Figura 3).



**Figura 1:** Halos de inibição das cepas TG selecionadas da gônada e TI selecionadas do intestino frente às bactérias patogênicas *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* e *V. anguillarum*. \* Representa diferença significativa entre os grupos.

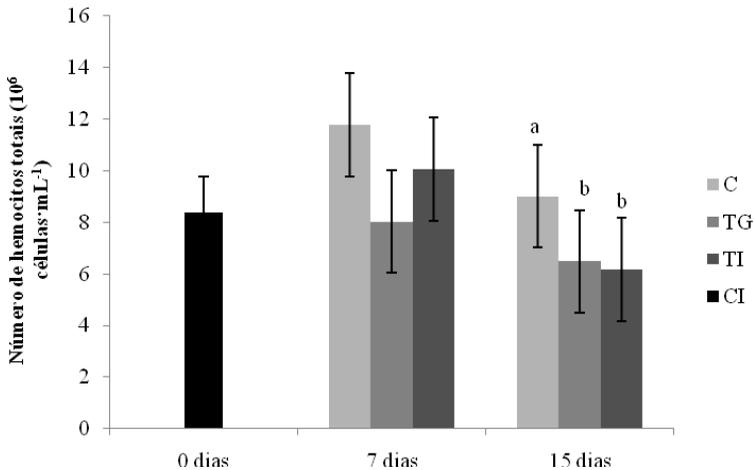
### 3.5 Identificação bioquímica e molecular

A identificação bioquímica revelou que a cepa TG era *Lactococcus lactis* com 85,6% de confiabilidade e a TI era *Lactococcus lactis* com 54,3% ou *Lactococcus plantarum* com 24,1%. Entretanto, a TG foi identificada molecularmente como *Enterococcus faecium* com 99% de confiabilidade (Anexo 1) e a TI como *Enterococcus durans* com 100% de confiabilidade (Anexo 2).

### 3.6 Parâmetros imunológicos

#### 3.6.1 Contagem total de hemócitos (THC)

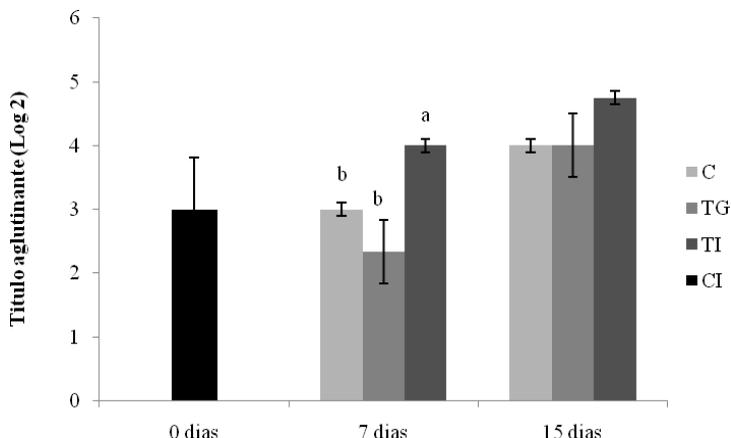
As maiores contagens de hemócitos foram verificadas após sete dias de experimento em todos os grupos (C, TG e TI), sendo iguais ao controle inicial. A menor contagem foi observada após 15 dias de tratamento com a cepa *E. durans* (Figura 4).



**Figura 2:** Contagem total de hemócitos de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). Letras diferentes representam diferenças significativas.

### 3.6.2 Capacidade aglutinante de hemolinfa (Lectina)

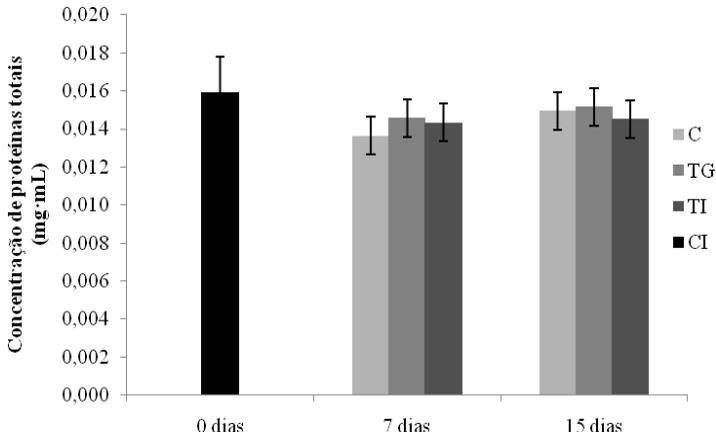
O título aglutinante do grupo tratado com bactérias ácido-láticas do intestino após sete dias (TI) apresentou maior capacidade aglutinante quando comparado com os outros dois grupos da mesma coleta ( $p < 0,05$ ). Após 15 dias não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 5).



**Figura 3:** Título aglutinante de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas mais cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas.

### 3.6.3 Concentração de proteína do soro

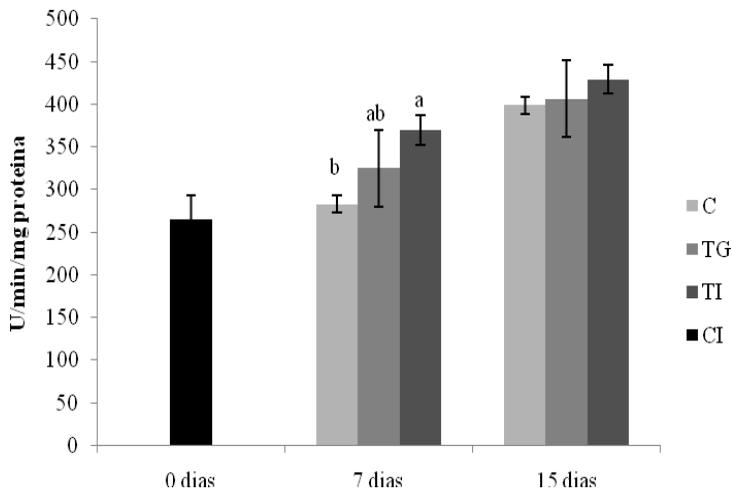
Não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 6) em relação à concentração de proteína do soro.



**Figura 4:** Concentração proteica do soro de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI).

### 3.6.7 Atividade da fenoloxidase (PO)

Após a utilização da cepa TI, observou-se aumento significativo na atividade da PO em relação aos controles e ao grupo TG após sete dias de exposição. Contudo, todos os grupos apresentaram aumento desta enzima após 15 dias, não diferindo entre si (Figura 7).



**Figura 5:** Atividade da enzima PO ( $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ ) na hemolinfa total de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos.

### 3.7 Contagem bacteriana na gônada e trato intestinal da ostra

Os grupos que foram tratados com *E. faecium* (TG) e *E. durans* (TI) apresentaram maior concentração de bactérias heterotróficas totais e bactérias ácido-láticas totais em relação aos controles após 7 dias de exposição, tanto na gônada quanto no intestino (Tabela 1). Após quinze dias, a concentração de bactérias heterotróficas totais e bactérias ácido-láticas totais foram maiores na gônada dos animais tratados com TI ( $p < 0,05$ ) do que nos demais grupos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Concentração de bactérias no intestino e gônada de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas de cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI). Contagem de bactérias heterotróficas totais (Ágar TSA) no trato intestinal e gônada e contagem de bactérias ácido-láticas (Ágar MRS) no trato intestinal e gônada.

Tempo de exposição (dias)	Tratamentos	Bactérias heterotróficas (UFC·mL <sup>-1</sup> )		Bactérias ácido-láticas (UFC·mL <sup>-1</sup> )	
		Gônada	Intestino	Gônada	Intestino
0	CI	3,48±0,3	5,42±1,7	2,00±0,1	2,49±0,4
	C	3,30±0,1 <sup>b</sup>	3,63±0,9 <sup>b</sup>	0,00±0,1 <sup>b</sup>	0,00±0,0 <sup>b</sup>
7	TG	4,73±0,2 <sup>a</sup>	5,28±0,1 <sup>a</sup>	4,47±0,3 <sup>a</sup>	5,34±0,1 <sup>a</sup>
	TI	4,61±0,7 <sup>a</sup>	5,58±1,2 <sup>a</sup>	4,02±0,6 <sup>a</sup>	5,93±0,5 <sup>a</sup>
15	C	3,45±0,6 <sup>b</sup>	3,93±0,2 <sup>b</sup>	2,15±0,2 <sup>c</sup>	3,36±0,1 <sup>ns</sup>
	TG	3,60±0,2 <sup>b</sup>	6,83±1,1 <sup>a</sup>	3,10±0,2 <sup>b</sup>	5,65±2,3 <sup>ns</sup>
	TI	4,56±0,3 <sup>a</sup>	5,11±1,4 <sup>ab</sup>	4,69±0,2 <sup>a</sup>	4,69±1,3 <sup>ns</sup>

Dados médios ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05)

ns: não significativo

### 3.8 Histologia

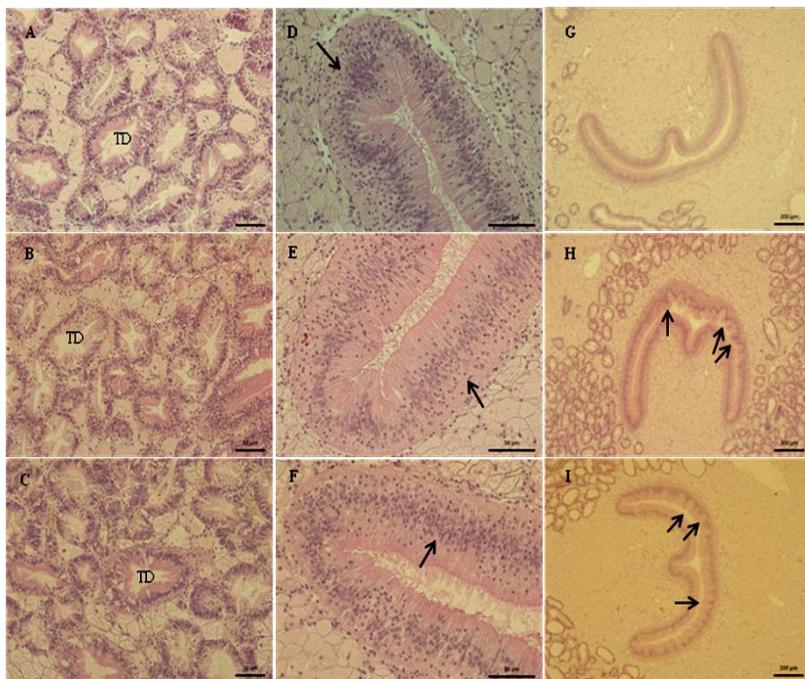
As lâminas contendo cortes histológicos das ostras não apresentaram comprometimento dos tecidos analisados (Figura 8). Apesar de apresentarem diferença na morfologia do epitélio do intestino (Figura 8 G, H e I), não foram verificadas diferenças estatísticas significativas nas análises histológicas da área total, área do epitélio e área do lúmen intestinal dos animais após 15 dias de aplicação das cepas candidatas a probióticas *E.faecium* e *E. durans* (Tabela 2).

**Tabela 2:** Área total, área do epitélio e área do lúmen de *Crassostrea gasar* alimentadas com microalgas (C) e microalgas acrescidas cepas probióticas *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI).

Tratamentos	Área total (µm <sup>2</sup> )	Área do epitélio (µm <sup>2</sup> )	Área do lúmen (µm <sup>2</sup> )
C	377460,2±59834,7ns	35468,62±14333,8 ns	49447,22±26275,2ns
TG	365337,3±72305,2 ns	49452,74±22507,8 ns	42826,48±25244,0ns
TI	323928,8±65667,3 ns	39824,10±23308,3 ns	44204,19±11259,8ns

Dados médios ± desvio padrão.

ns: não significativo



**Figura 6:** Corte histológico da ostra *Cassostrea gasar* tratada com bactérias probióticas. As letras **A**, **B** e **C** indicam os túbulos digestivos (TD). Barra: 50  $\mu\text{m}$ ; **D**, **E** e **F**: epitélio do intestino (setas). Barra: 50  $\mu\text{m}$  e **G**, **H** e **I**: Vilosidades no epitélio (setas) do intestino dos grupos controle (**A**, **D** e **G**), tratado com bactérias probióticas *Enterococcus faecium* (**B**, **E** e **H**) e *Enterococcus durans* (**C**, **F** e **I**). Barra: 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.9 Sobrevivência de larvas de ostra *Crassostrea gasar* submetidas a tratamento com bactérias potencialmente probióticas

A taxa de sobrevivência das larvas de *C. gasar* do grupo controle não diferiu significativamente quando comparada à do grupo tratado com probiótico e infectado com *V. parahaemolyticus* (TI- $10^5$ +V- $10^5$ ). O grupo tratado somente com a *Enterococcus durans* na concentração  $1,00 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> obteve maior sobrevivência ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3:** Sobrevivência larval 24h após infecção com *Vibrio parahaemolyticus* e 72h após os inóculos da bactéria probiótica *Enterococcus durans*.

Tratamento	Sobrevivência larval (%)
Controle	9,20±6,4 <sup>b</sup>
TI-10 <sup>5</sup>	41,69±18,9 <sup>a</sup>
V-10 <sup>5</sup>	0,00±0,0 <sup>c</sup>
TI-10 <sup>5</sup> +V-10 <sup>5</sup>	29,88±19,5 <sup>ab</sup>

Dados médios ± desvio padrão.

Letras diferentes indicam diferenças significativas

#### 4. DISCUSSÃO

Para ampliar o conhecimento com relação à utilização de bactérias ácido-láticas autóctones com potencial probiótico, o presente estudo representa o primeiro relato sobre efeitos imunomoduladores, microbiológicos e histológicos para espécimes de moluscos bivalves *Crassostrea gasar* e sobre a sobrevivência de larvas pós-infecção.

As bactérias ácido-láticas são utilizadas como probióticos por possuir a capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas através de compostos antibacterianos (Fuller, 1989). Essas apresentam alguns aspectos característicos, entre eles: serem Gram-positivas, imóveis, não esporuladas, morfologia de cocos, carência de citocromos e não possuir a enzima catalase, que possui função antioxidante e atua na transformação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em oxigênio (Ramírez et al. 2006). As bactérias lácticas não possuem esta enzima, conseqüentemente, não formam microbolhas quando expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mangoni et al. 2011; Poffo e Silva 2011; Li et al. 2012). Por este motivo, apenas as cepas TG e TI foram selecionadas.

A inibição de patógenos *in vitro* é outro critério utilizado para seleção de bactérias probióticas, por avaliar o potencial destas de inibir o crescimento de diferentes patógenos capaz de causar danos aos animais cultivados (Vine et al. 2004). Leyton e Riquelme (2010) constataram que bactérias do gênero *Bacillus* isolados de ovos de *Concholepas concholepas* possuíram efeitos inibitórios à bactéria patogênica *V. parahaemolyticus*. Semelhantemente, a cepa TI do presente estudo

apresentou maiores halos de inibição *in vitro* frente ao *Vibrio parahaemolyticus*.

Outras características que devem ser avaliadas em uma cepa probiótica são velocidade de crescimento e o tempo de duplicação. Vieira et al. (2013) relatam que a velocidade de crescimento da melhor candidata probiótica testada foi de  $0,15 \pm 0,01$  e o tempo de duplicação de  $4,56 \pm 0,38$ . Estes valores são menores aos reportados no presente estudo. Isto demonstra que as candidatas isoladas e selecionadas apresentam boas características probióticas.

Delgado e Mayo (2004) analisaram fenotipicamente cepas de bactérias ácido-láticas através de testes bioquímicos e fisiológicos clássicos e comprovaram a pouca eficiência do teste bioquímico para isolados pertencentes ao gênero *Lactococcus*, não permitindo a separação genética de subespécies, como no caso de *Lactococcus lactis*. Segundo estes mesmos autores, de 39 cepas isoladas e identificadas fenotipicamente pertencentes ao gênero *Lactococcus*, 25% não eram deste gênero e foram identificados molecularmente como *Enterococcus*. Fato ocorrido no presente trabalho, onde as cepas identificadas fenotipicamente foram detectadas como *Lactococcus lactis* e confirmadas molecularmente como *Enterococcus faecium* (TG) e *Enterococcus durans* (TI).

Bactérias ácido-láticas do gênero *Enterococcus* são descritas como potencialmente probióticas como a: *E. faecium* isolados a partir de Ngari (Abdhul et al., 2014), *E. casseliflavus* isolada do *Pagrus major* (Dawood et al., 2016) e *E. mundtii* isoladas do músculo do *Psetta maxima* (Campos et al., 2006). Estes estudos permitem supor o potencial probiótico de aplicação do gênero *Enterococcus* também para moluscos bivalves.

Jiang et al (2013) observaram que a contagem total de hemócitos do *Haliotis discus hannai*, alimentados com dietas contendo as bactérias *Shewanella colwelliana* e *Shewanella olleyana*, obtiveram um aumento com relação ao grupo controle no início do experimento, não havendo diferença significativa entre os grupos ao final do mesmo. Diferentemente do encontrado no presente estudo, onde a contagem total de hemócitos dos grupos não diferiu no início do experimento, sendo observada somente ao final (após 15 dias), onde o grupo controle apresentou maior contagem em relação aos grupos que foram expostos à *E. faecium* ou *E. durans*. Esta menor contagem de hemócitos nos grupos tratados pode estar relacionada à adaptação dos animais à imunostimulação, sem que esta estivesse sobrecarregando o sistema imune. Entretanto, foi possível observar aumento da imunocapacidade

das células de defesa com o aumento da atividade da fenoloxidase e título aglutinante no grupo que recebeu *E. durans*, logo após 15 dias de exposição. Este fato pode estar relacionado a maior concentração de bactérias ácido-láticas as quais promoveram, possivelmente, o aumento da capacidade imune das células de defesa da *C. gasar*.

Sabe-se que o sistema proPO é ativado por quantidades mínimas de lipopolissacarídeos (LPS) contidos na parede celular de bactérias Gram negativas (Söderhäll, 1998). O aumento da atividade da PO nos animais tratados com TG e TI pode estar relacionado à imunomodulação positiva. Alguns trabalhos relatam a atividade da fenoloxidase em moluscos bivalves como no reportado por Schleder et al. (2008), onde *Nodipecten nodosus* maduras e pós-desova tratadas com dieta rica em astaxantina utilizada com imunoestimulante não obtiveram diferença significativa da atividade desta enzima. Resultados semelhantes foram apresentados por Jiang et al (2013), onde *Haliotis discus hannai* Ino tratados com bactérias probióticas alóctones e o grupo controle não obtiveram diferença significativa da atividade da fenoloxidase ao final do experimento. Confirmando o reportado nesta pesquisa, onde não houve diferença da PO entre os grupos após 15 dias.

A adição de *E. faecium* e *E. durans* para ostra nativa *C.gasar* promoveu o aumento da concentração de bactérias ácido-láticas totais e heterotróficas totais no intestino e gônada das ostras. Resultados semelhantes foram observados por Vieira (2006) onde houve o aumento na contagem de bactérias láticas e bactérias heterotróficas totais no trato intestinal do camarão marinho, que recebeu dieta suplementada com *Lactobacillus plantarum* autóctone. Já em pesquisa realizada com *Oreochromis niloticus* utilizando *L. plantarum* autóctone na dieta, observou-se maior concentração de bactérias ácido-láticas e menor concentração de bactérias heterotróficas totais por grama de intestino (Jatobá et al., 2008). O aumento no número de bactérias láticas e heterotróficas totais indica que houve a colonização pelas candidatas testadas, *E. faecium* e *E. durans*.

Como evidenciado por Riquelme et al. (2001), a sobrevivência de larvas de *Argopecten purpuratus* após tratamento com cepas de probióticas de *Vibrio* sp. C33 e *Pseudomonas* sp. 11 não apresentou diferença significativa quando comparada com as tratadas com antibióticos. Kesarcodi-Watson et al. (2012) constataram que a adição prévia dos probióticos *Alteromonas macleodii* 0444, *Neptunomonas* sp. 0536, *Phaeobacter gallaeciensis* e *Pseudoalteromonas* sp. D41 promoveram proteção significativa às larvas de *Pecten maximus* desafiadas com *Vibrio splendidus*. O mesmo autor verificou também os

benefícios significativos na sobrevivência das larvas de *Ostrea edulis* suplementadas *Alteromonas macleodii* 0444, *Neptunomonas* sp. 0536, *Phaeobacter gallaeciensis* e desafiadas com *Vibrio pectinica*. Para *C. gigas* desafiadas com *V. coralliilyticus*, as porcentagens de sobrevivência foram significativas quando suplementadas com as *Phaeobacter gallaeciensis* e *Pseudoalteromonas*, no entanto quando acrescidas com a cepa probiótica *Neptunomonas* sp. 0536 obtiveram resultado contrário, de forma que houve aumento da mortalidade das larvas tratadas (Kesarcodi-Watson et al., 2012). No presente estudo, a sobrevivência de larvas D de *C. gasar* tratadas com *E. durans* apresentou sobrevivência maior do que as do grupo controle.

## 5. CONCLUSÃO

Foi possível isolar duas cepas autóctones com potencial probiótico, uma da gônada *Enterococcus faecium* e outra do intestino *E. durans*, de ostras *Crassostrea gigas*. Quando incorporadas à água do cultivo da ostra nativa *C. gasar* proporcionaram imunomodulação, colonizando o intestino e gônada, sem causar danos aos tecidos intestinais e glândula digestória, além de aumentar a sobrevivência de larvas quando desafiadas com *Vibrio parahaemolyticus*. Desta forma, as bactérias probióticas isoladas influenciaram positivamente tanto com relação aos parâmetros imunológicos nas ostras adultas como na sobrevivência das larvas D.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abdhul, K., Ganesh, M., Shanmughapriya, S., Kanagavel, M., Anbarasu, K., Natarajaseenivasan, K., 2014. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. International journal of biological macromolecules, 70, 450-454.
- Avendaño, R. E; Riquelme, C. E., 1999. Establishments o mixidculture probiotics and microalgae as food for bivalve larval. Aquacult. Res., 30, p. 893-900.
- Bem, M. M. 1999. Efeitos da adição de antibióticos no cultivo de larvas de *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA: PECTINIDAE). Dissertação de Mestrado, (Mestrado em

Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velázquez, J., 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*, 39, 356-364.
- Condon, S., 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *Microbiol Lett* 46, 269-280.
- Dawood, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., & Yokoyama, S., 2016. Immune responses and stress resistance in red sea bream, *Pagrus major*, after oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and vitamin C. *Fish & Shellfish Immunology*. 54, 266-275.
- Delgado, S., Mayo, B., 2004 Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 90, 309-319.
- Douillet P., Langdon C.J., 1993. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae *Biol. Bull.*, 184, 36-51
- Douillet P.A., Langdon C.J., 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) *Aquaculture*, 119, 25-40.
- Elston, R. A. 1990. Mollusc diseases: Guide for the shellfish farmer. University of Washington, Seattle.
- Fitt, W., Heslinga, G. Watson, T., 1992. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (*F. tridacnidae*). *Aquaculture*, 104, 1-10.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.

- Gibson, L.F., Woodworth, J., George, A.M., 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*. 169, 111–120
- Gomes, C.H.A.M., Silva, F.C., Lopes, G.R. Melo, C.M.R., 2014. The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar* Braz. *J. Biol.*, 74, 967-976.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014. Produção da pecuária municipal [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2014\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf) (Acesso: em 15.02.16).
- Jatobá, A., Vieira, F.D., Neto, C.B., Silva, B.C., Mourino, J.L.P., Jeronimo, G.T., Dotta, G. e Martins, M.L., 2008. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesq Agropec Bras.* 43, 1201-1207.
- Jiang, H. F., Liu, X. L., Chang, Y. Q., Liu, M. T., & Wang, G. X., 2013. Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish & shellfish immunology*. 35, 86-91.
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.L., Robert, R., 2012. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344-349, 29-34.
- Leyton, Y., Riquelme, C., 2010. Marine *Bacillus* spp. Associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (common name “loco”) have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial ecology*. 60, 599-605.
- Li, H.P., Yeager, C.M., Brinkmeyer, R., Zhang, S., Ho, Y.F., Xu, C., Jones, W.L., Schwehr, K.A., Otsaka, S., Roberts, K.A., Kaplan, D.I. e Santschi, P.H., 2012. Bacterial production of organic acids enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent iodide oxidation. *Environ Sci Technol* 46, 4837-4844.
- Lodeiros C., Freitas L., Fernández E., Vélez A., Bastardo J., 1989. Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de larvas de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio*

- anguillarum* Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente, 28 165–169.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Corre, S., Nicolas, J.L., Guyot, M., 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mar. Biotechnol. 6, 633–641.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J., 1997. Brock biology of microorganisms. Prentice-hall, Madri.
- Mangoni, J., dos Santos Pozza, M.S., Sabedot, M.A., Pozza, P.C., de Almeida, S. e Heinzen, E.L., 2011. Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína. Acta Sci. Anim. Sci. 33, 267-272.
- Nakamura A., Takahashi K.G., K. 1999, Mori Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae, Fish Pathol., 34 p. 139-144.
- Nascimento, I. A., 1983. Cultivo de ostras no Brasil: Problemas e perspectivas. Ciência e Cultura, 35, 871-876.
- Nascimento, I. A., 1991. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliana* (Lamarck) in Shouth and Central America. In: MENZEL, W. Estuarine and marine bivalve mollusk culture. Boston, USA, CRC Press., 125-134.
- Poffo, F. e Silva, M., 2011. Taxonomic and physiological characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. Ciênc Tecnol Aliment. 31, 303-307.
- Prado, S., 2006. Microbiota asociada a criaderos de moluscos: patogénesis and probiosis. Ph.D. Thesis. University of Santiago de Compostela, Spain.
- Ramos, C. de O., 2011. Ciclo gonádico da ostra nativa *Crassostrea gasar* em laboratório. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós Graduação em Aquicultura- Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Ramiréz C., Ciffoni B.G.A., Pancheniak E.M.G., Soccol E.F.R.C., 2006. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiotic Aliment Latinoam., 264, 70–77.

- Riquelme C.E., Jorquera M.A., Rosas A.I., Avendaño R.E., Reyes N., 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819) Aquaculture, 192, 111-119.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., guaita, M., Candia, M., 1997. Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallo *Apargo-pecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquaculture 154, 17-26.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., Ishida, Y., 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. J. Shell-fish Res. 15, 369-374.
- Ruiz-Ponte C., Samain J.F., Sánchez J.L., Nicolas J.L., 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of the scallop larvae Mar. Biotechnol., 1, 52-59
- Schleder, D. D., Kayser, M., Sühnel, S., Ferreira, J. F., Rupp, G. S., Barracco, M. A., 2008. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. Aquaculture. 280, 256-263.
- Söderhäll, K.; Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology, 10, 23-28.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev. 64, 655-671.
- Vieira, F.D., Jatoba, A., Mourino, J.L.P., Vieira, E.A., Soares, M., da Silva, B.C., Seiffert, W.Q., Martins, M.L. e Vinatea, L.A., 2013. *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. Pesqui Agropecu Bras. 48, 998-1004.
- Vieira, Felipe do Nascimento, 2006. Avaliação do tempo de permanência de *Lactobacillus* B6 no trato intestinal de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) e sua relação com a resposta imunológica. Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Vine, N.G., Leukes, W.D. e Kaiser, H., 2004. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *Fems Microbiol Lett*, 231. 145-152.

## 7.REFERÊNCIA DA INTRODUÇÃO GERAL

AVENDAÑO, R. E. & RIQUELME, C. E.. Establishments o mixiculture probiotics and microalgae as food for bivalve larval. **Aquaculture**. v. 30, p. 893-900, 1999.

BARRACCO, A.M., DA SILVA, P.M., Hemolinfa e sistema imune. In: RESGALLA JR., WEBER, L.I., Conceição, M.B. (Eds.). O mexilhão *Perna perna* (L.): **Biologia, ecologia e aplicações**. Interciência, Rio de Janeiro, p. 97-114. 2008.

BEM, M. M. 1999. Efeitos da adição de antibióticos no cultivo de larvas de *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758) (BIVALVIA: PECTINIDAE). Dissertação de Mestrado, (Mestrado em Aqüicultura) - Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A. R. M.; SABRY, R. C.; CEUTA, L. O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Patologia e sanidade de organismos Aquáticos**. 1 ed. Maringá: Massoni, Cap. 8. p.165-193. 2012.

CERENIUS, L. & SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 116-126, 2004.

CERENIUS, L.; KAWABATA S.; LEE, B. L.; NONAKA, M., SÖDERHÄLL, K. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 10, p. 575-583, 2010.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.

COVA, ALIANE WATANABE. Parasitos na ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) cultivada no estuário do Rio Graciosa em Taperoá, Bahia." Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Ciência Animal, **Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**, Cruz das Almas, 2013.

DA SILVA, P. M. Diagnóstico de doenças de Moluscos Marinhos: uma prática para o bom desenvolvimento da maricultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 18. n. 107. p. 22-27, 2008.

DAME, R. F. **Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach**. New York: CRC Press, 253p. 1996

DI SALVO, L.H.; BLECKA, J.; ZEBAL, R. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. **Appl Environ Microbiol.** v. 35 p.219-221, 1978.

DORE, I. **Shellfish: a guide to oyster, mussel, scallops, clams and similar products for the comercial user**. New York: Van Nostrand Reinhold. 240 p. 1991.

ELSTON, R. A. **Mollusc diseases: Guide for the shellfish farmer**. University of Washington, Seattle, 73p. 1990.

ELSTON, R. Virus-like particles associated with lesions in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 33, p. 71-74, 1979.

ELSTON, R.A. & WILKINSON, M.T. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). **Aquaculture**. v. 48, p.189-210, 1985.

ENGELMANN, P.; COOPER, E. L.; NÉMETH, P. Anticipating innate immunity without a Toll. **Mol.Immunol.**, v. 42, p. 931-942, 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). Seção Fisheries and Aquaculture Department. **Roma SOFIA. 2016**. Disponível em: [http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb\\_ds=Aquaculture&tb\\_mode=TABLE&tb\\_act=SELECT&tb\\_grp=COUNTY](http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTY). Acesso em: 16/01/2016

FITT, W.; HESLINGA, G.; WATSON, T. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (*F. tridacnidae*). **Aquaculture**, v. 104, p. 1-10, 1992.

GIBSON, L.F.; WOODWORTH, J.; GEORGE, A.M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, when

chal-lenged with *Vibrio tubiashii*. **Aquaculture**. v. 169, p. 111–120, 1998.

JOHANSSON, M.W. & K. SÖDERHÄLL. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Parasitol**. v. 5. p. 171-176. 1989.

JORQUERA, M.A.; RIQUELME, C.E.; LOYOLA, L.A.; MUÑOZ, L.F. Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. **Aquaculture**. v. 7, p. 433–438. 1999.

KINNE, O. **Diseases of marine animals**. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. p. 467-475. 1983.

LAMBERT C.; NICOLAS J.L.; CILIA V.; CORRE S. *Vibrio pectenida* sp. a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. **Internacional Jornal Syst Bacteriol**. v.48 p. 481-487. 1998.

LERCH, K. Protein and active site structure of tyrosinase. IN: J. T. Bagnara, A. R. Liss (ed.). **Advances in Pigment Cell Research**, New York. p. 85-98. 1988.

LODEIROS, C.J.S. Analisis cuantitativo y cualitativo de la flora bacteriana en "hatchery" de *Ostrea edulis* y su posible relacion com la patogenidad a nivel larvario. **Acta Científica Venezolana** v. 39, p. 249-256, 1988.

LONGEON, A., PEDUZZI, J., BARTHÉLEMY, M., CORRE, S., NICOLAS, J.L., GUYOT, M., Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. **Mar. Biotechnol**. v. 6, p. 633–641. 2004.

LÜCKSTÄDTS, C. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. In: MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Madri. Prentce-hall , 1997.

MARQUES, M. R. F., & BARRACCO, M. A.. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v.191, p.23-44, 2000.

MUTA, T. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1 → 3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern. **Curr. Pharm. Des.**, v. 32, p. 4155-4161, 2006.

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

NAPPI, A.J. & J. SEYMUR. Hemolymph phenoloxidase in *Drosophila melanogaster*, *Locusta migratoria* and *Austropotamobius pallipes*. **Biochem. Biophys. Res. Commu.** v. 180 p. 748-754. 1991.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliensis* (Lamarck) in Shouth and Central America. In: MENZEL, W. (Ed.) **Estuarine and marine bivalve mollusk culture**. Boston, USA, CRC. p. 125-134. 1991.

NASCIMENTO, I. A. Cultivo de ostras no Brasil: Problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 7, p. 871-876, 1983.

NICOLAS, J.L., COMPS, M. & COCHENNEC, N. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. **Bulletin European Association of Fish Pathologists** v.12, p.11-13, 1992.

OCEANOS, C. N.. O Brasil e o Mar no Século XXI - Relatório aos Tomadores de Decisão do País. Rio de Janeiro: Comissão Nacional Independente sobre os Oceanos, 2008.

POLI, C. R. Cultivo de ostras do Pacífico. In: POLI, C.R. *et al.* (Org.). **Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, p. 251-266, 2004.

PRADO S, ROMALDE JL, MONTES J, BARJA JL. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. **Dis Aquat Org.** v. 67 p. 209-215. 2005.

PRADO S.; MONTES J.; ROMALDE J.L.; BARJA J.L. Marine activity of Phaeobacter strains against aquaculture pathogenic bacteria. *Int. Microbiol.*, 12 p. 107-114, 2009.

PRADO S.; TORANZO A.E.; BARJA J.L. Protocol of use of a marine probiotic strain in aquaculture 4th Symposium on Aquatic Animal Health, New Orleans, LA, USA , 2002.

PRADO SUSANA. Microbiota asociada a criaderos de moluscos: patogénesis y probiosis. Tese (Doutorado). **Universidad de Santiago de Compostela**, Espanha, 2006.

PRADO, S. ; ROMALDE, J. L.; BARJA, J. L. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. **Veterinary microbiology**, v. 145, n. 3, p. 187-197, 2010.

RAMOS, CASSIO DE OLIVEIRA. Ciclo gonádico da ostra nativa *Crassostrea gasar* em laboratório. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós Graduação em Aquicultura- Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

RIQUELME C.; HAYASHIDA G.; ARAYA R.; UCHIDA A.; SATOMI M.; ISHIDA Y. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. **Shellfish Res.**, v.15, p. 369–374, 1996.

SCHLEDER, DELANO DIAS, Parâmetros hemato-imunológicos na vieira *Nodipecten nodosus* em diferentes etapas do ciclo reprodutivo e submetida a uma dieta rica em carotenóides. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós Graduação em Aquicultura- Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SÖDERHÄLL, K. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. **Bull. Zool.** v.59 p.141-151, 1992.

SÖDERHÄLL, K. Prophenoloxidase activating system and melanization-A recognition mechanism of arthropods, **A review. Dev. Comp. Immunol.** v. 6, p. 601-611, 1982.

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

SONG L.; WANG L.; QIU L.; ZHANG H. Invertebrate immunity. In: SÖDERHÄL K. **Invertebrate Immunity**. Springer Science Business Media, Austin, p 44–65, 2010.

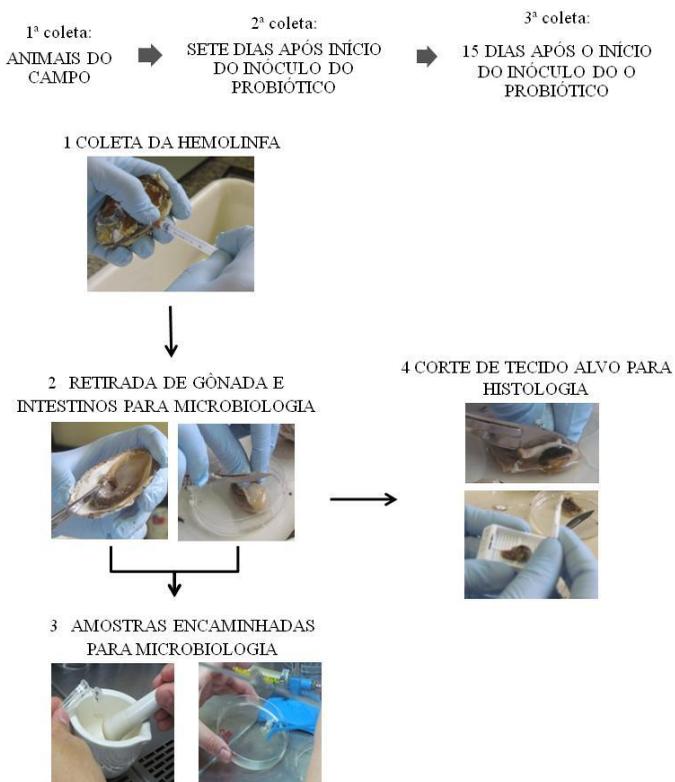
VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica**: ciencia y acuicultura. La Paz: Limusa, p.127-140. 2001.

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, 2000.

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, 2000.

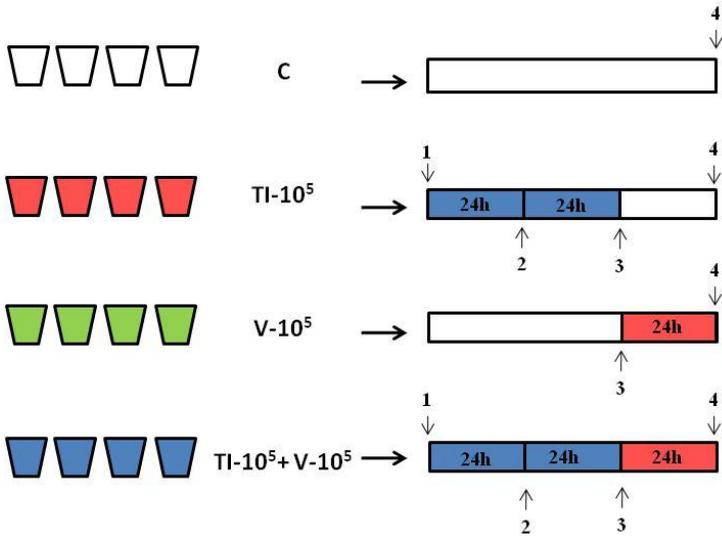
## APÊNDICE A

Fluxograma do procedimento de amostragem e coleta de material biológico para coleta de hemolinfa, gônadas e intestinos para análises microbiológicas e cortes de órgãos utilizados na histologia, da *Crassostrea gasar* tratada com bactérias probióticas.



## APÊNDICE B

Esquema ilustrativo do delineamento experimental. Número 1 representa o início do experimento, onde ocorreu a primeira adição do inóculo da cepa potencialmente probiótica (TI-10<sup>5</sup>). Número 2 segunda adição do inóculo (TI-10<sup>5</sup>). Número 3 desafio com *Vibrio parahaemolyticus* (V-10<sup>5</sup>). Número 4 contagem de larvas “D” sobreviventes após o desafio com V-10<sup>5</sup>.



## ANEXO 1

Resulta da identificação molecular da bactéria *Enterococcus faecium*.



BPI Biotecnologia  
Divisão Micro-organismos- Laboratório Central

### Resultados de teste baseados em sequenciamento Sanger

#### Identificação de micro-organismos-MicroID

Amostra: TG 10.  
Cliente: BioCamp Laboratorios Ltda.  
Contato: Mara B. N. Soares.  
Laudo: MC015/2016.

Código interno: MI-015/16.  
Data de recebimento: 31/03/2016.  
Data do relatório: 20/04/2016.

#### Resultado

O micro-organismo sequenciado apresenta 99% de identidade com a bactéria da espécie *Enterococcus faecium* (nº acesso NR.102790.1).

#### Interpretação

A sequência do micro-organismo obtida foi comparada com um banco de dados de DNA. O resultado dessa comparação demonstrou maior identidade da amostra com a bactéria da espécie *Enterococcus faecium*.

#### Metodologia

Sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank.

#### Considerações

Apesar da região genômica utilizada para identificação entre as espécies ser padrão internacional para essa análise, não se deve descartar a identificação de mais de uma espécie por amostra devido a semelhança entre os DNAs das espécies encontradas.

#### Referências

- 1) Lozupone CA et al, 2011.

## ANEXO 2

Resulta da identificação molecular da bactéria *Enterococcus durans*.



BPI Biotecnologia  
Divisão Micro-organismos- Laboratório Central

### Resultados de teste baseados em sequenciamento Sanger

#### Identificação de micro-organismos-MicroID

Amostra: T 18.  
Cliente: BioCamp Laboratórios Ltda.  
Contato: Mara B. N. Soares.  
Laudo: MC017/2016.

Código interno: MI-017/16.  
Data de recebimento: 31/03/2016.  
Data do relatório: 20/04/2016.

#### Resultado

O micro-organismo sequenciado apresenta 100% de identidade com a bactéria da espécie *Enterococcus durans* (nº acesso NR\_036922.1).

#### Interpretação

A sequência do micro-organismo obtida foi comparada com um banco de dados de DNA. O resultado dessa comparação demonstrou maior identidade da amostra com a bactéria da espécie *Enterococcus durans*.

#### Metodologia

Sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank.

#### Considerações

Apesar da região genômica utilizada para identificação entre as espécies ser padrão internacional para essa análise<sup>1</sup>, não se deve descartar a identificação de mais de uma espécie por amostra devido a semelhança entre os DNAs das espécies encontradas.

#### Referências

1) Lozupone CA et al, 2011.