



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**Influência do sistema de cultivo no desempenho zootécnico e resposta à  
infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca em pós-larvas de  
camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

**Flávia Abreu Everton**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Recursos  
Pesqueiros e Aquicultura da  
Universidade Federal Rural de  
Pernambuco como exigência para  
obtenção do título de Mestre.

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Suzianny Maria Bezerra Cabral da  
Silva**

Orientadora

**Prof. Dr. Luis Otavio Brito da Silva**

Coorientador

**Recife,  
Fevereiro/2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

E93i

Everton, Flávia Abreu

Influência do sistema de cultivo no desempenho zootécnico e resposta à infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca em pós-larvas de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) / Flávia Abreu Everton. - 2020.  
56 f. : il.

Orientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.

Coorientador: Luis Otavio Brito da Silva.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2020.

1. Bioflocos. 2. RAC. 3. Camarão Branco. 4. WSSV. I. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da, orient. II. Silva, Luis Otavio Brito da, coorient. III. Título

CDD 639.3

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**Influência do sistema de berçário no desempenho zootécnico e resposta à  
infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca em pós-larvas de  
camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

**Flávia Abreu Everton**

Dissertação julgada adequada para  
obtenção do título de Mestre em  
Recursos Pesqueiros e Aquicultura.  
Defendida e aprovada em 19/02/2020  
pela seguinte Banca Examinadora.

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva**

Orientadora

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Ferreira dos Santos**

Membro Externo

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Moura Coimbra**

Membro Interno

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais: Argemiro (*in memoriam*) e Joana, pelo amor e dedicação despendidos.

A minha irmã, Fernanda, pelo apoio e carinho.

## **Agradecimentos**

A Deus, por me permitir mais esta conquista.

À minha família, pelo apoio, força e incentivo para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante a pós-graduação.

À Professora Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, pela orientação, paciência, dedicação, ensinamentos e amizade.

Ao Professor Dr. Luis Otavio Brito da Silva, pela coorientação e aprendizados necessários para a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Fernando Leandro dos Santos, pela contribuição nas análises histológicas e esclarecimento de dúvidas relacionadas ao tema.

À Professora Dra. Maria Raquel Moura Coimbra, por ceder o espaço e os equipamentos do Laboratório de Genética Aplicada sempre que necessário e, a Renata Farias, pela amizade e ajuda com as análises moleculares.

À equipe e amigos do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento deste estudo, em especial: Allyne Elins da Silva, Gisely Costa, Julio Neves, Katharine Souza e Paloma Alves, a vocês, meu muito obrigada!

Aos professores, que contribuíram para a minha formação durante esse período, e aos funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e/ou se fizeram presentes durante este período importante da minha vida.

## Resumo

A aquicultura atualmente é um dos principais meios de obtenção de alimentos de origem aquática no mundo e sua produção global corresponde a 47% da produção mundial de organismos aquáticos, o equivale a mais de 80 milhões de toneladas. Dos grupos produzidos, destaca-se a produção de crustáceos que, em 2016, foi de 7,9 milhões de toneladas, com o *Litopenaeus vannamei*, sendo responsável por 65,3% deste total. Porém, essa produção vem sendo constantemente ameaçada por surtos de doenças, fazendo-se necessária uma abordagem produtiva que aplique medidas de biossegurança, nutrição adequada, promoção da imunidade dos animais cultivados e manutenção da boa qualidade de água, para mantimento da homeostase, o que traduz-se no sistema de bioflocos (BFT). Entretanto, embora *L. vannamei* mantidos nesse sistema alcancem melhores índices zootécnicos quando comparados a sistemas tradicionais, pouco se sabe sobre a influência da transferência de animais para os diferentes sistemas de cultivo, durante a fase de berçário, no desempenho zootécnico e resistência imunológica ao Vírus da Síndrome da Mancha Branca-WSSV. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da exposição e alteração do sistema de cultivo sob o desempenho zootécnico e resistência imunológica ao WSSV de *Litopenaeus vannamei*, durante a fase de berçário. Foram avaliados dois sistemas, Bioflocos – BFT e Recirculação de Água Clara – RAC, em três etapas: a primeira etapa, onde as pós-larvas de 10 dias (Pl<sub>10</sub>'s - 290PL/g), foram mantidas por um período de 10 dias nos respectivos sistemas; segunda etapa, com duração de 30 dias, que consistiu na redistribuição das Pl<sub>20</sub>'s para ambos os sistemas, obtendo-se assim quatro tratamentos (BFT-BFT, BFT-RAC, RAC-BFT e RAC-RAC) e; a terceira etapa, correspondente ao desafio viral. Foram avaliadas variáveis de desempenho zootécnico; contagens total e diferencial de hemócitos; determinação de taxa de infecção e lesões sugestivas de WSSV via nested-PCR e histologia, respectivamente e; contagem presuntiva de *Vibrio* sp. O sistema BFT quanto ao desempenho zootécnico, de um modo geral, mostrou-se eficiente, especialmente nas primeiras fases de vida do animal. com melhores resultados quando comparado ao RAC. Os resultados da contagem presuntiva de *Vibrio* sp. demonstraram crescimento nos tratamentos oriundos ou mantidos em BFT. No que se refere à resposta imunológica e a influência dos sistemas, os parâmetros hemato-imunológicos não foram influenciados, porém observou-se que em um cenário de infecção por WSSV, houve interferência na resposta imune do animal, resultando na diminuição da quantidade de células imunocompetentes. Além disso, entre os tratamentos, houve diferença na forma de manifestação da doença, como constatado através da análise histológica devido a maior concentração de lesões sugestivas registradas em animais oriundos ou mantidos em BFT. Entretanto, apesar das diferenças nas lesões encontradas, todos os animais desafiados foram positivos para WSSV via nested-PCR. Diante disso, concluiu-se que apesar do BFT ser considerado um ambiente biosseguro para os animais cultivados, por ser um sistema de troca mínima ou nula de água, em um cenário de infecção por WSSV, pode induzir a um estado de fadiga dos sistema de defesa dos animais cultivados decorrente da estimulação contínua do sistema imunológico devido aos microrganismos constantes nos flocos, podendo levar os animais a uma condição de maior vulnerabilidade. E embora não tenha sido avaliado um cenário de co-infecção por WSSV e *Vibrio* sp., a possibilidade de sua ocorrência resultaria na potencialização da infecção por WSSV, especialmente no sistema com BFT, considerando as altas concentrações vibriónicas contabilizadas.

**Palavras-chave:** Bioflocos, RAC, Camarão Branco, WSSV

## Abstract

Aquaculture is currently one of the main means of obtaining food of aquatic origin in the world and its global production corresponds to 47% of the world production of aquatic organisms, equivalent to more than 80 million tons. Of the groups produced, the production of crustaceans stood out, which in 2016 was 7.9 million tons, with the marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, accounting for 65.3% of this total. However, this production has been constantly threatened by disease outbreaks, requiring a productive approach that applies biosecurity measures, adequate nutrition, promoting the immunity of cultivated animals and maintaining good water quality, to maintain homeostasis, which translates into if in the biofloc system (BFT). However, although *L. vannamei* kept in this system has achieved better zootechnical rates when compared to traditional systems, little is known about the influence of the transfer of animals to different cultivation systems, during the nursery phase, on zootechnical performance and immune resistance to White Spot Syndrome Virus – WSSV. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the influence of *Litopenaeus vannamei* exposure, during the nursery phase, and the alteration of the culture system, on zootechnical performance and immunological resistance to WSSV. Two systems were evaluated, Biofloc - BFT and Clear Water Recirculation - CW, in three steps: the first step, where the 10-day post-larvae (PL<sub>10</sub>'s - 290PL/g), were maintained for a period of 10 days in the respective systems; second step, lasting 30 days, which consisted, at the end of the 1st stage, in the redistribution of the PL<sub>20</sub>'s for both systems, thus obtaining four treatments (BFT-BFT, BFT-CW, CW-BFT, and CW-CW) and the third step corresponding to the viral challenge. In these steps, it was determined: zootechnical performance variables; hematological variables (total and differential hemocyte counts); presumptive total count of *Vibrio* sp.; lesions suggestive of WSSV infection via histology and; infection and survival rate after viral challenge. The BFT system in terms of zootechnical performance, in general, proved to be efficient, especially in the early stages of the animal's life, with better results when compared to RAC. The results of the presumptive count of *Vibrio* sp. demonstrated growth in treatments originating from or maintained in BFT. Concerning the immune response and the influence of systems, hemato-immunological parameters were not influenced, however, it was observed that in a scenario of infection by WSSV, there was interference in the animal's immune response, resulting in a decrease in the amount of immunocompetent cells. Also, between treatments, there was a difference in the form of manifestation of the disease, as evidenced by histological analysis due to the higher concentration of suggestive lesions recorded in animals originating or maintained in BFT. However, despite the differences in the lesions found, all challenged animals were positive for WSSV via nested-PCR. Therefore, it was concluded that although BFT is considered a biosafety environment for cultivated animals, as it is a minimal or no water exchange system, in a WSSV infection scenario, it can induce a state of fatigue in the defense systems of cultivated animals due to the continuous stimulation of the immune system due to the microorganisms contained in the flakes, which may lead the animals to a condition of greater vulnerability. And although a scenario of co-infection with WSSV and *Vibrio* sp has not been evaluated, the possibility of its occurrence would result in the potentiation of the WSSV infection, especially in the system with BFT, considering the high vibrionaceas concentrations accounted for.

**Key words:** Biofloc, RAS, White Shrimp, WSSV

## Lista de figuras

	Página
Figura 1. Cortes histológicos de <i>L. vannamei</i> , de aproximadamente 1g, coloração H.E. 400x. (A) Controle negativo, sem alteração aparente nas brânquias; (B) <i>L. vannamei</i> infectado com presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas nas brânquias; (C) Controle negativo, sem alterações aparentes no epitélio do estômago; (D) <i>L. vannamei</i> infectado, com presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas no epitélio do estômago, (E) Controle negativo, sem alterações aparentes, com órgão linfóide estruturado e; (F) <i>L. vannamei</i> infectado, com desorganização do órgão linfóide e presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas.	29
Figura 2. Cortes histológicos de tecidos subcuticulares de <i>L. vannamei</i> infectado por WSSV, de aproximadamente 1 g nos diferentes tratamentos analisados, Coloração H.E. 400x. (A) BFT-BFT: Aglomerado de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas em tecido subcuticular e expansão de cromatóforos; (B) AC-BFT: Presença de núcleos hipertóficos com inclusões centrais basofílicas bem dilatados (C) BFT-AC: Presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas, menores e menos intensos (D) AC-AC. Presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas de tamanhos variados e menos intensos.	30



## Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Sequências de iniciadores usados para a amplificação do WSSV.	23
Tabela 2. Variáveis de desempenho zootécnico de <i>L. vannamei</i> , nos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC), para cada etapa do experimento.	25
Tabela 3. Contagem bacteriana total em TCBS dos animais e da água coletados dos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC) ao longo do período experimental.	26
Tabela 4. Contagem total e diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC), pré e pós-desafio experimental.	28
Tabela 5. Mortalidade cumulativa nos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC) desafiados via ingestão com WSSV.	31

## Sumário

	Página
Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	9
1- Introdução	11
2- Artigo Científico	15
3- Considerações finais	42
4- Referências	43

## 1- Introdução

A aquicultura atualmente é um dos principais meios de obtenção de alimentos de origem aquática no mundo e sua produção global corresponde a 47% da produção mundial de organismos aquáticos, o equivalente a mais de 80 milhões de toneladas (FAO, 2018). Além disso, em contraste com a maioria dos sistemas de produção de alimentos agrícolas terrestres, mais de 95% da produção mundial de aquicultura é realizada em países em desenvolvimento, com um aumento da produção nesses países a uma taxa média anual de 6,13% ao ano (TACON, 2019). Avaliada em mais de US\$ 250 bilhões de dólares, a produção aquícola representa um grupo muito diversificado de diferentes espécies de plantas e animais aquáticos, atingindo em 2016, 598 espécies relatadas (FAO, 2018; TACON, 2019).

Desses grupos produzidos, se destaca a produção de crustáceos que em 2016 foi de 7,9 milhões de toneladas, ficando em 3º lugar no ranking da produção aquícola, com um aumento médio anual de 10,76% ao ano desde 2010, com 64 espécies diferentes, avaliadas em US\$ 57,1 bilhões de dólares (FAO, 2018; TACON, 2019).

Entre essas espécies, atualmente, o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, é o que domina a produção na carcinicultura mundial com 5,51 milhões de toneladas, o equivalente a 65,3% do total dos crustáceos cultivados, avaliados em US\$ 34,2 bilhões de dólares (FAO, 2018; TACON, 2019). No Brasil, a carcinicultura é caracterizada como uma das principais atividades aquícolas, sendo este, o segundo maior produtor de camarão cultivado das Américas (FAO, 2018). No país, há aproximadamente 2.500 fazendas dedicadas ao cultivo de camarão e, dessas empresas, 74%, possuem até 10 ha, sendo, portanto, classificadas como de pequeno porte, enquanto 23% são de médio porte (entre 10 e 50 ha) e 3%, de grande porte, com área total superior a 50 ha (ARAÚJO, 2015; ROCHA, 2015). Estas, em sua maioria, adotam regimes de produção intensivos e semi-intensivos, com uma produtividade média de 3.500 kg/ha (ROCHA, 2015; VICENTE et al., 2016).

Entretanto, os surtos de doenças têm sido a principal causa das perdas de produção nas últimas duas décadas, principalmente, doenças virais como a proveniente do Vírus da Síndrome da Mancha Branca-WSSV, sendo este, um fator limitante para o setor da carcinicultura (THITAMADEE et al., 2016).

O WSSV está presente na carcinicultura brasileira desde 2004, no entanto, o

primeiro registro oficial de sua ocorrência data de 2005, quando foi diagnosticado e notificado a OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) pela primeira vez, em fazendas do sul do país, no estado de Santa Catarina (SEIFFERT et. al., 2005). Nos anos de 2008 a 2011, fazendas localizadas na Bahia e Pernambuco, apresentaram resultados de sobrevivência muito abaixo (5%) do esperado em viveiros comerciais, decorrente de surtos de Mancha Branca (MULLER et al., 2010; GUERRELHAS e TEIXEIRA, 2012). Em 2014, fazendas localizadas na fronteira entre o estado da Paraíba e o sul do Rio Grande do Norte passaram a reportar altos índices de mortalidades também em decorrência da Mancha Branca (NUNES e FEIJÓ, 2016).

Segundo informações da Associação Brasileira de Criadores de Camarão-ABCC, entre 2015 e 2016, novos surtos da doença ocorreram no oeste do estado do Rio Grande do Norte, na bacia hidrográfica do rio Assú, abrangendo os municípios de Macau, Pendências, Alto do Rodrigues e Carnaubais e, na bacia hidrográfica do rio Apodi, no município de Mossoró-RN, sendo também registrados surtos na bacia do rio Jaguaribe, em Aracati-CE. Estes novos surtos ocorridos entre 2015 e 2016 afetaram a produção de camarões no Brasil que, em 2016, foi de 52.119 toneladas, isto é, 25,39% inferior a 2015 (NEVES, 2018).

Dentre os sinais clínicos de infecção por WSSV em *L. vannamei*, destacam-se: rápida redução no consumo de alimentos, animais letárgicos, cutícula frágil e manchas brancas de aproximadamente 0,5 a 2,0 mm de diâmetro visíveis na parte dorsal do cefalotórax próximo ao rostro, resultado de depósitos anormais de sais de cálcio no epitélio cuticular de animal infectado. Os estoques que apresentam essas características tendem a resultar em altas taxas de mortalidade acumulada, atingindo até 100% entre 3 e 10 dias, após os primeiros sinais clínicos serem observados (PANTOJA e LIGHTNER, 2014).

Porém, os surtos de doenças, não resultam apenas da presença de um patógeno no sistema, mas também, do estado de saúde comprometido dos animais cultivados combinado às condições ambientais não favoráveis dos sistemas produtivos (DE SCHRYVER et al., 2012). Assim, uma alternativa aos sistemas tradicionais que tem se mostrado muito viável, é o sistema de biofoco (BFT) por se acreditar que, quando bem manejado, o mesmo possa promover às espécies cultivadas: nutrição adequada, promoção da imunidade dos animais cultivados e, manutenção de boa qualidade da água, para a homeostase (EKASARI et al., 2014).

Esse sistema foi proposto, inicialmente, como uma ferramenta para reduzir a

troca de água e minimizar a introdução de contaminantes e patógenos virais na água, baseando-se na manipulação de fontes de carbono e nitrogênio, buscando o equilíbrio das comunidades bacterianas (autotróficas e heterotróficas) dentro do sistema (AVNIMELECH, 2012). A composição dos bioflocos consiste, basicamente, em uma variedade de bactérias, fungos, microalgas, detritos entre outros microrganismos. Esses microrganismos não só removem o excesso de nutrientes, mas, também, têm sido aplicados na provisão nutricional para as espécies cultivadas, incluindo o camarão, podendo, assim, contribuir para o aumento do crescimento e sobrevivência dos animais cultivados (EMERENCIANO et al., 2012). Além disso, supõe-se que os microrganismos abundantemente presentes nos sistemas de bioflocos possam contribuir para aumentar a atividade imunológica do camarão, devido a presença de componentes celulares ou de metabólitos que possam atuar como imunostimulantes (EMERENCIANO et al., 2013; KIM et al., 2014).

Ainda sobre os benefícios do BFT na atividade imunológica do camarão, Xu e Pan (2013) relatam que a contagem total de hemócitos e a atividade fagocítica dos hemócitos de *L. vannamei* nas unidades de cultivo contendo bioflocos foram significativamente mais altas do que as dos camarões no grupo controle cultivado em água clara. Além disso, estes mesmos autores também observaram que o camarão cultivado em um ambiente com biofloco possuía uma maior capacidade antioxidante total, tanto no plasma quanto no hepatopâncreas.

Em termos de aplicação do BFT durante a fase de berçário de *L. vannamei*, etapa intermediária entre as fases de larvicultura e engorda para que se atinja o peso médio de 1g, quando comparado ao sistema tradicional (água clara), além dos benefícios citados acima, possibilita: a otimização das áreas produtivas, uma vez que esse sistema permite a utilização de altas densidades de estocagem e; a oferta de uma fonte alternativa de nutrientes para os camarões devido aos flocos, refletindo em uma redução no fator de conversão alimentar (BALLESTER et al., 2010; FÓES et al., 2011; WASIELESKY et al., 2013).

Apesar dos resultados positivos com *L. vannamei* mantidos nesse sistema, pouco se sabe sobre a influência da alteração do sistema de cultivo, durante a fase de berçário, no desempenho zootécnico e resistência imunológica ao Vírus da Síndrome da Mancha Branca-WSSV.

## 1.2- Objetivos do trabalho

### *Geral:*

Avaliar a influência da exposição e alteração do sistema de cultivo sob o desempenho zootécnico e a resistência imunológica ao Vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV de *Litopenaeus vannamei*, durante a fase de berçário.

### *Específicos:*

- Analisar o desempenho zootécnico dos camarões cultivados em sistema de bioflocos e de água clara, pré e pós-desafio com WSSV;
- Determinar os parâmetros hemato-imunológicos dos camarões cultivados em sistema de bioflocos e água clara, pré e pós-desafio com WSSV;
- Determinar a contagem presuntiva total de *Vibrio sp.* na água e no hepatopâncreas dos animais em ambos os sistemas avaliados;
- Avaliar a presença de lesões sugestivas de infecção por WSSV via histologia de animais desafiados;
- Determinar a porcentagem dos camarões experimentalmente desafiados e infectados com WSSV cultivados em sistema de bioflocos e em água clara.

## 2- Artigo científico

Os resultados obtidos durante o trabalho experimental desta dissertação estão apresentados no artigo intitulado “**Influência do sistema de cultivo no desempenho zootécnico e resposta à infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca no camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**”.

Artigo científico a ser encaminhado a Revista - Aquaculture.  
Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (<https://www.journals.elsevier.com/aquaculture>)

**Influência do sistema de cultivo no desempenho zootécnico e resposta à infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca no camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) na fase de berçário**

**Resumo**

Os surtos de doenças, particularmente os causados pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca-WSSV, ainda são uma das principais dificuldades enfrentadas pelo desenvolvimento da indústria da carcinicultura e, frequentemente, resultam em graves perdas econômicas. Dentre as estratégias que podem auxiliar na mitigação dos impactos dessa doença está a utilização da tecnologia de bioflocos-BFT. Entretanto, apesar dos resultados positivos com *L. vannamei* mantidos nesse sistema, pouco se sabe sobre o efeito da transferência de animais para os diferentes sistemas de cultivo, durante a fase de berçário, no desempenho zootécnico e resistência ao WSSV. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da exposição e a alteração do sistema de cultivo sob o desempenho zootécnico e resistência imunológica ao WSSV de *Litopenaeus vannamei*, durante a fase de berçário. Foram avaliados dois sistemas, Bioflocos – BFT e Recirculação de Água Clara – RAC, em três etapas: a primeira etapa, onde as pós-larvas de 10 dias (Pl<sub>10</sub>'s - 290Pl/g), foram mantidas por um período de 10 dias nos respectivos sistemas; segunda etapa, com duração de 30 dias, que consistiu na redistribuição das Pl<sub>20</sub>'s, ao final da 1ª etapa, para ambos os sistemas, obtendo-se assim quatro tratamentos (BFT-BFT, BFT-RAC, RAC-BFT e RAC-RAC) e; a terceira etapa, correspondente ao desafio viral (8 dias). Foram avaliadas variáveis de desempenho zootécnico (ganho de biomassa, taxa de crescimento específico, peso médio final, sobrevivência e fator de conversão de alimentar); contagens total e diferencial de hemócitos; determinação de taxa de infecção e lesões sugestivas de WSSV via nested-PCR e histologia, respectivamente e; contagem presuntiva de *Vibrio sp.* O sistema BFT quanto ao desempenho zootécnico, de um modo geral, mostrou-se eficiente, especialmente nas primeiras fases de vida do animal, com melhores resultados quando comparado ao RAC. Os resultados da contagem presuntiva total de *Vibrio sp.* demonstraram maiores concentrações nos tratamentos oriundos ou mantidos em BFT. No que se refere à resposta imunológica e a influência dos sistemas, os parâmetros hemato-imunológicos não foram influenciados, porém observou-se que em um cenário de infecção por WSSV, houve interferência na resposta imune do animal, resultando na diminuição da quantidade de células imunocompetentes. Além disso, entre os tratamentos, houve diferença na forma de manifestação da doença, como constatado através da análise histológica devido a maior concentração de lesões sugestivas registradas em animais oriundos ou mantidos em BFT. Entretanto, apesar das diferenças nas lesões encontradas, todos os animais desafiados foram positivos para WSSV via nested-PCR. Diante disso, concluiu-se que apesar do BFT ser considerado um ambiente biosseguro para os animais cultivados, por ser um sistema de troca mínima ou nula de água, em um cenário de infecção por WSSV, pode induzir a um estado de fadiga do sistema de defesa dos animais cultivados decorrente da estimulação contínua do sistema imunológico devido aos microrganismos constantes nos flocos, podendo levar os animais a uma condição de maior vulnerabilidade. E embora não tenha sido avaliado um cenário de co-infecção por WSSV e *Vibrio sp.*, a possibilidade de sua ocorrência resultaria na potencialização da infecção por WSSV, especialmente no sistema com BFT, considerando as altas concentrações vibriónicas contabilizadas.

**Palavras-chave:** BFT, RAC, WSSV, Nested-PCR



## 1. Introdução

Com a expansão da aquicultura para novas regiões e ambientes para atender à crescente demanda mundial por alimento, o risco de encontrar novos patógenos também aumenta, especialmente, quando nos referimos a produção de crustáceos (THITAMADEE et al., 2016). Logo, a presença de agentes patogênicos é uma grande preocupação na criação desses animais, especialmente, nos primeiros estágios de vida, quando os mesmos são altamente suscetíveis a doenças e a altas taxas de mortalidade (VADSTEIN et al., 2013).

Surtos de doenças, particularmente os causados pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV, ainda são uma das principais dificuldades enfrentadas pelo desenvolvimento da indústria da carcinicultura e, frequentemente, resultam em graves perdas econômicas (VERBRUGGEN et al., 2016). O WSSV é um dos patógenos mais virulentos que afetam os camarões, especialmente os do gênero *Penaeus* (FLEGEL e SRITUNYALUCKSANA, 2011) e caracteriza-se por ser um baculovírus com DNA de fita dupla (YAO et al., 2015) em que a taxa de mortalidade de camarões infectados pode atingir 100% entre 7 e 10 dias após a observação dos primeiros sinais clínicos (PANG et al., 2019).

Embora tenha sido feito um progresso considerável para caracterizar o WSSV, no referente ao estabelecimento de algumas das principais interações entre patógeno-hospedeiro, como a relação entre as proteínas do envelope viral e os receptores de células hospedeiras no início da infecção, o envolvimento de várias vias do sistema imunológico em resposta ao WSSV e os papéis de vários miRNAs na mitigação ou progressão da doença (VERBRUGGEN et al., 2016), ainda não existem produtos terapêuticos disponíveis para seu controle efetivo em campo.

Neste sentido, quando se pensa em prevenção e controle de doenças não se deve concentrar os esforços apenas na implementação de medidas de biossegurança, mas na realização de uma abordagem integral que envolva: a preocupação com a qualidade da água e das pós-larvas utilizadas; fornecimento de alimento de qualidade e nutrição adequada, de forma a contribuir para a promoção da imunidade dos animais e; a adoção de medidas preventivas que possibilitem a diminuição das vias de entrada de agentes patogênicos no sistema, sendo o bioflocos (BFT) uma alternativa viável aos sistemas tradicionais, por atender a estas premissas (MARTINS et al., 2010; YANONG, 2013; FERREIRA et al., 2015; MAGAÑA-GALLEGOS et al., 2018).

O princípio operacional básico desse sistema envolve estimulação do crescimento de bactérias visando a remoção de compostos nitrogenados, através de uma razão C:N

específica, por meio da adição de uma fonte de carbono orgânico (AVNIMELECH, 2012), como por exemplo, o melaço que já foi comprovado como uma fonte positiva por induzir a maior expressão de genes relacionados a resposta imune, estresse celular e reconhecimento de patógenos (XUE et al., 2019).

Assim, os benefícios em potencial da utilização do BFT incluem: a manutenção da qualidade de água; ambiente biosseguro, com redução da prevalência de agentes patogênicos devido à baixa ou nula troca de água e; melhora da resposta imune celular e antioxidante do camarão cultivado, provavelmente por ser um ambiente com microrganismos e compostos bioativos (XU e PAN, 2013; EKASARI et al., 2014; CARDONA et al., 2015; AHMAD et al., 2016; PANIGRAHI et al., 2018).

Durante a fase de berçário de *L. vannamei*, etapa intermediária entre as fases de larvicultura e engorda para que se atinja aproximadamente o peso médio de 1g (MOSS e MOSS, 2004), o BFT, quando comparado ao sistema tradicional (água clara), além dos benefícios citados acima, possibilita: a otimização das áreas produtivas, uma vez que esse sistema permite a utilização de altas densidades de estocagem e; a oferta de uma fonte alternativa de nutrientes para os camarões devido aos flocos, refletindo em uma redução no fator de conversão alimentar (BALLESTER et al., 2010; FÓES et al., 2011; WASIELESKY et al., 2013).

Entretanto, apesar dos resultados positivos com *L. vannamei* mantidos nesse sistema, pouco se sabe sobre o efeito da alteração do sistema de cultivo, durante a fase de berçário, no desempenho zootécnico e resistência ao WSSV. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da exposição e alteração do sistema de cultivo sob o desempenho zootécnico e resistência imunológica ao Vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV de *Litopenaeus vannamei*, durante a fase de berçário.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Condição Experimental**

Foram adquiridas pós-larvas de dez dias (PL<sub>10</sub>) de *L. vannamei* negativas por diagnóstico confirmatório para o Vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV, provenientes da Aquatec Industrial Pecuária Ltda, com sede no Rio Grande do Norte, Brasil. O experimento foi dividido em três etapas: a primeira etapa consistiu no cultivo das pós-larvas, com peso médio inicial de 290PL/g, em unidades com volume útil de 60 litros a uma densidade de 1.000 PL<sub>10</sub>/m<sup>3</sup> e com salinidade de 30 ppt, onde permaneceram por 10 dias, mantidos em duas condições distintas de cultivo experimental (dois tratamentos):

sistema de bioflocos (BFT) e sistema de recirculação de água clara (RAC), com quatro repetições cada. Na segunda etapa, as pós-larvas provenientes de cada condição citada anteriormente, ao final dos 10 dias (1ª etapa), foram redistribuídas em unidades com volume útil de 50 litros, a uma densidade de 300 PL<sub>20</sub>/m<sup>3</sup>, formando, assim, quatro tratamentos: (1) Pós-larvas provenientes de BFT e mantidas em BFT-BFT; (2) Pós-larvas provenientes de BFT, transferidas para BFT-RAC; (3) Pós-larvas provenientes de RAC e transferidas para RAC-BFT e; (4) Pós-larvas provenientes de RAC e mantidas em RAC-RAC; com três repetições cada, onde foram mantidas até alcançarem o peso médio de 1 g cada, perdurando 30 dias. E, por fim, a terceira etapa, que consistiu dos mesmos tratamentos da etapa anterior, porém com quatro repetições, com duração de 21 dias, os camarões foram desafiados experimentalmente com WSSV, totalizando, assim, 61 dias de experimento.

Os camarões foram alimentados com ração comercial (InVivo Nutrição e Saúde Animal LTDA) com 45% proteína bruta e 8% extrato etéreo. As quantidades foram ajustadas de acordo com a metodologia de Van Wyk (1999) e a frequência de fornecimento foi de quatro vezes ao dia (8, 11, 14 e 17 horas) durante todo o período experimental.

Durante o período experimental, a temperatura da água, a salinidade, o oxigênio dissolvido (OD) e o pH foram monitorados duas vezes por dia (8 e 16 horas) (multiparâmetro: AKSO modelo COMBO-5), enquanto que, os sólidos sedimentáveis foram determinados três vezes por semana (cone Imhoff) (AVNIMELECH, 2009). A alcalinidade, a amônia total e o nitrito foram aferidos três vezes por semana, através de kit colorimétrico comercial (Labcon Test). Todas as variáveis foram monitoradas e mantidas dentro dos limites ideais propostos por Samocha et al. (2017) para *L. vannamei*.

O fotoperíodo da sala experimental foi mantido com um regime de 14 h de luz e 10 h de escuro. Todas as caixas foram cobertas com tela plástica para contenção dos aerossóis, mantidas sob temperaturas de 32 °C (para as duas primeiras etapas) e de 28 °C (para o desafio viral - terceira etapa) e aeração constante e intensa.

## 2.2. Sistemas de Bioflocos (BFT) e Recirculação de Água Clara (RAC)

A água do mar (30 g L<sup>-1</sup>) utilizada no BFT e no RAC foi filtrada a 30µm e clorada a 20 ppm de cloro ativo, e posteriormente declorada, antes de seu uso nas unidades experimentais.

O bioflocos utilizado durante o período experimental foi preparado 40 dias antes da estocagem das pós-larvas, através da adição de uma fonte de carbono orgânico, o melão de

cana de açúcar a 30% de carbono e, de nitrogênio, através da utilização de ração comercial com 40% de proteína bruta, visando uma relação de carboidrato:nitrogênio (C:N) de 12:1. Durante o cultivo, a fonte de carbono foi adicionada uma vez ao dia e calculada com base nos trabalhos realizados por Samocha et al. (2007) e Avnimelech (2009). Para manter a alcalinidade acima de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  e pH próximo a 7,8 foi utilizado bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), duas vezes por semana.

Em ambos os sistemas, tanto o de água clara, quanto o de biofoco, foi implementado um sistema de recirculação. O sistema de recirculação de água clara foi o mesmo descrito por Silva et al. (2015), no qual foi instalado um filtro biológico previamente maturado com recirculação de 100 L/h da seguinte forma: na primeira etapa, a cada quatro repetições de um tratamento foi adicionado um filtro biológico e; na segunda etapa, a cada três repetições de um tratamento. Para a terceira etapa, ou seja, durante o período que compreendeu o desafio, não se utilizou o sistema de recirculação. Nos tratamentos com biofocos, não houve a inclusão de filtros biológicos, mas o sistema foi mantido também através de recirculação.

### 2.3. Desempenho Zootécnico dos Camarões

Semanalmente e ao final do experimento, para avaliação do desempenho zootécnico foi realizada a biometria e determinados: o ganho de biomassa ( $\text{GB} = \text{biomassa final} - \text{biomassa inicial}$ ), a taxa de crescimento específico ( $\text{TCE} = 100 \times (\text{Ln}_{\text{peso final}} - \text{Ln}_{\text{peso inicial}}) / \text{n}^\circ \text{ dias}$ ), o peso médio final ( $\text{PMF} = \text{biomassa final}(\text{g}) / \text{n}^\circ \text{ de indivíduos ao final do experimento}$ ), a sobrevivência ( $\text{Sob}\% = (\text{n}^\circ \text{ final de camarões} / \text{n}^\circ \text{ inicial de camarões}) \times 100$ ) e o fator de conversão de alimentar ( $\text{FCA} = \text{alimentação fornecida (peso da ração)} / \text{ganho de biomassa}$ ).

### 2.4. Análise Microbiológica

A contagem total presuntiva de *Vibrio sp.* em TCBS foi realizada para as amostras de água, a partir de 45 ml de água coletadas na superfície da água, com auxílio de um tubo falcon estéril e, de 50 mg de hepatopâncreas de camarão de cada unidade experimental. Estas amostras foram coletadas em quatro momentos: antes do início do experimento e ao término das etapas 1, 2 e 3. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da amostra foi diluída em 4,5 ml de solução peptonada alcalina estéril a 1% (pH 8,6).

Já para a contagem em camarão, inicialmente, um animal de cada unidade experimental, foi eutanasiado por corte no cordão nervoso e a superfície corporal externa

foi desinfetada através de imersão em etanol a 70% (15 segundos), em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) com 0,1% de tween-80 (15 minutos) e em água destilada esterilizada, por três vezes. Em seguida, foi pesado 50 mg de hepatopâncreas, sendo o tecido macerado e diluído em 4,5 mL de água peptonada.

Após a homogeneização e preparo prévio das amostras, de água e camarão descritos anteriormente, foram realizadas diluições seriais sucessivas de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ , as quais foram semeadas (100  $\mu$ L) em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) (KOBAYASHI et al., 1963), em triplicata. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL ou UFC/g), utilizando o contador de colônias.

## 2.5. Parâmetros Hemato-Imunológicos

A hemolinfa foi coletada para análise dos hemogramas, antes e após o desafio viral, seguindo o protocolo descrito por Guertler et al. (2013). Para tanto, a hemolinfa (100  $\mu$ L), foi coletada na hemocele, localizada na região ventral dos camarões sobreviventes, com o auxílio de uma seringa (1 mL) contendo solução anticoagulante de Alsever MAS (Solução de Alsever Modificada) (336 mmol L<sup>-1</sup> NaCl; 115 mmol L<sup>-1</sup> glicose; 27 mmol L<sup>-1</sup> citrato de sódio; 9 mmol L<sup>-1</sup> EDTA pH 7,2), na proporção de 1:2 (v:v). Uma alíquota da hemolinfa foi separada e armazenada em MAS a 4% de formaldeído (1:3).

### 2.5.1. Contagem total de hemócitos (CTH)

A determinação da contagem total de hemócitos (CTH) em câmara de Neubauer, foi de modo semelhante à realizada para glóbulos brancos, em triplicata (BEÇAK e PAULETE, 1976).

### 2.5.2. Contagem diferencial de hemócitos (CDH)

A contagem diferencial de hemócitos (CDH), foi efetuada de acordo com protocolo adaptado de Celi et al. (2013). Resumidamente, a hemolinfa foi depositada em uma lâmina e, depois de seca, a mesma foi fixada através da imersão em metanol absoluto por 6 minutos, seguido pela remoção do mesmo. Em seguida, a lâmina com material fixado foi corada com solução de Giemsa na diluição de 1:10 por 10 minutos, desidratada com etanol a 70% por 1 minuto e imersa em xilol por 6 minutos para, posteriormente, ser feita a contagem em microscopia, em triplicata.

## 2.6. Material Infeccioso

O material infeccioso utilizado no desafio viral foi preparado conforme descrito por Pérez et al. (2005). Foi realizada a coleta de camarões *L. vannamei* durante um surto de WSSV para a remoção e utilização de tecido do músculo abdominal, o qual teve a presença do WSSV confirmada por Nested-PCR (LO et al., 1996). Em seguida, o tecido foi cortado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de 1g. A carga viral do material infeccioso (tecido cortado) foi quantificada via PCR em tempo real ( $4,3 \times 10^7$  cópias do WSSV/ $\mu\text{l}$  de DNA), segundo metodologia descrita por Durand e Lightner (2002).

## 2.7. Desafio Viral com WSSV

O desafio viral foi realizado através da ingestão de tecido contaminado com WSSV de acordo com Pérez et. al. (2005). Ao final de 40 dias (primeira e segunda etapas), os animais foram mantidos em jejum por 24 horas e, em seguida, alimentados com o tecido contaminado duas vezes ao dia com 10% da biomassa, respeitando um intervalo de três horas entre as inoculações. Após as inoculações, os animais foram alimentados com ração comercial, como descrito anteriormente, sendo monitorados diariamente, durante 21 dias, para a observação da mortalidade e sinais clínicos. Os (quatro) tratamentos foram os mesmos descritos na segunda etapa: (1) Pós-larvas proveniente de BFT e mantida em BFT-BFT; (2) Pós-larvas proveniente de BFT, transferida para BFT-RAC; (3) Pós-larvas provenientes de RAC e transferidas para RAC-BFT e; (4) Pós-larvas proveniente de RAC e mantidas em RAC-RAC; com quatro repetições cada. Durante todo o desafio, os animais mortos e sobreviventes foram coletados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior confirmação de infecção por WSSV via nested-PCR.

## 2.8. Análises Moleculares

### 2.8.1. Extração de DNA

O DNA foi obtido de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. Cinquenta miligramas de brânquias foram adicionados a 692  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (10 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 8,0; 25 mM EDTA pH 7,5), 2  $\mu\text{l}$  de SDS a 20% e 7  $\mu\text{l}$  de Proteinase K a 10 mg/ml, para maceração. Em seguida, foi realizada a purificação do DNA com a adição de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e 700  $\mu\text{l}$  de clorofórmio. O sobrenadante foi precipitado, primeiramente com 1 ml de etanol absoluto e, em seguida, com 500  $\mu\text{l}$  de etanol a 70%, ambos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O DNA foi ressuspensionado em 50  $\mu\text{l}$  de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e, após

repouso de 24 horas em temperatura ambiente, foi incubado a 60°C por 1 hora. O DNA total extraído foi avaliado em gel de agarose a 1% e, quantificado e verificada a relação  $A_{260/280}$  através de análise em espectrofotômetro NanoVue Plus™, sendo posteriormente armazenado a -20 °C até a sua utilização na nested-PCR.

### 2.8.2. Nested-PCR

Foi adotada a metodologia recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para diagnóstico confirmatório de WSSV em camarões, conforme descrito por Lo et al. (1996). A nested-PCR foi utilizada para duas situações: detecção de WSSV nas amostras de tecido usadas para o preparo do material infeccioso e para a determinação da infecção nos animais desafiados, utilizando *pools* de três animais/cada; todos os animais (mortos e sobreviventes) ao longo do experimento, nos diferentes tratamentos. As reações da PCR foram realizadas considerando as mesmas concentrações e ciclos térmicos descritos por Lo et al. (1996). As sequências dos dois conjuntos de primers são mostradas na tabela 1. Em seguida, todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o tamanho dos fragmentos foi estimado usando um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen, USA). Em todas as PCRs foram inseridos um controle positivo (amostra positiva para WSSV) e um controle negativo (água ultrapura).

Tabela 1. Sequências de iniciadores usados para a amplificação do WSSV.

Primer	Sequência do Primer (5' - 3')	Tamanho (pb)	Referência
146F1	5'- ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG -3'	1447	Lo et al. (1996)
146R1	5'- TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A -3'		
146F2	5'- GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A -3'	941	
146R2	5'- TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T -3'		

### 2.9. Análise Histopatológica

Para a realização de análise histopatológica, foi injetada a solução de Davidson (AFA's) em 16 animais moribundos, de cada tratamento, após o desafio viral. Após 70 horas, as amostras foram transferidas para uma solução de etanol a 70%, para posterior preparo das lâminas histológicas, coradas em hematoxilina e eosina (HE), de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996). Todas as lâminas foram examinadas em microscópio óptico, para observação da presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas, cercadas por cromatina marginal em tecidos de origem ectodérmica e

mesodérmica, características de infecção por WSSV (WONGTEERASUPAYA et al., 1995).

## 2.10. Análise Estatística

Os dados amostrados foram previamente analisados quanto à homogeneidade e normalidade pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Para análise dos dados de desempenho zootécnico (primeira e segunda etapas) e do diagnóstico microbiológico (primeira, segunda e terceira coletas) foram aplicados teste U de Mann-Whitney para amostras independentes e o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Bonferroni (ZAR, 1996).

Já para análise estatística dos dados dos parâmetros hemato-imunológicos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Bonferroni (Comparação Pairwise). Todos os dados foram analisados através do software SPSS versão 25.0.

## 3. Resultados

### 3.1. Desempenho Zootécnico dos Camarões

Os valores médios do ganho de biomassa (GB), taxa de crescimento específico (TCE), peso médio final (PMF), fator de conversão alimentar (FCA) e sobrevivência (S) dos camarões cultivados ao longo das duas etapas estão apresentados na tabela 2. Vale ressaltar que estas variáveis não foram determinadas para a terceira etapa, uma vez que, todos os animais desafiados morreram ao 8º dia pós-infecção.

O GB diferiu entre os tratamentos em ambas etapas do experimento, onde, na primeira etapa (10 dias), para o BFT o valor médio foi de 0,09 kg/m<sup>3</sup> e no RAC foi de 0,029 kg/m<sup>3</sup>, e, para a etapa seguinte (30 dias), o valores médios entre os tratamentos variaram entre 0,268 a 0,334 kg/m<sup>3</sup>. Os valores da TCE apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos apenas na primeira etapa, onde os valores médios alcançados foram de 9,144 e 5,558 % dia<sup>-1</sup> para o BFT e RAC, respectivamente.

O PMF apresentou diferenças significativas entre os tratamentos em ambas as etapas. Na primeira etapa do experimento, o valor médio de PMF para BFT foi de 0,104 g e no RAC foi de 0,035 g e, na segunda etapa, os valores médios de PMF variou entre 0,936 a 1,872 g, com o menor valor obtido no RAC-RAC e o maior no RAC-BFT. A variação média do FCA foi de 0,697 a 0,822 na primeira etapa e, na segunda etapa a variação foi de 0,88 a 1,65 sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos também nas duas etapas do experimento ( $p < 0,05$ ). Em relação à sobrevivência, não houve diferenças



significativas entre os tratamentos em nenhuma das etapas.

Tabela 2. Variáveis de desempenho zootécnico de *L. vannamei*, nos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC), para cada etapa do experimento.

<b>1ª ETAPA (10 dias)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Tratamentos</b>			
	<b>BFT</b>		<b>RAC</b>	
Biomassa Inicial (kg/m <sup>3</sup> )	0,0003 ±0,00 <sup>a</sup>		0,0003 ±0,00 <sup>a</sup>	
GB (kg/m <sup>3</sup> )	0,090 ±0,005 <sup>a</sup>		0,029 ±0,002 <sup>b</sup>	
TCE (% dia <sup>-1</sup> )	9,144 ±0,203 <sup>a</sup>		5,558 ±0,178 <sup>b</sup>	
PMF (g)	0,104 ±0,006 <sup>a</sup>		0,035 ±0,002 <sup>b</sup>	
FCA	0,697 ±0,028 <sup>b</sup>		0,822 ±0,052 <sup>a</sup>	
S (%)	95,556 ±1,924 <sup>a</sup>		93,333 ±3,333 <sup>a</sup>	
<b>2ª ETAPA (40 dias*)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Tratamentos</b>			
	<b>BFT-BFT</b>	<b>BFT-RAC</b>	<b>RAC-BFT</b>	<b>RAC-RAC</b>
Biomassa Inicial (kg/m <sup>3</sup> )	0,044 ±0,007 <sup>a</sup>	0,046 ±0,010 <sup>a</sup>	0,014 ±0,002 <sup>b</sup>	0,013 ±0,003 <sup>b</sup>
GB (kg/m <sup>3</sup> )	0,334 ±0,019 <sup>a</sup>	0,332 ±0,018 <sup>a</sup>	0,302 ±0,054 <sup>a</sup>	0,268 ±0,020 <sup>b</sup>
TCE (% dia <sup>-1</sup> )	5,771 ±1,810 <sup>a</sup>	5,204 ±1,375 <sup>a</sup>	3,578 ±1,116 <sup>a</sup>	3,298 ±0,970 <sup>a</sup>
PMF (g)	1,588 ±0,036 <sup>a</sup>	1,824 ±0,141 <sup>a</sup>	1,872 ±0,719 <sup>a</sup>	0,936 ±0,041 <sup>b</sup>
FCA	0,880 ±0,496 <sup>b</sup>	0,947 ±0,780 <sup>ab</sup>	0,943 ±0,620 <sup>ab</sup>	1,650 ±0,179 <sup>a</sup>
S (%)	95,499 ±3,510 <sup>a</sup>	97,922 ±2,080 <sup>a</sup>	96,833 ±4,150 <sup>a</sup>	89,478 ±10,530 <sup>a</sup>

Valores médios ±desvio padrão (primeira etapa: n=4, segunda etapa: n=3)

GB - Ganho de Biomassa, TCE - Taxa de Crescimento Específico, PMF - Peso Médio Final, FCA - Fator de Conversão Alimentar e S - Sobrevivência; BFT - Bioflocos, RAC - Recirculação de água clara.

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa (p≤0,05)

\*Dias acumulados nas duas fases (10 dias + 30 dias)

De modo geral, no que se refere as variáveis de desempenho zootécnico avaliadas, na primeira etapa o BFT obteve os melhores resultados. Já na segunda etapa, os maiores resultados estavam entre os animais mantidos ou transferidos para o BFT.

### 3.2. Análise Microbiológica

Os valores médios das contagens presuntivas total de *Vibrio sp.* em TCBS na água e nos camarões submetidos aos diferentes sistemas (BFT e RAC) estão apresentados na tabela 3, ressalta-se que na coleta zero (Tempo 0), ou seja, em análise prévia realizada antes de iniciar o experimento, a média da contagem bacteriana total na água foi zero,

demonstrando que o tratamento preliminar foi eficaz, porém, nos camarões foi de  $2,00 \times 10^5$  UFC/g.

Tabela 3. Contagem bacteriana total em TCBS dos animais e da água coletados dos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC) ao longo do período experimental.

<b>COLETA 1 (10 dias)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>BFT</b>	<b>RAC</b>		
Camarão ( $\times 10^6$ UFC/g)	2,58 $\pm$ 2,54 <sup>a</sup>	1,75 $\pm$ 2,71 <sup>a</sup>		
H <sub>2</sub> O ( $\times 10^6$ UFC/ml)	4,73 $\pm$ 7,75 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>		
<b>COLETA 2 (40 dias)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>BFT-BFT</b>	<b>BFT-RAC</b>	<b>RAC-BFT</b>	<b>RAC-RAC</b>
Camarão ( $\times 10^6$ UFC/g)	4,17 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	1,33 $\pm$ 1,63 <sup>c</sup>	9,17 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O ( $\times 10^6$ UFC/ml)	4,84 $\pm$ 2,57 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,01 $\pm$ 1,60 <sup>b</sup>
<b>COLETA 3 (48 dias*)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>BFT-BFT</b>	<b>BFT-RAC</b>	<b>RAC-BFT</b>	<b>RAC-RAC</b>
H <sub>2</sub> O ( $\times 10^6$ UFC/ml)	2,21 $\pm$ 3,28 <sup>a</sup>	2,08 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	2,46 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão (coleta 1: n=4, coleta 2: n=3, coleta 3: n=4)

BFT - Bioflocos, RAC - Recirculação de água clara.

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )

\*Dias acumulados nas duas fases + desafio viral (10 dias + 30 dias + 8 dias)

Na coleta 1, equivalente ao ponto amostral de 10 dias de experimento, tanto para a contagem nos camarões, quanto para a água, houve diferença significativa entre os tratamentos. Nota-se que a contagem média foi maior para os camarões submetidos ao BFT com  $2,58 \times 10^6$  UFC/g, enquanto que nos animais do RAC, a contagem foi de  $1,75 \times 10^6$  UFC/g. Ainda para essa coleta, a contagem nos camarões criados em BFT variou (mínimo e máximo) entre  $0,04 \times 10^6$  a  $5,12 \times 10^6$  UFC/g, no RAC o máximo e o mínimo foram de 0 (zero) e  $4,46 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente. Já para as amostras de água, os valores ficaram entre 0 (zero) e  $12,48 \times 10^6$  UFC/mL no BFT e a contagem no RAC foi de zero, como indicado na tabela 3.

Na coleta 2, referente ao ponto amostral de 40 dias, houve diferença significativa entre os tratamentos, tanto nos animais, quanto na água analisados. As maiores contagens nos camarões foram as obtidas nos tratamentos onde os animais estavam submetidos ao BFT, ou seja, BFT-BFT e RAC-BFT, os quais contabilizaram 4,17 e  $9,17 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente. Já na água, a maior contagem obtida foi no tratamento BFT-BFT com  $4,84 \times 10^6$  UFC/mL.

Já as menores contagem observadas para os camarões foram as dos tratamentos BFT-RAC e RAC-RAC, com  $1,33 \times 10^6$  UFC/g e zero, respectivamente. Para a contagem na

água, os menores resultados foram os observados nos tratamentos BFT-RAC, RAC-BFT e RAC-RAC, com destaque para o tratamento RAC-BFT, que apesar da quantidade considerável de vibrionaceae nos camarões, a contagem na água, foi de zero UFC/mL (Tabela 3).

Na coleta 3 (desafio viral), foram feitas contagens apenas da água, uma vez que todos os animais morreram ao 8º dia pós-inoculação. Para esta contagem, houve diferença significativa apenas para o RAC-RAC em relação aos demais tratamentos, conforme descrito na tabela 3.

Outro fato constatado no experimento, como pode-se observar na tabela 3, foi que independente do ambiente ao qual os animais eram provenientes (BFT ou RAC), quando estes foram mantidos ou transferidos para o BFT a carga vibrionaceae nos animais aumentou, enquanto que o mesmo não ocorreu quando os animais foram mantidos ou transferidos para o RAC.

### 3.3. Parâmetros Hemato-Imunológicos

Os resultados da contagem total de hemócitos pré e pós-desafio experimental estão descritos na Tabela 4, onde se pode observar que houveram diferenças significativas entre os tratamentos tanto antes, quanto após o desafio.

Os valores médios referentes à contagem total de hemócitos, antes do desafio, variaram entre  $3,19 \times 10^5$  a  $7,06 \times 10^5$  células/mL e, para todos os tratamentos, foi observado uma diminuição no número de hemócitos circulantes após o desafio.

Os resultados referentes ao percentual de células hialinas, semi-granulares e granulares, encontradas e identificadas, antes e depois do desafio experimental, estão descritos na tabela 4, onde se pode observar que houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) e uma mudança no padrão observado quando se compara as coletas antes e depois do desafio viral.

Os tratamentos BFT-BFT, RAC-BFT e RAC-RAC, antes do desafio, obtiveram uma maior abundância de células hialinas, seguidas pelas semi-granulares. No entanto, após o desafio, essa relação foi mantida para os demais tratamentos, com exceção do BFT-BFT onde o percentual de células semi-granulares foi maior quando comparado aos outros tipos celulares identificados.

No tratamento BFT-RAC, o percentual médio das células semi-granulares foi inversamente proporcional aos tratamentos anteriormente citados. Antes do desafio, as semi-granulares foram, em média, as mais numerosas e, após, o percentual médio das

hialinas foi maior, quando comparado tanto a semi-granulares, quanto as granulares.

Em suma, os animais, após o desafio viral, os tratamentos BFT-BFT, RAC-BFT e RAC-RAC, apresentaram uma maior proporção de células hialinas variando entre 64,14 a 69,85%, seguidas pelas granulares que variaram entre 23,80 e 30,88% e granulares entre 4,98 e 7,55%, com nenhuma diferença significativa entre os tratamentos para o último tipo celular ( $p>0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem total e diferencial de hemócitos obtidos nos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC), pré e pós-desafio experimental.

Variáveis		Tratamentos (Pré-desafio) ( $\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ )			
		BFT-BFT	BFT-RAC	RAC-BFT	RAC-RAC
CTH (Céls/mL)		3,96 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	7,06 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	5,36 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	3,19 $\pm$ 0,97 <sup>c</sup>
Variáveis		Tratamentos (Pós-desafio) ( $\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ )			
		BFT-BFT	BFT-RAC	RAC-BFT	RAC-RAC
CTH (Céls/mL)		3,58 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	1,55 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	1,49 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>	1,56 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>
Variáveis		Tratamentos (Pré-desafio)			
		BFT-BFT	BFT-RAC	RAC-BFT	RAC-RAC
CDH (%)	H	71,84 $\pm$ 10,22 <sup>a</sup>	17,53 $\pm$ 3,96 <sup>b</sup>	75,00 $\pm$ 3,14 <sup>a</sup>	64,32 $\pm$ 3,30 <sup>a</sup>
	SG	27,52 $\pm$ 10,74 <sup>b</sup>	81,08 $\pm$ 4,03 <sup>a</sup>	23,81 $\pm$ 3,87 <sup>b</sup>	29,69 $\pm$ 2,50 <sup>b</sup>
	G	0,63 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	1,39 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	1,19 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	5,99 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>
Variáveis		Tratamentos (Pós-desafio)			
		BFT-BFT	BFT-RAC	RAC-BFT	RAC-RAC
CDH (%)	H	13,32 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	64,14 $\pm$ 3,86 <sup>a</sup>	69,85 $\pm$ 3,90 <sup>a</sup>	65,07 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>
	SG	79,54 $\pm$ 2,06 <sup>a</sup>	30,88 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>	23,80 $\pm$ 3,13 <sup>c</sup>	27,39 $\pm$ 2,57 <sup>c</sup>
	G	7,14 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	4,98 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	6,35 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	7,55 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão (CTH e CDH - pré e pós-desafio: n=3)

CTH – Contagem Total de Hemócitos, CDH – Contagem Diferencial de Hemócitos, BFT – Bioflocos, RAC – Recirculação de Água Clara, H – Hialinas, SG – Semi-granulares, G – Granulares

Letras diferentes na mesma linha mostram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )

### 3.4. Análise Molecular

Na 1ª PCR, para os tratamentos BFT-BFT, BFT-RAC e RAC-BFT, 25% dos *pools* foram positivos, enquanto que para o tratamento RAC-RAC, foram positivos para WSSV 50% das amostras avaliadas. Já na 2ª PCR foram determinados 100% de amostras positivas para todos os tratamentos avaliados.

### 3.5. Análise Histopatológica e Mortalidade Cumulativa

Na análise histopatológica, em todos os tecidos analisados - brânquia, órgão linfóide e estômago - foram observadas presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas em animais experimentalmente infectados com WSSV em todos os quatro tratamentos: BFT-BFT, BFT-RAC, RAC-BFT e RAC-RAC. Para os controles negativos, não foram determinadas quaisquer alterações teciduais (Figura 1).

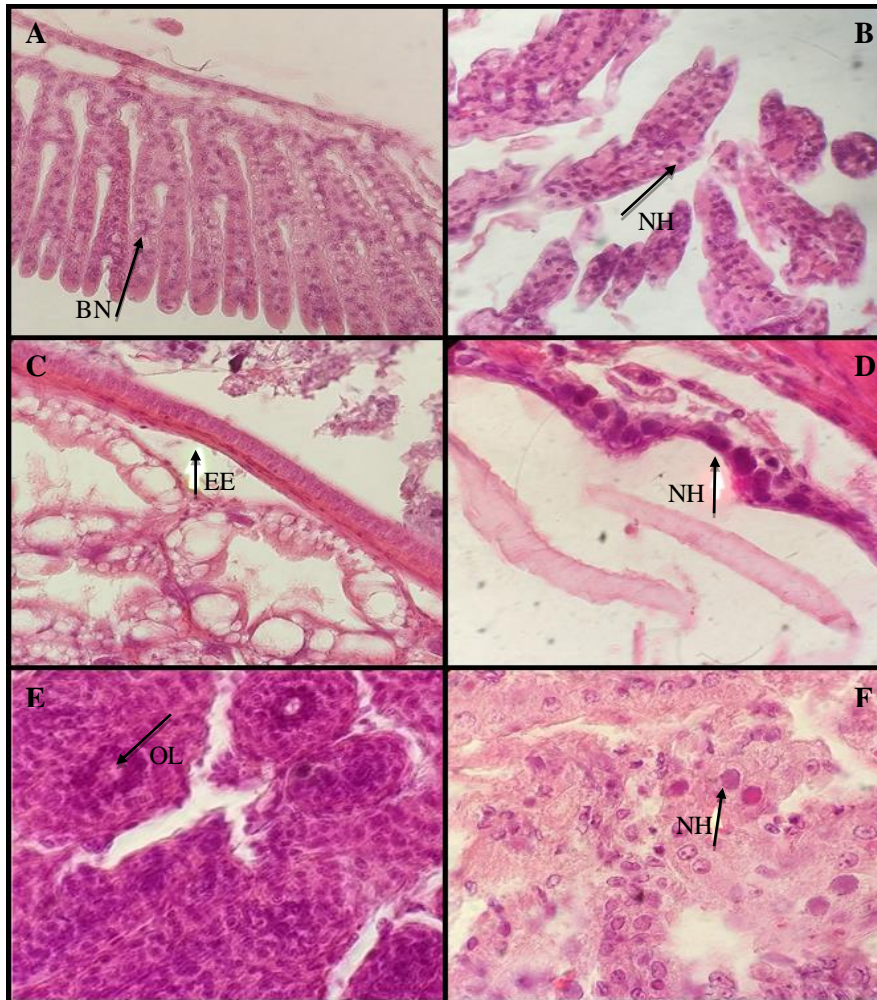


Figura 1. Cortes histológicos de *L. vannamei*, de aproximadamente 1 g, Coloração H.E. 400x. (A) Controle negativo, sem alteração aparente nas brânquias; (B) *L. vannamei* infectado com presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas nas brânquias; (C) Controle negativo, sem alterações aparentes no epitélio do estômago; (D) *L. vannamei* infectado, com presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas no epitélio do estômago, (E) Controle negativo, sem alterações aparentes, com órgão linfóide estruturado e; (F) *L. vannamei* infectado, com desorganização do órgão linfóide e presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas.

BN – Brânquia Normal, EE – Epitélio do Estômago, OL – Órgão Linfóide, NH – Núcleo Hipertrófico.

Além disso, os animais submetidos ao sistema BFT, quando comparados ao RAC, embora estivessem igualmente infectados, apresentaram núcleos basófilos maiores e em maior abundância, indicando características distintas da manifestação da infecção (Figura

2).

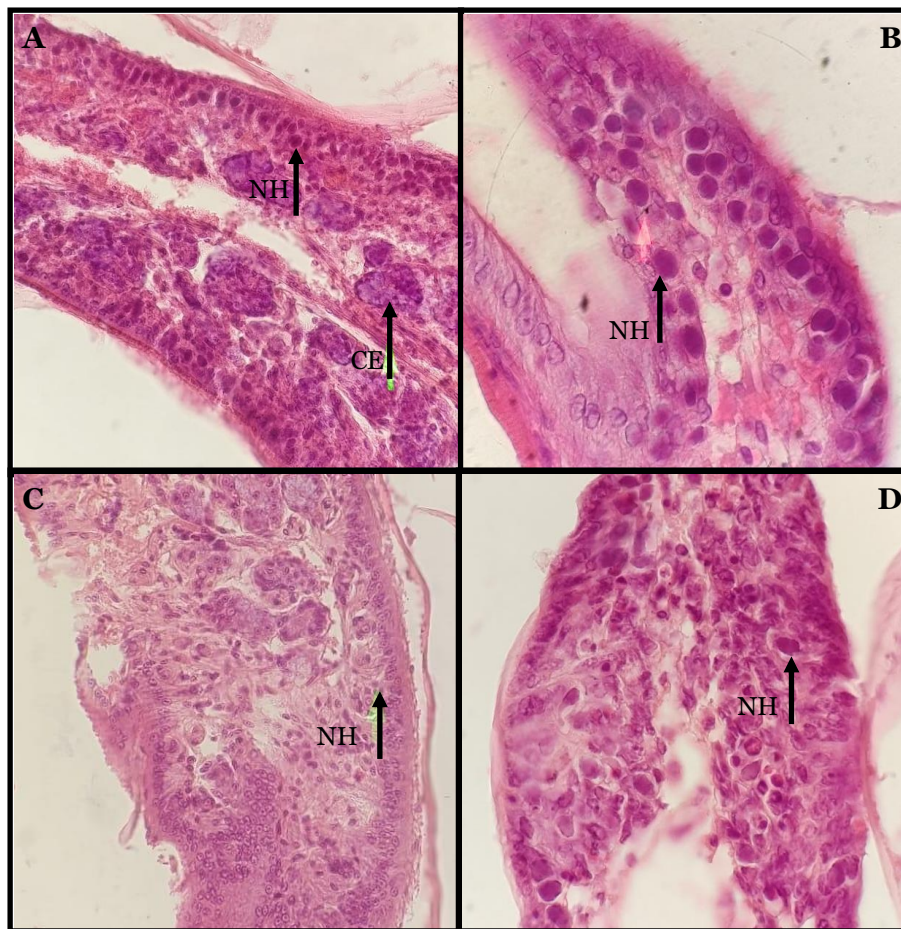


Figura 2. Cortes histológicas de tecidos subcutâneos de *L. vannamei* infectado por WSSV, de aproximadamente 1 g nos diferentes tratamentos analisados, Coloração H.E. 400x. (A) BFT-BFT: Aglomerado de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas em tecido subcutâneo e expansão de cromatóforos; (B) AC-BFT: Presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas bem dilatadas (C) BFT-AC: Presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas, menores e menos intensas (D) AC-AC: Presença de núcleos hipertróficos com inclusões centrais basófilas de tamanhos variados e menos intensas. NH – Núcleo Hipertrófico. CE – Cromatóforo Expandido.

A mortalidade cumulativa encontra-se sumarizada na Tabela 5, onde, com exceção do RAC-BFT, todos os demais tratamentos iniciaram as mortes a partir do 3º dia pós-infecção. O RAC-BFT, manteve-se ao longo do experimento, com as taxas mais baixas de morte, no entanto, do 4º para o 5º dia pós-infecção, quando ocorreu mortalidade massiva, passou de 22,22% para 72,22% de mortalidade em um único dia. Ao 6º dia pós-infecção, a maior parte dos tratamentos se encontrava com mortalidade acima de 90%, assim ao final do 7º dia de desafio, restou apenas o tratamento RAC-RAC. O desafio foi encerrado ao 8º dia após 100% de mortalidade em todos os tratamentos.

Tabela 5. Mortalidade cumulativa nos diferentes sistemas de cultivo (BFT e RAC) desafiados via ingestão com WSSV.

Tratamentos	Nº. de animais	Mortalidade cumulativa no decorrer dos dias de desafio (%)							
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º
BFT-BFT	18	0	0	6	39	44	94	100	100
BFT-RAC	18	0	0	6	39	56	100	100	100
RAC-BFT	18	0	0	0	22	72	94	100	100
RAC-RAC	18	0	0	6	56	56	72	94	100

BFT – Bioflocos , RAC – Recirculação de água clara

#### 4. Discussão

O desempenho zootécnico do camarão pode diferir de acordo com o manejo, densidade de estocagem, peso inicial e condições físico-químicas da água de cada estudo (GAONA et al., 2016). Tendo em vista que mantiveram-se os parâmetros de qualidade de água dentro dos limites ideais propostos por Samocha et al. (2017) para *L. vannamei*, no referente ao desempenho zootécnico, os diferentes sistemas (BFT e RAC) empregados neste estudo, apresentaram influência em ambas fases do experimento, onde se observa, com exceção da sobrevivência, diferenças significativas nos demais parâmetros analisados em, pelo menos, uma das etapas do experimento.

Demonstrando que, apesar da frequência de alimentação ser a mesma em ambos os sistemas, o alimento natural presente no BFT, serve como fonte suplementar de nutrientes para o camarão nos primeiros dias de vida, refletindo o desempenho zootécnico no ganho de peso e de biomassa (WASIELESKY et al., 2006; BECERRIL-CORTÉS et al., 2018), o que corrobora com estudos que mostram a capacidade, do *L. vannamei*, de aproveitamento da produtividade natural do BFT (EBELLING et al., 2006; LARA et al., 2017). Na etapa seguinte do experimento, das variáveis de desempenho analisadas, foram observadas diferenças significativas apenas para o ganho de biomassa e peso médio específico.

No presente estudo foram encontradas diferenças para o FCA para os tratamentos com BFT quando comparados ao RAC, o que difere dos resultados encontrados para esse parâmetro, em estudo realizado por Guemez-Sorhouet et al. (2019), que avaliaram as respostas zootécnicas e fisiológicas de pós-larvas de *L. vannamei* cultivadas em BFT e RAC, mas corrobora, igualmente, ao estudo feito por Wasielesky et al. (2006), onde avaliaram os efeitos da produção natural em BFT para *L. vannamei*, podendo estas diferenças serem atribuídas aos ajustes semanais da quantidade de ração, influenciados pelos percentuais de biomassa adotados.

A sobrevivência foi semelhante a de outros estudos com o sistema BFT, conforme

encontrado por Peixoto et al. (2018) ao avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *L. vannamei* em BFT com diferentes frequências de alimentação; por Abreu et al. (2019) e Brito et al. (2016) ao estudar a influência da inclusão de microalgas e rotíferos ao sistema BFT no desempenho zootécnico de *L. vannamei*; e ao trabalho de Guemez-Sorhouet et al. (2019), que ao avaliar o desempenho zootécnico e fisiológico de pós-larvas de *L. vannamei* durante a fase de berçário submetidas a diferentes sistemas de cultivo, obtiveram taxas de sobrevivência semelhantes ao do presente estudo quando as pós-larvas foram mantidas em água clara sob a mesmas condições de estocagem empregadas neste trabalho.

Em relação a contagem bacteriana tanto para os camarões, quanto para água, houve variação significativa, entre os tratamentos, na primeira e segunda etapas. Observou-se, ao 40º dia de cultivo, aumento da contagem bacteriana (TCBS) nos camarões para os tratamentos BFT-BFT e RAC-BFT e, na água, apenas para o tratamento com BFT. Esse aumento após o desafio, de acordo com Selvin e Lipton (2003), sugere que uma infecção primária por vírus, como o WSSV, pode enfraquecer o camarão, pois a mesma acarretaria em lesões no hepatopâncreas do animal, aumentando sua susceptibilidade a infecções bacterianas secundárias. A influência desse fator à suscetibilidade ao *Vibrio* sp. poderia explicar a mortalidade altamente variável no camarão nos diferentes tratamentos estudados.

Tal fato é reafirmado por outros estudos, como o realizado por Gómez-Gil et al. (1998), ao avaliar o número e as espécies de *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. damsela*) que podem estar presentes em juvenis de *L. vannamei*, onde os mesmos foram detectados em camarões saudáveis sem sinais graves de doença e Flegel et al. (2004) que encontraram camarão positivo para WSSV sem sinais clínicos e histológicos expressivos da doença.

No presente estudo, o aumento da contagem presuntiva de *Vibrio* na água pode refletir o maior aporte de matéria orgânica decorrente do acréscimo da biomassa final, que proporcionam maiores entradas de ração ao sistema de cultivo, além das mínimas trocas de água. Tal fenômeno também foi observado por Panigrahi et al. (2018) quando avaliaram diferentes relação C/N na água de cultivo. Entretanto, estudos com aplicação de probióticos demonstram uma diminuição da carga de *Vibrio* no sistema, sugerindo a presença de microrganismos benéficos que passaram a competir por nutrientes (HOSTINS et al., 2017). Ao final dos 48 dias de cultivo, observou-se diminuição da contagem total de *Vibrio* em TCBS nas amostras de água de todos os tratamentos analisados, provavelmente devido à redução da carga orgânica do sistema, mortalidade dos animais e redução do input de ração nas unidade de cultivo.



Quanto aos parâmetros hemato-imunológicos, no presente estudo houveram diferenças significativas entre os tratamentos, para a contagem total de hemócitos (CTH), tanto antes, quanto após o desafio. Os tratamentos se comportaram de forma distinta: no BFT-BFT, houve uma diminuição no número de hemócitos circulantes, após o desafio, porém, o valor, foi maior em comparação com os demais tratamentos avaliados.

Considerando que os hemócitos são um dos principais sítios de replicação do WSSV (WANG et al., 2002) e diversos trabalhos já mostraram que ocorre diminuição significativa no hemograma em camarões infectados (SARATHI et al., 2008; YEH et al., 2009), a diferença nos hemogramas pode estar relacionada a ação do vírus, associada tanto à lise, quanto à apoptose celulares e/ou à alteração na produção dos hemócitos pelos órgãos hematopoiéticos (GUERTLER et al., 2013). Como em estudo realizado por Van de Braak et al. (2002) e Wongprasert et al. (2003) que observaram um declínio significativo no número de hemócitos circulantes em *P. monodon* após a infecção do WSSV. Além disso, pode-se supor também que a queda nos hemócitos em circulação de camarões infectados com WSSV permitiu a proliferação dos vibrios nos camarões, uma vez que os hemócitos são responsáveis pelo encapsulamento e fagocitose de bactérias, fato esse também constatado em estudo realizado por Phuoc et al. (2009), onde observaram que a infecção prévia por WSSV permitiu o aumento na contagem de *V. campbellii*.

Apesar dos registros de diminuição do CTH após o desafio em todos os tratamentos analisados, o BFT-BFT, em comparação com os demais tratamentos apresentou quantidade maior, estando de acordo com resultados encontrados em estudos feitos por Zhao et al. (2016), ao avaliarem os efeitos de diferentes fontes de carbono na resposta imune do *L. vannamei* cultivados em BFT e, a Panigrahi et al. (2019), ao verificar a influência das fontes de carboidratos na dinâmica microbiana e nas respostas imunomoduladoras em *L. vannamei* cultivados em água inoculada com cepa de *Vibrio parahaemolyticus* em uma concentração de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Em ambos os estudos, observou-se que a CTH do animal cultivado em BFT foi aumentada quando comparada aos seus respectivos tratamentos controle. De acordo com Panigrahi et al. (2017), esse efeito de estimulação do sistema imunológico do camarão parece ser uma característica geral do BFT. Se observarmos a tabela 3 de contagem bacteriana e correlacionarmos aos valores de CTH obtidos no tratamento BFT-BFT (tabela 4), observaremos um aumento da carga bacteriana, com uma menor redução do CTH quando comparada aos demais tratamentos.

Tendo em vista que, os hemócitos circulantes desempenham um papel central na sistema imunológico celular e humoral (BACHERE et al., 2004), esses resultados, estão em

conformidade com o que é descrito ainda por Panigrahi et al. (2017), quando os mesmos relataram que os constituintes das paredes celulares bacterianas podem desencadear a resposta do sistema imunológico em camarões.

Os resultados referentes à contagem diferencial de hemócitos, obtiveram uma mudança no padrão observado quando se compara as coletas antes e depois do desafio viral. Os tratamentos BFT-BFT e RAC-BFT antes do desafio, obtiveram uma maior abundância de células hialinas, seguidas pelas semi-granulares, padrão que se manteve mesmo após o desafio. Após o desafio, com exceção do BFT-BFT que apresentou células semi-granulares em maior abundância do que os outros tipos celulares observados, para os demais tratamentos, as células hialinas mantiveram-se em maior abundância, seguidas pelas semi-granulares. De um modo geral, ao compararmos os percentuais de células de defesa antes e após a infecção, estas tenderam a diminuição após o desafio.

Segundo Yeh et al (2009), ao avaliar a resposta imune do *L. vannamei* após uma co-infecção pelo WSSV e IHNV, verificaram que a diminuição das atividades enzimáticas ligadas ao sistema imunológico em camarões infectados pelos vírus pode estar atrelada a diminuição das células semi-granulares e granulares.

Em termos de infecção, apesar de terem sido observados sinais de WSSV em vários tecidos (brânquias, epitélio do estômago e órgão linfóide dos animais infectados), nas brânquias foram observadas maior concentração de lesões sugestivas da doença. Estes resultados são similares aos descritos por Valente et al. (2019), que ao avaliar a resistência de *L. vannamei* cultivados em BFT e água clara após desafio com WSSV, encontraram sinais da infecção, especialmente, nas brânquias, pois além do vírus apresentar tropismo por esse tipo de tecido, as mesmas estão mais expostas por terem contato constante com a água e por isso, contribuem de maneira importante na defesa de crustáceos (BURGENTS et al., 2005), podendo servir como um local de acumulação e encapsulamento de partículas estranhas (MARTIN et al., 2000).

No que se refere a influência dos sistemas na infecção, acredita-se que as condições ambientais e o sistema de produção empregado podem modular as respostas moleculares distintamente, refletindo em uma sobrevivência diferente entre os tratamentos. Tendo em vista que os animais do presente estudo mantidos em BFT, quando comparados ao RAC, embora estivessem igualmente infectados, apresentaram maior abundância de núcleos basófilos, fato que se refletiu nos resultados da mortalidade cumulativa ao final do experimento, uma vez que, apenas o tratamento RAC-RAC ainda manteve animais vivos. Em estudo conduzido por Valente et al. (2019), onde foram comparadas as taxas de

sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* cultivados em BFT e água clara, foram observadas maior mortalidade cumulativa entre os animais mantidos em BFT em comparação com aqueles mantidos na água clara após desafio com WSSV. Esse fato, como observado na tabela 3, pode ser atribuído a baixa carga vibriônica observada no RAC-RAC durante todo o experimento em comparação com os demais tratamentos analisados.

Além disso, tal fato está relacionado à influência do sistema na forma de manifestação da infecção, que segundo este mesmo estudo (VALENTE et al., 2019), pode estar associado à não ocorrência de troca de água no BFT, o que poderia acarretar em um número de partículas virais maior do que no sistema de água clara, em que a troca de água ocorre com frequência ou através de fluxo contínuo. Além disso, de acordo os mesmos autores, essa hipótese também estaria apoiada em um estado de fadiga do sistema de defesa, considerando que um ambiente como o BFT, exibe um número abundante de bactérias, benéficas ou patogênicas e outros microrganismos, que pode atuar como um fator de estresse ambiental, com estimulação contínua do sistema imunológico.

No referente aos microrganismos presentes na água de cultivo, neste trabalho, os valores altos da contagem bacteriológica de vibrio pós-desafio viral apoiam a hipótese supracitada. Em estudo realizado por Phuoc et al. (2009), onde analisaram a co-infecção com *V. Campbellii* e WSSV em *L. vannamei* em condições experimentais, observaram que a mortalidade cumulativa nos grupos de co-infecção aumentou significativamente em comparação com a mortalidade nos grupos infectados isoladamente por *V. campbellii* ou WSSV. Já Selvin e Lipton (2003) isolaram uma cepa virulenta de *V. alginolyticus* de camarão proveniente de um surto de WSSV, e afirmaram que o camarão positivo para WSSV fica mais passível de infecção secundária por *Vibrio*, ou seja, todas as observações acima sugerem que múltiplas infecções ocorrem regularmente e os camarões ficam mais susceptíveis em condições de múltiplas infecções.

No que se refere a múltiplas infecções, alguns estudos sugerem que os efeitos de múltiplas infecções na mortalidade não está apenas relacionado à infecção pelo WSSV, mas muito mais à carga do WSSV. Em estudo feito por Jang et al. (2014), ao avaliar o efeito de múltiplas infecções na mortalidade e na defesa do *L. vannamei*, constatou-se que a carga e a forma como o animal é exposto aos patógenos podem determinar a curva de infecção e mortalidade do hospedeiro.

No presente estudo observou-se o início da mortalidade cumulativa no 3º dia após a infecção, isso está de acordo com resultados encontrados no estudo realizado por Jang et al. (2014) em uma condição de co-infecção, com uma cepa virulenta de *Vibrio anguillarum* na

ordem de  $10^6$  UFC/ml, que foi a mesma ordem contabilizada no decorrer do presente estudo e, um inóculo de WSSV com carga viral menor do que a usada no presente estudo. Ressalta-se que nessas condições de co-infecção, Jang et al. (2014) obtiveram até o 7º dia pós-infecção 87,5% de mortalidade, porém ao infectar os animais primeiramente com WSSV e somente 24h depois com *V. anguillarum*, teste denominado pelos autores de superinfecção, nas mesmas condições supracitadas, obteve 100% de mortalidade, resultado este, similar ao que foi obtido no estudo atual, indicando a possibilidade de uma co-infecção nos animais avaliados.

Os resultados de mortalidade cumulativa obtidos no RAC-RAC, onde este manteve os animais vivos por mais tempo do que os demais tratamentos analisados, apresentou carga vibrionácea nos animais menor no início do desafio, o que segundo Jang et al. (2014), pode refletir um cenário de infecção única, uma vez que a mortalidade cumulativa é maior em grupos de infecção múltipla. Assim, embora não tenha sido avaliado um cenário de co-infecção por WSSV e *Vibrio* sp. no presente estudo, a possibilidade de sua ocorrência resultaria na potencialização da infecção por WSSV. Efeito esse, também foi observado por Qiao et al. (2015) ao comparar a resposta imune do *L. vannamei* após infecções múltiplas e únicas com WSSV e *Vibrio anguillarum*.

Para o controle dessas múltiplas infecções comumente observadas em BFT, futuros estudos devem ser conduzidos visando alternativas que minimizassem os efeitos da carga vibrionácea naturalmente encontradas nesse tipo de sistema.

## 5. Conclusões

Embora o sistema BFT tenha resultado em melhores índices zootécnicos, especialmente nas primeiras fases de vida do animal, foi determinada a influência do sistema produtivo e sua respectiva transferência em uma condição de infecção experimental por WSSV.

Ao analisar as lesões encontradas nas análises histológicas constatou-se maior concentração de lesões sugestivas da doença, refletindo na mortalidade cumulativa dos animais mantidos ou transferidos para o BFT que demonstraram menor resistência à infecção, o que reafirma o possível desgaste do sistema imunológico dos animais submetidos a esse sistema, indicando o claro efeito do sistema nos animais. E embora não tenha sido avaliado um cenário de co-infecção por WSSV e *Vibrio* sp. no presente estudo, a possibilidade de sua ocorrência resultaria na potencialização da infecção por WSSV,

especialmente no sistema com BFT, considerando as altas concentrações vibrionáceas contabilizadas.

Constatou-se, ainda, que mesmo o BFT não se mostrando eficiente frente a uma infecção, não é interessante, caso isso ocorra, a transferência para outro tipo de sistema, pois essa mudança pode acarretar em estresse e esgotamento energético ainda maiores para o animal.

### **Agradecimentos**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) forneceu apoio financeiro sob a forma de bolsa, ao primeiro autor, durante a realização do presente estudo.

### **Referências**

ABREU, J. L.; BRITO, L. O.; LIMA, P. C. M.; SILVA, S. M. B. C. D.; SEVERI, W.; GÁLVEZ, A. O. 2019. Effects of addition of *Navicula* sp.(diatom) in different densities to postlarvae of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system: Growth, survival, productivity and fatty acid profile. **Aquaculture Research**, 50, 2231-2239.

AHMAD, I.; VERMA, A. K.; RANI, A. M. B.; RATHORE, G.; SAHARAN, N.; GORA, A. H. 2016. Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeorohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources. **Aquaculture**. 457, 61-67.

AVNIMELECH, Y. 2009. Biofloc technology: A Practical Guide Book. Louisiana: **The World Aquaculture Society**.182p.

AVNIMELECH Y. 2012. Biofloc Technology: A Practical Guide Book. Louisiana: **World Aquaculture Society**. 2, 48.

BACHERE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; LORGERIL, J., GARNIER, J.; ROMESTAND, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*.**Immunological Reviews**, 198, 149-168.

BALLESTER, E. L. C.; ABREU, P. C.; CAVALLI, R. O; EMERENCIANO, M.; ABREU, L.; WASIELESKY, W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeuspaulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. **Aquaculture Nutrition**. 16, 163-172.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. 1976. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: **Livros técnicos e científicos**. 327p.

BECERRIL-CORTÉS, D.; MONROY-DOSTA, M. D. C.; EMERENCIANO, G. C.; CASTRO-MEJÍA, G.; SOFIA, B.; BERMÚDEZ, S.; CORREA, G. V. 2018. Effect on Nutritional Composition of Produced Bioflocs with Different Carbon Sources (Molasses,

Coffee Waste and Rice Bran) in Biofloc System. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. 6. 541-547.

BRITO, L. O.; SANTOS, I. G. S.; ABREU, J. L.; ARAUJO, M. T.; SEVERI, W.; GALVEZ, A. O. 2016. Effect of the addition of diatoms (*Navicula* spp.) and rotifers (*Brachionus plicatilis*) on water quality and growth of the *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, 47, 3990-3997.

BURGENTS, J. E., BURNETT, K. G.; BURNETT, L. E. 2005. Effects of hypoxia and hypercapnic hypoxia on the localization and the elimination of *Vibrio cholerae* in *Litopenaeus vannamei*, the Pacific white shrimp. **The Biological Bulletin**. 208, 159-168.

CARDONA, E.; SAULNIER, D.; LORGEUX, B.; CHIM, L.; GUEGUEN, Y. 2015. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. **Fish & Shellfish Immunology**. 45, 933-939.

CELI, M.; FILICIOTTO, F.; PARRINELLO, D.; BUSCAINO, G.; DAMIANO, M. A.; CUTTITA, A.; D'ANGELO, S.; MAZZOLA, S.; VAZZANA, M. 2013. Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. **The Journal of Experimental Biology**. 216, 709-718.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAMPAIO, S. S. 2009. Vibrio em amostras de água de viveiros de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Ceará-Brazil. **Atlântica**. v. 31, pp. 177-182.

DURAND, S. V.; LIGHTNER, D. V. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of whitespot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**. 25, 381-389.

EBELLING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. 2006. Análise de engenharia da estequiometria do controle fotoautotrófico, autotrófico e heterotrófico do nitrogênio amoniacal em sistemas de produção aquícola. **Aquaculture**, 257, 346-358.

EKASARI, J.; AZHAR, M. H.; SURAWIDJAJA, E. H.; NURYATI, S.; DE SCHRYVER, P.; BOSSIER, P. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**. 41, 332-339.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. 2013. Biofloc Technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. Biomass now: cultivation and utilization. **Edit Tech Rijeka**. Croatia. 1, 301-328.

FERREIRA, G. S.; BOLÍVAR, N. C.; PEREIRA, S. A.; GUERTLER, C.; VIEIRA, F. V.; MOURINO, J. L. P.; SEIFFERT, W. Q. (2015). Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. 448, 273-279.

FLEGEL, T. W.; NIELSEN, L.; THAMAVIT, V.; KONGTIM, S.; PASHARAWIPAS, T. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest **Aquaculture**, 240, 55-68.

FLEGEL, T. W.; SRITUNYALUCKSANA, K. 2011. Shrimp molecular responses to viral pathogens. **Marine Biotechnology**. 13, 587-607.

FÓES, G.K.; FRÓES, C.; KRUMMENAUER, D.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. 2011. Nursery of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in biofloc technology culture system: survival and growth at different stocking densities. **Journal of Shellfish Research**. 30, 1-7.

GAONA, C. A. P.; SERRA, F. P.; FURTADO, P. S.; POERSCH, L. H.; WASIELESKY JR, W. 2016. Biofloc management with different flow rates for solids removal in the *Litopenaeus vannamei* BFT culture system. **Aquaculture International**. 24, 1263-1275.

GÓMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F.; INGLIS, V.; GUERRA-FLORES, A. L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 163, 1-9.

GUEMEZ-SORHOUE, E.; VILLARREAL, H.; RACOTTA, I. S.; NARANJO, J.; MERCIER, L. 2019. Zootechnical and physiological responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae reared in bioflocs and subjected to stress conditions during nursery phase. **Aquaculture Research**. 50, 1198-1211.

GUERTLER, C.; RIEG, T.; MEJÍA-RUIZ, C. H.; LEHMANN, M.; BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M. 2013. Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 48, 983-990.

HOSTINS, B.; LARA, G.; DECAMP, O.; CESAR, D. E.; WASIELESKY, W. 2017. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**. 480, 58-64.

JANG, I. K.; QIAO, G.; KIM, S-K. 2014. Effect of multiple infections with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio anguillarum* on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (L.): mortality and viral replication. **Journal of Fish Diseases**, 37, 911-920.

KOBAYASHI, T.; ENOMOTO, S.; SAKAZAKI, R.; KUWAHARA, S. 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). **Japanese Journal of Bacteriology**. 18, 387p.

LARA, G.; HOSTINS, B.; BEZERRA, A.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. Jr. 2017. The effects of different feeding rates and re-feeding of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc culture system. **Aquacultural Engineering**, 77, 20-26.

LIGHTNER, D.V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge: **World Aquaculture Society**. 304p.

LO, C. F.; LEI, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; KOU, G. H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**. 25, 133-141.

MAGANA-GALLEGOS, E.; GONZALEZ-ZÚÑIGA, R.; CUZON, G.; AREVALO, M.; PACHECO, E.; VALENZUELA, M. A. J.; GAXIOLA, G.; CHAN-VIVAS, E.; LÓPEZ-AGUIAR, K.; NORENA-BARROSO, E. 2018. Nutritional contribution of biofloc within the diet of growout and broodstock of *Litopenaeus vannamei*, determined by stable isotopes and fatty acids. **Journal of the World Aquaculture Society**. 49, 919-932.

MARTINS, C. I. M.; EDING, E. H.; VERDEGEM, M. C. J.; HEINSBROEKA, L. T. N.; SCHNEIDER, O.; BLANCHETOND, J. P.; ROQUE d'ORBCASTELD, E.; VERRETH, J. A. J. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: a perspective on environmental sustainability. **Aquacultural Engineering**. 43, 83-93.

MARTIN, G. G.; QUINTERO, M.; QUIGLEY, M.; KHOSROVIAN, H. 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**. 20, 209-217.

MOSS, K. K.; MOSS, S. M. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal World Aquaculture Society**. 35, 536-542.

PANG, H.; WANG, G.; ZHOU, S.; WANG, J.; ZHAO, J.; HOARE, R.; MONAGHAN, S. J.; WANG, Z.; SUN, C. 2019. Survival and immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following single and concurrent infections with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**. 92, 712-718.

PANIGRAHI, A.; SARANYA, C.; SUNDARAM, M.; VINOTH KANNAN, S. R.; DAS, R. R.; SATISH KUMAR, R.; RAJESH, P.; OTTA, S. K. 2018. Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. **Fish and Shellfish Immunology**. 81, 329-337.

PANIGRAHI, A.; SUNDARAM, M.; JEBHA, J.; SYAMADAYAL, J.; OTTA, S. K.; BHUVANESHWARI, T.; SARASWATHY, R.; SHYNE ANAND, P.S.; RAJABABU, D.; SARANYA, C.; GOPAL, C.; RAVICHANDRAN, P. 2017. Biofloc based nutrient dense culture system for nursery and grow out farming of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. **Indian Journal of Fisheries**. 64, 22-32.

PANIGRAHI, A.; SUNDARAM, M.; SARANYA, C.; SAMBID, S.; DASH, R. R.; SYAMA DAYAL, J. 2019. Carbohydrate sources differentially influence growth performances, microbial dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under biofloc system. **Fish and Shellfish Immunology**. 86, 1207-1216.

PEIXOTO, S.; SILVA, E.; COSTA, C. B.; NERY, R. C.; RODRIGUES, F.; SILVA, J. F.; BEZERRA, R.; SOARES, R. 2018. Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. **Aquaculture Nutrition**. 24, 579-585.

PÉREZ, F.; VOLCKAERT, F. A.; CALDERÓN, J. 2005. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**. 250, 586-591.



PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M.; ALDAY-SANZ, V.; VAN DEN BROECK, W.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. 2009. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio spp.* on co-infection with White Spot Syndrome Virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 290, 61-68.

QIAO, G., XU, D. H., WANG, Z.; JANG, I. K.; QI, Z.; ZHANG, M.; KIM, S. K. 2015. Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**. 44, 257–264.

RAY, A. J.; SEABORN, G.; VINATEA, L.; BROWDY, C. L.; LEFFLER, J. W. 2012. Effects of biofloc reduction on microbial dynamics in minimal-exchange, superintensive shrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture systems. **Journal World Aquaculture Society**. 43, 790-801.

REIS, W. G.; WASIELESKY, W.; ABREU, P. C.; BRANDAO, H.; KRUMMENAUER, D. 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*(Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. **Aquaculture**. 508, 19-29.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.

SAMOCHA, T. M. PRANGNELL, D. I.; HANSON, T. R.; TREECE, G. D.; MORRIS, T. C.; CASTRO, L. F.; STARESINIC, N. 2017. Projeto e operação de sistemas superintensivos e dominados por bioflocos para a produção de camarões brancos do Pacífico *Litopenaeus vannamei*: A experiência de pesquisa Texas A & M AgriLife. Louisiana: **The World Aquaculture Society**. 368p.

SAMOCHA, T. M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A. M.; BURGER, J. M.; ALMEIDA, R. V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D. L. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Engineering**. 36, 184-191.

SARATHI, M.; SIMON, M. C.; VENKATESAN, C.; HAMEED, A. S. 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. **Marine Biotechnology**. 10, 242-249.

SCHVEITZER, R.; ARANTES, A. R.; BALOIA, M.; COSTÓDIO, P. F. S.; ARANAA, V. L.; SEIFFERT, W. Q.; ANDREATTA, E. R. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc system) at different stocking densities: effects on microbial activity, water quality and production rates. **Aquacultural Engineering**. 55, 93-103.

SELVIN J. L.; LIPTON A. P. 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 57, 147–150.

SILVA, S. M. B. C.; LAVANDER, H. D.; LUNA, M. M. S.; SILVA, A. O. M. E., GÁLVEZ, A. O.; COIMBRA, M. R. M. 2015. *Artemia franciscana* as a vector for Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of**

**Invertebrate Pathology.** 126, 1-5.

THITAMADEE, S.; PRACHUMWAT, A.; SRISALA, J.; JAROENLAK, P.; SALACHAN, P. V.; SRITUNYALUCKSANA, K.; FLEGEL, T. W.; ITSATHITPHAISARN, O. 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture.** 452, 69-87.

VADSTEIN, O.; BERGH, O.; GATESOUBE, F.J.; GALINDO-VILLEGAS, J.; MULERO, V.; PICCHIETTI, S.; GIUSEPPE SCAPIGLIATI, G.; MAKRIDIS, P.; OLSEN, Y.; DIERCKENS, K.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; DE SCHRYVER, P.; BOSSIER, P. 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. **Reviews In Aquaculture.** 5, S1-S25.

VALENTE, C. S.; ORTIZ, K. O.; DEPPERSCHMIDT, R.; FRAGA, A. P. M.; VIEIRA, F. N.; MARQUES, M. R. F. 2019. Transcription of defense related genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, kept in biofloc and in clear seawater and challenged with the white spot syndrome virus. **Aquaculture International.** 1-15.

VAN DE BRAAK, C. B. T.; BOTTERBLOM, M. H. A.; HUISMAN, E. A.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VAN DER KNAAP, W. P. W. 2002. Preliminary study on haemocyte response to White Spot Syndrome Virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms,** 51, 149-155.

VAN WYK, P. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M.; LARAMORE, R.; MAIN, K. L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J. **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems.** Florida: Department of Agriculture and Consumer Services - Harbor Branch Oceanic Institute, 125-140.

VERBRUGGEN, B.; BICKLEY L. K.; AERLE, R. V.; BATEMAN, K. S.; STENTIFORD, G. D.; SANTOS, E. M.; TYLER, C. R. 2016. Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. **Viruses.** 8, 23.

WANG, Y.T.; LIU, W.; SEAH J.N.; LAM, C. S.; XIANG, J.H.; KORZH, V. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms.** 52, 249-259.

WASIELESKY, W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C. L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.** 258, 396-403.

WASIELESKY, W.; FROES, C.; FÓES, G.; KRUMMENAUER, D.; LARA, G.; POERSCH, L. 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The Effect of Stocking Densities and Compensatory Growth. **Journal of Shellfish Research.** 32, 799-806.

WONGPRASERT, K.; KHANOBDEE, K.; GLUNUKARN, S. S.; MEERATANA, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with White Spot Syndrome Virus. **Diseases of Aquatic Organisms,** 55, 3-10.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J.E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G.L.;

AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T.W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 21, 69-77.

XU, W-J; PAN, L-Q. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. **Aquaculture**. 413, 117-124.

XUE, Y.; WEI, F.; JIANG, Y.; LI, L.; DONG, S.; TIAN, X. 2019. Transcriptome signatures of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas in response to stress in biofloc culture systems. **Fish & Shellfish Immunology**. 91, 369-375.

YANONG R. P. E. 2013. Biosecurity in Aquaculture. Part 3. In: **Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication N° 4712**. Stoneville, USA.

YAO, D.; RUAN, L.; XU, X.; SHI, H. 2015. Identification of a c-Jun homolog from *Litopenaeus vannamei* as a downstream substrate of JNK in response to WSSV infection. **Developmental & Comparative Immunology**. 49, 282-289.

YEH, S-P.; CHEN, Y-N.; HSIEH, S-L.; CHENG, W.; LIU, C-H. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish and Shellfish Immunology**. 26, 582-588.

ZAR, J. H. 1996. **Biostatistical Analysis**., New Jersey: Prentice Hall. 662p.

ZHANG, B.; LIN, W.; WANG, Y.; XU, R. 2010. Effects of artificial substrates on growth, spatial distribution and non-specific immunity factors of *Litopenaeus vannamei* in the intensive culture condition. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 10, 491-497.

ZHAO, D.; PAN, L. HUANG, F.; WANG, C. WUJIE XU. 2016. Effects of Different Carbon Sources on Bioactive Compound Production of Biofloc, Immune Response, Antioxidant Level, and Growth Performance of *Litopenaeus vannamei* in Zero-water Exchange Culture Tanks. **Journal of the World Aquaculture Society**. 47, 566-576.

### 3- Considerações finais

- O alimento natural presente no BFT, serve como fonte suplementar de nutrientes para o camarão nos primeiros dias de vida, refletindo em desempenho zootécnico superior ao RAC. No entanto, alguns parâmetros podem ser fortemente afetados quando o animal é transferido para outro sistema com dinâmica diferente;
- Há um crescimento na contagem presuntiva total de *Vibrio sp.* nos tratamentos oriundos ou mantidos em BFT;
- O sistema não influenciou os parâmetros hemato-imunológicos, mas a infecção viral resultou na diminuição da quantidade de células imunocompetentes;
- Todos os animais desafiados por WSSV foram infectados, embora maior concentração de lesões sugestivas (significativamente maiores tanto em tamanho, quanto em quantidade dos nódulos identificados) tenham sido registradas em animais oriundos ou mantidos em BFT, indicando o claro efeito do sistema nos animais.
- Embora não tenha sido avaliado um cenário de co-infecção por WSSV e *Vibrio sp.* no presente estudo, a possibilidade de sua ocorrência resultaria na potencialização da infecção por WSSV, especialmente no sistema com BFT, considerando as altas concentrações vibrionáceas contabilizadas.

4- Referências

ABREU, J. L.; BRITO, L. O.; LIMA, P. C. M.; SILVA, S. M. B. C. D.; SEVERI, W.; GÁLVEZ, A. O. 2019. Effects of addition of *Navicula* sp.(diatom) in different densities to postlarvae of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system: Growth, survival, productivity and fatty acid profile. **Aquaculture Research**, 50, 2231-2239.

AHMAD, I.; VERMA, A. K.; RANI, A. M. B.; RATHORE, G.; SAHARAN, N.; GORA, A. H. 2016. Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeorohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources. **Aquaculture**. 457, 61-67.

ARAÚJO, A. M. M. 2015. Análise das Práticas de Gestão Ambiental e seus Impactos sobre a Produtividade da Carcinicultura na Ceará. 77p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2015.

AVNIMELECH, Y. 2009. Biofloc technology: A Practical Guide Book. Louisiana:**The World Aquaculture Society**.182p.

AVNIMELECH Y. 2012. Biofloc Technology: A Practical Guide Book. Louisiana: **World Aquaculture Society**. 2, 48.

BACHERE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; LORGERIL, J., GARNIER, J.; ROMESTAND, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*.**Immunological Reviews**, 198, 149-168.

BALLESTER, E. L. C.; ABREU, P. C.; CAVALLI, R. O; EMERENCIANO, M.; ABREU, L.; WASIELESKY, W. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeuspaulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. **Aquaculture Nutrition**. 16, 163-172.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. 1976. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: **Livros técnicos e científicos**. 327p.

BECERRIL-CORTÉS, D.; MONROY-DOSTA, M. D. C.; EMERENCIANO, G. C.; CASTRO-MEJÍA, G.; SOFIA, B.; BERMÚDEZ, S.; CORREA, G. V. 2018. Effect on Nutritional Composition of Produced Bioflocs with Different Carbon Sources (Molasses, Coffee Waste and Rice Bran) in Biofloc System. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. 6. 541-547.

BRITO, L. O.; SANTOS, I. G. S.; ABREU, J. L.; ARAUJO, M. T.; SEVERI, W.; GALVEZ, A. O. 2016. Effect of the addition of diatoms (*Navicula* spp.) and rotifers (*Brachionus plicatilis*) on water quality and growth of the *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, 47, 3990-3997.

BURGENTS, J. E., BURNETT, K. G.; BURNETT, L. E. 2005. Effects of hypoxia and hypercapnic hypoxia on the localization and the elimination of *Vibrio campbellii* in *Litopenaeus vannamei*, the Pacific white shrimp. **The Biological Bulletin**. 208, 159-168.

CARDONA, E.; SAULNIER, D.; LORGEUX, B.; CHIM, L.; GUEGUEN, Y. 2015. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. **Fish & Shellfish Immunology**. 45, 933-939.

CELI, M.; FILICIOTTO, F.; PARRINELLO, D.; BUSCAINO, G.; DAMIANO, M. A.; CUTTITA, A.; D'ANGELO, S.; MAZZOLA, S.; VAZZANA, M. 2013. Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. **The Journal of Experimental Biology**. 216, 709-718.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAMPAIO, S. S. 2009. Vibrio em amostras de água de viveiros de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Ceará-Brazil. **Atlântica**. v. 31, pp. 177-182.

DE SCHRYVER, P.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P.

2012. Managing the microbiota in aquaculture systems for disease prevention and control. In: AUSTIN, B. Infectious disease in aquaculture: prevention and control. Cambridge: **Woodhead Publishing Ltd.** 394-418.

DURAND, S. V.; LIGHTNER, D. V. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of whitespot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases.** 25, 381–389.

EBELLING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. 2006. Análise de engenharia da estequiometria do controle fotoautotrófico, autotrófico e heterotrófico do nitrogênio amoniacal em sistemas de produção aquícola. **Aquaculture**, 257, 346-358.

EKASARI, J.; AZHAR, M. H.; SURAWIDJAJA, E. H.; NURYATI, S.; DE SCHRYVER, P.; BOSSIER, P. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology.** 41, 332-339.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. 2013. Biofloc Technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. **Journal World Aquaculture Society.** 1, 301-328.

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; GOGUENHEIM, J.; GAXIOLA, G. 2012. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture Research.** 44, 75-85.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the sustainable development goals. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nation.** 227p.

FERREIRA, G. S.; BOLÍVAR, N. C.; PEREIRA, S. A.; GUERTLER, C.; VIEIRA, F. V.; MOURINO, J. L. P.; SEIFFERT, W. Q. 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.** 448, 273-279.

FLEGEL, T. W.; NIELSEN, L.; THAMAVIT, V.; KONGTIM, S.; PASHARAWIPAS, T. 2004. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest **Aquaculture**, 240, 55-68.

FLEGEL, T. W.; SRITUNYALUCKSANA, K. 2011. Shrimp molecular responses to viral pathogens. **Marine Biotechnology**. 13, 587-607.

FÓES, G.K.; FRÓES, C.; KRUMMENAUER, D.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. 2011. Nursery of pink shrimp *Farfantepenaeuspaulensis* in biofloc technology culture system: survival and growth at different stocking densities. **Journal of Shellfish Research**. 30, 1-7.

GAONA, C. A. P.; SERRA, F. P.; FURTADO, P. S.; POERSCH, L. H.; WASIELESKY JR, W. 2016. Biofloc management with different flow rates for solids removal in the *Litopenaeus vannamei* BFT culture system. **Aquaculture International**. 24, 1263-1275.

GÓMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F.; INGLIS, V.; GUERRA-FLORES, A. L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 163, 1-9.

GUEMEZ-SORHOUE, E.; VILLARREAL, H.; RACOTTA, I. S.; NARANJO, J.; MERCIER, L. 2019. Zootechnical and physiological responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae reared in bioflocs and subjected to stress conditions during nursery phase. **Aquaculture Research**. 50, 1198-1211.

GUERRELHAS, A.C. B.; TEIXEIRA, A. P. G. 2012. Panorama da situação da mancha branca no Nordeste. **Revista Panorama da Aquicultura**. 22, 38-41.

GUERTLER, C.; RIEG, T.; MEJÍA-RUIZ, C. H.; LEHMANN, M.; BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M. 2013. Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 48, 983-990.



HOSTINS, B.; LARA, G.; DECAMP, O.; CESAR, D. E.; WASIELESKY, W. 2017. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**. 480, 58-64.

JANG, I. K.; QIAO, G.; KIM, S-K. 2014. Effect of multiple infections with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio anguillarum* on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (L.): mortality and viral replication. **Journal of Fish Diseases**, 37, 911-920.

KIM, S. K.; PANG, Z.; SEO, H. C.; CHO Y. R.; SAMOCHA, T.; JANG, I. K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**. 45, 362-371.

KOBAYASHI, T.; ENOMOTO, S.; SAKAZAKI, R. e KUWAHARA, S. 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). **Japanese Journal of Bacteriology**. 18, 387p.

LARA, G.; HOSTINS, B.; BEZERRA, A.; POERSCH, L.; WASIELESKY, W. Jr. 2017. The effects of different feeding rates and re-feeding of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc culture system. **Aquacultural Engineering**, 77, 20-26.

LIGHTNER, D.V. 1996. Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge: **World Aquaculture Society**. 304p.

LO, C. F.; LEI, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; KOU, G. H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**. 25, 133-141.

MAGANA-GALLEGOS, E; GONZALEZ-ZÚÑIGA, R.; CUZON, G.; AREVALO, M.; PACHECO, E.; VALENZUELA, M. A. J.; GAXIOLA, G.; CHAN-VIVAS, E.; LÓPEZ-AGUIAR, K.; NORENA-BARROSO, E. 2018. Nutritional contribution of

biofloc within the diet of growout and broodstock of *Litopenaeus vannamei*, determined by stable isotopes and fatty acids. **Journal of the World Aquaculture Society**. 49, 919-932.

MARTINS, C. I. M.; EDING, E. H.; VERDEGEM, M. C. J.; HEINSBROEKA, L. T. N.; SCHNEIDER, O.; BLANCHETON, J. P.; ROQUE d'ORBCASTELD, E.; VERRETH, J. A. J. 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: a perspective on environmental sustainability. **Aquacultural Engineering**. 43, 83-93.

MARTIN, G. G.; QUINTERO, M.; QUIGLEY, M.; KHOSROVIAN, H. 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**. 20, 209-217.

MOSS, K. K.; MOSS, S. M. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal World Aquaculture Society**. 35, 536-542.

MULLER, I. C.; ANDRADE, T. P.; TANG-NELSON, K. F.; MARQUES, M. R.; LIGHTNER, D. V. 2010. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**. 88, 91-98.

NEVES S. R. A. 2018. O programa de saúde nas fazendas de camarão (psf\_camarão) e os seus impactos sobre os desempenhos produtivos e econômicos na carcinicultura familiar do baixo Rio Pirangi, Ceará, Brasil. 101p. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal do Ceará, Ceará.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. 2016. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da ABCC**. 18, 30-36.

PANG, H.; WANG, G.; ZHOU, S.; WANG, J.; ZHAO, J.; HOARE, R.; MONAGHAN, S. J.; WANG, Z.; SUN, C. 2019. Survival and immune response of

white shrimp *Litopenaeus vannamei* following single and concurrent infections with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**. 92, 712-718.

PANIGRAHI, A.; SARANYA, C.; SUNDARAM, M.; VINOTH KANNAN, S. R.; DAS, R. R.; SATISH KUMAR, R.; RAJESH, P.; OTTA, S. K. 2018. Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. **Fish Shellfish Immunology**. 81, 329-337.

PANIGRAHI, A.; SUNDARAM, M.; JEBHA, J.; SYAMADAYAL, J.; OTTA, S. K.; BHUVANESHWARI, T.; SARASWATHY, R.; SHYNE ANAND, P.S.; RAJABABU, D.; SARANYA, C.; GOPAL, C.; RAVICHANDRAN, P. 2017. Biofloc based nutrient dense culture system for nursery and grow out farming of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. **Indian Journal of Fisheries**. 64, 22-32.

PANIGRAHI, A.; SUNDARAM, M.; SARANYA, C.; SAMBID, S.; DASH, R. R.; SYAMA DAYAL, J. 2019. Carbohydrate sources differentially influence growth performances, microbial dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under biofloc system. **Fish and Shellfish Immunology**. 86, 1207-1216.

PANTOJA, C.; LIGHTNER, D. V. 2014. Enfermedades virales. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Rep. de Panamá: **Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA)**. 99-164.

PEIXOTO, S.; SILVA, E.; COSTA, C. B.; NERY, R. C.; RODRIGUES, F.; SILVA, J. F.; BEZERRA, R.; SOARES, R. 2018. Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. **Aquaculture Nutrition**. 24, 579-585.

PÉREZ, F.; VOLCKAERT, F. A.; CALDERÓN, J. 2005. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**. 250, 586-591.

PHUOC, L. H.; CORTEEL, M.; THANH, N. C.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M.; ALDAY-SANZ, V.; VAN DEN BROECK, W.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. 2009. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio spp.* on co-infection with White Spot Syndrome Virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 290, 61-68.

QIAO, G., XU, D. H., WANG, Z.; JANG, I. K.; QI, Z.; ZHANG, M.; KIM, S. K. 2015. Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**. 44, 257–264.

RAY, A. J.; SEABORN, G.; VINATEA, L.; BROWDY, C.L.; LEFFLER, J. W. 2012. Effects of biofloc reduction on microbial dynamics in minimal-exchange, superintensive shrimp, *Litopenaeus vannamei*, culture systems. **Journal World Aquaculture Society**. 43, 790-801.

REIS, W. G.; WASIELESKY, W.; ABREU, P. C.; BRANDAO, H.; KRUMMENAUER, D. 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. **Aquaculture**. 508, 19-29.

ROCHA, I. P. 2015. Dimensão da cadeia produtiva da carcinicultura brasileira. In: **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão-ABCC**, Natal - RN, 101-103.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI E. F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.

SAMOCHA, T. M. PRANGNELL, D. I.; HANSON, T. R.; TREECE, G. D.; MORRIS, T. C.; CASTRO, L. F.; STARESINIC, N. 2017. Projeto e operação de sistemas superintensivos e dominados por bioflocos para a produção de camarões brancos do Pacífico *Litopenaeus vannamei*: A experiência de pesquisa Texas A & M AgriLife. Louisiana: **The World Aquaculture Society**. 368p.

SAMOCHA, T. M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A. M.; BURGER, J. M.; ALMEIDA, R. V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D. L. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Engineering**. 36, 184-191.

SARATHI, M.; SIMON, M. C.; VENKATESAN, C.; HAMEED, A. S. 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. **Marine Biotechnology**. 10, 242-249.

SCHVEITZER, R.; ARANTES, A. R.; BALOIA, M.; COSTÓDIO, P. F. S.; ARANAA, V. L.; SEIFFERT, W. Q.; ANDREATTA, E. R. 2013. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc system) at different stocking densities: effects on microbial activity, water quality and production rates. **Aquacultural Engineering**. 55, 93-103.

SEIFFERT, W.; WINCKLER, S.; MAGGIONI, D. 2005. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista da ABCC**. 1, 34-36.

SELVIN J. L.; LIPTON A. P. 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 57, 147-150.

SILVA, S. M. B. C.; LAVANDER, H. D.; LUNA, M. M. S.; SILVA, A. O. M. E., GÁLVEZ, A. O.; COIMBRA, M. R. M. 2015. *Artemia franciscana* as a vector for Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology**. 126, 1-5.

TACON, A. G. J. 2019. Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000-2017. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**. 28, 43-56.

THITAMADEE, S.; PRACHUMWAT, A.; SRISALA, J.; JAROENLAK, P.; SALACHAN, P. V.; SRITUNYALUCKSANA, K.; FLEGEL, T. W.; ITSATHITPHAISARN, O. 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**. 452, 69-87.

VADSTEIN, O.; BERGH, O.; GATESOUBE, F.J.; GALINDO-VILLEGAS, J.; MULERO, V.; PICCHIETTI, S.; GIUSEPPE SCAPIGLIATI, G.; MAKRIDIS, P.; OLSEN, Y.; DIERCKENS, K.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; DE SCHRYVER, P.; BOSSIER, P. 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. **Reviews In Aquaculture**. 5, S1-S25.

VALENTE, C. S.; ORTIZ, K. O.; DEPPERSCHMIDT, R.; FRAGA, A. P. M.; VIEIRA, F. N.; MARQUES, M. R. F. 2019. Transcription of defense related genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, kept in biofloc and in clear seawater and challenged with the white spot syndrome virus. **Aquaculture International**. 1-15.

VAN DE BRAAK, C. B. T.; BOTTERBLOM, M. H. A.; HUISMAN, E. A.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VAN DER KNAAP, W. P. W. 2002. Preliminary study on haemocyte response to White Spot Syndrome Virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 51, 149-155.

WONGPRASERT, K.; KHANOBDEE, K.; GLUNUKARN, S. S.; MEERATANA, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with White Spot Syndrome Virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, 55, 3-10.

VAN WYK, P. 1999. Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. In: VAN WYK, P.; DAVIS-HODGKINS, M.; LARAMORE, R.; MAIN, K. L.; MOUNTAIN, J.; SCARPA, J. **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems**. Florida: Department of Agriculture and Consumer Services - Harbor Branch Oceanic Institute, 125-140.

VERBRUGGEN, B.; BICKLEY L. K.; AERLE, R. V.; BATEMAN, K. S.; STENTIFORD, G. D.; SANTOS, E. M.; TYLER, C. R. 2016. Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. **Viruses**. 8, 23.

VICENTE, D. N.; MELLO, F. A.; SILVA, R. C. R. 2016. Carcinicultura Brasileira: Impactos e ações mitigadoras. *Colloquium Agrariae*. 12, 58-61.

WANG, Y.T.; LIU, W.; SEAH J.N.; LAM, C. S.; XIANG, J.H.; KORZH, V. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 52, 249-259.

WASIELESKY, W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C. L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. 258, 396-403.

WASIELESKY, W.; FROES, C.; FÓES, G.; KRUMMENAUER, D.; LARA, G.; POERSCH, L. 2013. Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: The Effect of Stocking Densities and Compensatory Growth. **Journal of Shellfish Research**. 32, 799-806.

WONGPRASERT, K.; KHANOBDEE, K.; GLUNUKARN, S. S.; MEERATANA, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with White Spot Syndrome Virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, 55, 3-10.

WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J. E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G. L.; AKARAJAMORN, A.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; TASSANAKAJON, A.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T. W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 21, 69-77.

XU, WJ.; PAN, LQ. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. **Aquaculture**. 412-413, 117-124.

XUE, Y.; WEI, F.; JIANG, Y.; LI, L.; DONG, S.; TIAN, X. 2019. Transcriptome signatures of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas in

response to stress in biofloc culture systems. **Fish & Shellfish Immunology**. 91, 369-375.

YANONG R. P. E. 2013. Biosecurity in Aquaculture. Part 3. In: **Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication N°. 4712**. Stoneville, USA.

YAO, D.; RUAN, L.; XU, X.; SHI, H. 2015. Identification of a c-Jun homolog from *Litopenaeus vannamei* as a downstream substrate of JNK in response to WSSV infection. **Developmental & Comparative Immunology**. 49, 282-289.

YEH, S-P.; CHEN, Y-N.; HSIEH, S-L.; CHENG, W.; LIU, C-H. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish and Shellfish Immunology**. 26, 582-588.

ZAR, J. H. 1996. **Biostatistical Analysis.**, New Jersey: Prentice Hall. 662p.

ZHANG, B.; LIN, W.; WANG, Y.; XU, R. 2010. Effects of artificial substrates on growth, spatial distribution and non-specific immunity factors of *Litopenaeus vannamei* in the intensive culture condition. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 10, 491-497.

ZHAO, D.; PAN, L. HUANG, F.; WANG, C. WUJIE XU. 2016. Effects of Different Carbon Sources on Bioactive Compound Production of Biofloc, Immune Response, Antioxidant Level, and Growth Performance of *Litopenaeus vannamei* in Zero-water Exchange Culture Tanks. **Journal of the World Aquaculture Society**. 47, 566-576.