

JOANA ANGELICA LYRA VOGLEY DE CARVALHO

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS PARA
APLICAÇÃO NO CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

RECIFE,

2016



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

**SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS PARA
APLICAÇÃO NO CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

Joana Angelica Lyra Vogeley de Carvalho

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

Prof. Dr. SILVIO R. MAURANO PEIXOTO
Orientador

Recife,
Março/2016

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

SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS PARA
APLICAÇÃO NO CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

Joana Angelica Lyra Vogeley de Carvalho

Tese julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 31/03/2016 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof. Dr. SILVIO RICARDO MAURANO PEIXOTO
(Orientador)

Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. RANILSON DE SOUZA BEZERRA
Departamento de Bioquímica e Biofísica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. JOSÉ VITOR LIMA MOREIRA FILHO
Departamento de Biologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Profa. Dra. MARIA RAQUEL MOURA COIMBRA
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. ALFREDO OLIVERA GÁLVEZ
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dedicatória

Aos meus pais. De sangue ou não.

Ao meu esposo.

Aos meus irmãos. À minha família. Aos meus amigos.

Aos que tem sede de conhecimento: a única coisa que
levamos conosco.

Agradecimentos

- ✓ A Deus. Pela força. Pela intuição;
- ✓ Ao meu esposo, parceiro, amigo, dupla, amor, Freddy Vogeley. Pela paciência, amor e perseverança desde a graduação;
- ✓ A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo acolhimento e por revelar-me novos horizontes;
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura pela oportunidade;
- ✓ Aos professores do programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da UFRPE pelos conhecimentos compartilhados;
- ✓ Ao estimado orientador Professor Sílvio Peixoto pela paciência, experiência e oportunidade. Obrigada!;
- ✓ A querida Professora Roberta Soares pela atenção de sempre;
- ✓ Ao Professor Emanuell Felipe, amigo e parceiro da escola da vida, por tudo, por todo o tempo;
- ✓ Ao Professor Diego Buarque pelo precioso tempo, empenho e dedicação à pesquisa;
- ✓ As Professoras Raquel Coimbra e Suzianny Cabral pela inestimável atenção, confiança e contribuição quando mais precisei;
- ✓ Aos Professores Alfredo Galvez, Ranilson Bezerra e José Vitor Lima pela indispensável contribuição à minha formação;
- ✓ Aos inesquecíveis Professores da área técnica do curso de Engenharia de Pesca;
- ✓ A incrível equipe e família do Laboratório de Tecnologia em Aquicultura (LTA/UFRPE). Sem vocês, nada disso seria possível!;
- ✓ A carinhosa equipe do Laboratório de Genética Aplicada (LAGA/UFRPE);
- ✓ A atenciosa equipe do Laboratório de Enzimologia (LABENZ/UFPE);
- ✓ A prestativa e parceira equipe do Laboratório de Piscicultura Marinha (UFRPE);
- ✓ A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelos recursos destinados ao Projeto de Pesquisa;
- ✓ Ao CNPq pela bolsa de doutorado e pelos recursos destinados ao Projeto de Pesquisa.

Resumo

O objetivo desse estudo foi selecionar *Bacillus* de camarões selvagens para uso como probiótico na carcinicultura. *Bacillus circulans* e *Bacillus subtilis* foram isolados do intestino de *Farfantepenaeus subtilis* e demonstraram antagonismo contra *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Vibrio mimicus* em testes *in vitro*. Posteriormente, essas bactérias inibiram *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (VP) em uma ampla faixa de pH e salinidade e produziram lipase, amilase e protease *in vitro*, demonstrando que esses *Bacillus* possuíam características requeridas para experimentos *in vivo*. Então, juvenis de *Litopenaeus vannamei* foram cultivados com as dietas: ração + *B. subtilis* (BS); ração + *B. circulans* (BC) e ração sem bactérias (Controle). A cada 15 dias, amostras foram coletadas para quantificação bacteriana e de atividade enzimática. Ao final de 45 dias, o peso dos camarões alimentados com BS e BC foi significativamente maior comparados ao grupo controle. Houve um significativo aumento de *Bacillus* spp. e redução de *Vibrio* spp. no intestino e hepatopâncreas, sobretudo após 30 e 45 dias. As atividades da tripsina, quimotripsina, lipase e amilase aumentaram significativamente nos camarões alimentados com BC e BS, principalmente após 30 dias. Após 60 dias, a expressão de genes do sistema imunológico (proPO, LGBP e HEM) aumentou significativamente nos camarões alimentados com BS e BC. Adicionalmente, os camarões foram infectados (injeção) e desafiados (água) com VP. A sobrevivência dos camarões alimentados com BC foi significativamente maior após infecção e não houve diferenças após desafio. A expressão da proPO não diferiu entre as dietas após infecção e desafio. Houve uma redução de *Vibrio* spp. e significativo aumento de *Bacillus* spp. no intestino dos camarões alimentados com BC e BS após desafio. Durante todo o período experimental, o aumento de *Bacillus* nos camarões alimentados com BC e BS sugere que houve colonização no trato digestório de *B. circulans* e *B. subtilis*. Isso pode ter incrementado a atividade enzimática, melhorando a digestão e ganho de peso, reduzido *Vibrio* spp. e aumentado a expressão de genes do sistema imunológico, tornando os camarões mais resistentes ao VP (dieta BC). Assim, *B. circulans* e *B. subtilis* apresentam potencial para utilização como probiótico na carcinicultura.

Palavras-chave: Carcinicultura, *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., atividade enzimática, expressão genética.

Abstract

This study focused on selecting wild shrimp *Bacillus* for a probiotics use in shrimp farming. *Bacillus circulans* and *Bacillus subtilis* were isolated from the *Farfantepenaeus subtilis* intestine and have showed antagonism against *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio mimicus* in *in vitro* tests. Afterwards, these bacteria inhibited *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (VP) in a wide pH and salinity range and produced lipase, amylase and protease *in vitro* showing that these *Bacillus* had the needed requirements for *in vivo* experiments. Thus, juveniles of *Litopenaeus vannamei* were grown according to the following diet: feed + *B. subtilis* (BS); feed + *B. circulans* (BC) and feed without bacteria (Control). Every 15 days samples were collected in order to quantify the bacteria and enzyme activity. After 45 days, the shrimp's weight fed with BS and BC was significantly higher when compared to the control group. There was a significant increase in *Bacillus* spp. and a *Vibrio* spp. reduction in the intestine and hepatopancreas, especially after the 30th and 45th day mark. The trypsin, chymotrypsin, lipase and amylase also had significant increase in shrimp fed with BC and BS, especially after the 30th day mark. After 60 days, the immune system gene expression (proPO, LGBP and HEM) increased significantly in the shrimp fed with BS and BC. In addition to these experiments, the shrimp were infected (by injection) and challenged (water) against VP. The shrimp fed with BC diet had significantly higher survival rates after the injection and there were no differences after the challenge. The proPO expression did not differ between diets after infection or challenge. There was a *Vibrio* spp. reduction and a significant *Bacillus* spp. increase in the shrimps' intestines which were fed with BC and BS diets after the challenge. The *Bacillus* spp. increase in shrimp fed with BC and BS diets suggest that there was colonization in the gastrointestinal tract during all the experimental period. This may have increased the enzyme activity improving digestion and weight gain, reduced the *Vibrio* spp. and increased the immune system gene expression, making the shrimp more resistant to infection (BC diet). Thus, *B. circulans* and *B. subtilis* have showed the potential for its application as probiotics in shrimp farming.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., enzyme activity, immunology.

Lista de figuras

Página

Artigo 1

Figura 1. Previsões dos diâmetros médios de halos de inibição (mm) do modelo polinomial de análise de antagonismo de *B. circulans* (A), *B. subtilis* (B) e Probiótico Comercial (C) contra *V. parahaemolyticus*..... 46

Artigo 2

Figura 1. Atividade proteolítica total (proteases inespecíficas) no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$)...... 77

Figura 2. Atividade da enzima tripsina no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$)...... 78

Figura 3. Atividade da enzima quimotripsina no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$)...... 79

Figura 4. Atividade da enzima lipase no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias.

Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$)..... 80

Figura 5. Atividade da enzima amilase no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$)..... 81

Artigo 3

Figura 1. PCR em tempo real da expressão relativa do gene pró-fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados durante 60 dias com as dietas C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas..... 112

Figura 2. PCR em tempo real da expressão relativa do gene LGBP na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados durante 60 dias com as dietas C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas..... 113

Figura 3. PCR em tempo real da expressão relativa do gene Hemocianina (HEM) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados durante 60 dias com as dietas C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas..... 114

Figura 4. Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* durante 96h de infecção

com *Vibrio parahaemolyticus* via injeção, onde BC = ração + *Bacillus circulans*, BS = ração + *Bacillus subtilis* e C = ração sem adição de bactérias.... 115

Figura 5. Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* após 10 dias de desafio com *Vibrio parahaemolyticus* via água, onde BC = ração + *Bacillus circulans*, BS = ração + *Bacillus subtilis* e C = ração sem adição de bactérias..... 116

Figura 6. PCR em tempo real da expressão relativa do gene pró-fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* após 24h de infecção com *Vibrio Parahaemolyticus* via injeção, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a media (n = 3) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas..... 117

Figura 7. PCR em tempo real da expressão relativa do gene pró-fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de *L. Vannamei* após 24h de desafio com *V. Parahaemolyticus* via água, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a media (n = 3) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas..... 118

Figura 8. Concentração de *Bacillus* spp. e *Vibrio* spp. no intestino de *Litopenaeus vannamei* após 10 dias de desafio com *Vibrio parahaemolyticus* via água, onde BS = ração + *Bacillus subtilis*, BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias..... 119

Lista de tabelas

Página

Artigo 1

Tabela 1. Médias do diâmetro (mm) do halo de inibição promovido por *B. subtilis*, *B. circulans* e o Probiótico Comercial contra diferentes espécies de *Vibrio*..... 44

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros do modelo quadrático polinomial para o efeito antagonista de *B. circulans* (BC), *B. subtilis* (BS) e o Probiótico Comercial (PC) contra *V. parahaemolyticus*, sob diferentes condições de cultivo..... 45

Artigo 2

Tabela 1. Crescimento e sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* (média $\pm$ EP) alimentados durante 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias..... 74

Tabela 2. Log de *Bacillus* spp. (Média $\pm$ EP) no intestino, hepatopâncreas e fezes de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias..... 75

Tabela 3. Log de *Vibrio* spp. (Média $\pm$ EP) no intestino, hepatopâncreas e fezes de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias..... 76

Artigo 3

Tabela 1. Primers específicos utilizados para quantificação relativa de genes

associados ao sistema imunológico de <i>Litopenaeus vannamei</i>	110
--	-----

Tabela 2. Crescimento e sobrevivência de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado durante 60 dias com <i>Bacillus subtilis</i> (BS) e <i>Bacillus circulans</i> (BC) adicionados à dieta.....	111
--	-----

Sumário

	Página
Dedicatória	I
Agradecimento	II
Resumo	III
Abstract	IV
Lista de figuras	V
Lista de tabelas	VIII
1- Introdução	2
2- Revisão de literatura	4
3- Referência bibliográfica	14
4- Artigos científicos	
4.1- Artigo científico I: Produção de enzimas digestivas e antagonismo contra <i>Vibrio</i> spp. de linhagens de <i>Bacillus</i> spp. candidatos a probiótico para utilização na carcinicultura.....	21
4.1.1- Normas da Revista <i>Journal of Shellfish Research</i>	47
4.2- Artigo científico II: Efeito da suplementação da dieta de juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i> com <i>Bacillus circulans</i> e <i>Bacillus subtilis</i> na atividade de enzimas digestivas e na comunidade de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Vibrio</i> spp. do trato digestório dos camarões.....	50
4.2.1- Normas da Revista <i>Aquaculture Nutrition</i>	82
4.3- Artigo científico III: Efeito da suplementação da dieta de <i>Litopenaeus vannamei</i> com <i>Bacillus</i> spp. isolados do intestino de camarões selvagens na modulação de genes associados ao sistema imunológico e na resposta à infecção e desafio com <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	85
4.3.1- Normas da Revista <i>Fish and Shellfish Immunology</i>	120

1- Introdução

Apesar do potencial da carcinicultura marinha, atualmente a atividade enfrenta uma desaceleração do crescimento devido ao aumento de doenças causadas por vírus ou bactérias (WONGSASAK et al., 2015). Diante desse cenário, a prevenção de doenças é, atualmente, o maior desafio da carcinicultura. Entre os microrganismos responsáveis por surtos de doenças, bactérias do gênero *Vibrio* estão frequentemente associadas a infecções e altas taxas de mortalidade no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (KUMAR et al., 2014; LOMELI-ORTEGA et al., 2014).

O controle de *Vibrio* spp. na aquicultura de forma a evitar o surgimento de doenças tem resultado no uso abusivo de drogas antimicrobianas (antibióticos) que pode resultar em um aumento da resistência de linhagens potencialmente patogênicas dessas bactérias (ESIOBU et al., 2002). Dessa forma, um método alternativo, em detrimento do uso de antibióticos em sistemas de aquicultura, é a aplicação de probióticos que são definidos como um conjunto de microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (REID et al., 2003). Assim, a suplementação da dieta com microrganismos é um novo enfoque para alcançar benefícios imunológicos e nutricionais para os camarões cultivados (MOHAPATRA et al., 2012; NEWAJ-FYZUL et al., 2014).

Vários benefícios são atribuídos ao uso de probióticos como o incremento do estado nutricional dos animais através da produção de enzimas digestivas, a melhora do sistema imunológico do hospedeiro e a redução da incidência de patógenos através do mecanismo de exclusão competitiva (VERSCHUERE et al., 2000; VINE et al., 2006). Entre as bactérias com potencial para uso na carcinicultura, o gênero *Bacillus* destaca-se devido à capacidade de produção de compostos antibióticos contra patógenos e competição por espaço e nutrientes, secreção de enzimas e promoção de um incremento

na resposta imunológica dos camarões (MORIARTY, 1998). Pesquisas demonstram que espécies de *Bacillus* quando adicionadas ao cultivo através da água ou do alimento, promovem nos camarões cultivados os benefícios atribuídos ao uso de probióticos (LI et al., 2009, TSENG et al., 2009; NIMRAT et al., 2012; ZOKAEIFAR et al., 2014).

A seleção de bactérias probióticas para utilização no cultivo de camarões normalmente é realizada através de testes realizados *in vitro* que avaliam a capacidade desses microrganismos inibirem o crescimento de patógenos e produzirem enzimas digestivas (VASEEHARAN e RAMASAMY, 2003; JANARTHANAM et. al., 2012). Alguns autores sugerem o isolamento de bactérias do ambiente no qual o animal está inserido ou do próprio hospedeiro (DEFOIRDT et al., 2007), uma vez que as candidatas não devem ser patogênicas e devem ser capazes de sobreviver e crescer no local onde são aplicados enquanto exercerem os seus efeitos benéficos (GOMEZ-GIL et al., 2000; BALCÁZAR et al., 2007; TINH et al., 2008). Assim, o isolamento de bactérias do trato digestório de camarões selvagens da costa Nordeste do Brasil pode ser uma alternativa promissora para encontrar probióticos para carcinicultura marinha.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi selecionar *Bacillus* spp. do trato digestório de camarões selvagens com potencial para uso como probiótico na carcinicultura marinha, através da realização de ensaios *in vitro* de antagonismo contra espécies de *Vibrio* e de produção de enzima, bem como avaliar os possíveis benefícios atribuídos ao conceito de probiótico nos camarões cultivados (*in vivo*) com dietas suplementadas com os *Bacillus* selecionados.

Revisão de literatura

Na década de 90, o cultivo de camarões marinhos apresentou um período de rápido crescimento no Brasil, alcançando a maior produção registrada no país com um total de 90.190 ton em 2003, onde a região Nordeste foi responsável por 95,2% dessa produção (ROCHA, 2007). Nos anos seguintes houve uma brusca queda nessa produção devido a alguns fatores como a desvalorização do dólar e, sobretudo, a ocorrência de enfermidades que são consideradas como uma das principais causas de queda na produção de camarões (MOSS, 2002; MADRID, 2005).

De acordo com último Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013), a aquicultura marinha respondeu por aproximadamente 6% do total da produção de pescados no Brasil no ano de 2011, onde a carcinicultura foi responsável por 78% dessa produção (65.670,6 ton). No entanto, apesar do potencial nacional para a atividade, houve uma queda de 5,4% na produção da carcinicultura em relação à estatística do ano anterior. Além de fatores econômicos, a ocorrência de enfermidades tem comprometido a cadeia de produção de camarões marinhos tanto no Brasil como em todo o mundo, resultando em redução na produção (WONGSASAK et al., 2015).

As enfermidades que comprometem a cadeia produtiva de camarões marinhos podem ser virais ou bacterianas. Entre as doenças virais, o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) foi o principal responsável pelo declínio da produção nacional a partir de 2004. Além do IMNV, outras doenças como a Síndrome de Taura (Taura Syndrome Virus – TSV), a doença da cabeça amarela (Yellow Head Virus – YHV) e a doença da mancha branca (White Spot Syndrome Virus – WSSV) podem ocasionar perda total da produção (MADRID, 2005).

Entre as doenças bacterianas, destacam-se aquelas causadas por bactérias do gênero *Vibrio*. Em vários países, a carcinicultura vem sofrendo com a incidência desses

patógenos oportunistas que são frequentemente associados com baixas taxas de sobrevivência em larviculturas ou sistemas de engorda (SAULNIER et al., 2000). Desde a década de 90, mortalidades são associadas à presença de diferentes espécies de *Vibrio* e foram relatadas para *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei* na Indonésia, Tailândia, Índia, Filipinas, Austrália, Taiwan e Equador (KARUNASAGAR et al., 1994; BATICADOS et al., 1990; LAVILLA-PITOGO et al., 1990; PIZZUTTO e HIRST, 1995; SONG e LEE, 1993; LIU et al., 1996; ROBERTSON et al., 1998). Recentemente, a indústria do cultivo de camarão da Ásia foi afetada pela Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), também conhecida como Síndrome da Necrose Aguda do Hepatopâncreas (AHPNS), onde a bactéria causadora da doença foi identificada como um *Vibrio parahaemolyticus* capaz de produzir uma toxina responsável pela patologia primária nos camarões infectados (TRHAN et al., 2013; LOMELÍ-ORTEGA e MARTÍNEZ-DÍAZ, 2014).

Um dos mecanismos de patogenicidade de *Vibrio* spp. está relacionado com alguns produtos extracelulares como proteases, fosfolipases e hemolisinas. Em estudo realizado por Austin e Zhang (2006), a exposição experimental de diferentes espécies de camarões a esses produtos extracelulares resultou em um significativo aumento na taxa de mortalidade dos animais. Além disso, órgãos como hepatopâncreas e brânquias quando infectados por *Vibrio* spp. podem ter suas funções vitais comprometidas, levando o animal a uma consequente morte (ESTEVE e HERRERA, 2000).

Bactérias do gênero *Vibrio* spp. podem atuar tanto como agente primário quanto secundário de infecção. Como agente secundário, esses microrganismos podem atuar de forma oportunista quando os camarões estão imunologicamente comprometidos devido a causas primárias como a presença de outros agentes infecciosos, deficiência nutricional, práticas de manejo e estresse ambiental em decorrência de bruscas

alterações nos parâmetros físico-químicos da água de cultivo (SAULNIER et al., 2000; LIU et al., 2010). Como exemplo, Phuoc et al. (2008) concluíram que em ausência de estresse por exposição a concentrações de amônia, salinidade ou submissão a um período prolongado de fome, as pós-larvas de *L. vannamei* não foram suscetíveis a infecção por diferentes linhagens de *V. campbellii*, *V. harveyi* e *V. penaeicida*.

Em estudo realizado por Li et al. 2010, os animais submetidos a um estresse por baixa salinidade tiveram o sistema imunológico comprometido e tornaram-se mais vulneráveis à infecção por *V. alginolyticus*, uma vez que houve um aumento da mortalidade dos camarões previamente estressados. Em outro estudo, os mesmo autores encontraram uma queda nos parâmetros imunológicos de *L. vannamei* ao expor esses camarões a um estresse por pH alto ou baixo e uma consequente menor resistência ao desafio contra *V. alginolyticus* (LI et al., 2008).

Espécies de *Vibrio* estão abundantemente presentes tanto no ambiente natural quanto no ambiente de cultivo. Essas bactérias podem ser encontradas aderidas a microalgas, no zooplâncton, na comunidade bacteriana do trato digestório dos camarões e no biofilme da parede dos tanques de cultivo (THOMPSON et al., 2004). Dessa forma, a abundância natural de *Vibrio* spp., assim como sua ubiquidade, taxa de multiplicação e habilidade para adaptar-se a mudanças ambientais em sistemas aquícolas, ressaltam a importância da avaliação de seus efeitos patogênicos nos camarões e, sobretudo, do seu controle nos sistemas de aquicultura (SAULNIER et al., 2000).

Diante do exposto, a prevenção de doenças é, atualmente, o maior desafio da carcinicultura (HAMZA et al., 2015). O combate e prevenção às doenças nos camarões cultivados passaram a ser uma prática comum e essencial para a aquicultura. Nesse sentido, os produtores começaram a realizar algumas intervenções no cultivo como o

uso de imunoestimulantes, produtos químicos e, principalmente, antibióticos (PANIGRAHI e AZAD, 2007).

Os antibióticos vêm sendo utilizados na tentativa de prevenir e controlar doenças na aquicultura (GULLIAN et al., 2004; MOHAPATRA et al., 2012). No entanto, o emprego abusivo dessas substâncias tem causado um aumento na resistência de linhagens de patógenas através da transferência de genes de resistência entre essas bactérias (YOUSEFIAN e AMIRI, 2009). Nesse sentido, os probióticos surgiram como uma alternativa ao uso de antibióticos e vêm sendo empregados nos sistemas de aquicultura (NEWAJ-FYZUL et al., 2014), uma vez que a composição microbiana dos organismos aquáticos pode oferecer forte influência no crescimento, imunidade e resistência a doenças (ZHEN et al., 2016).

Algumas definições estão disponíveis para o termo probiótico, entre elas, “suplementos microbianos vivos que têm efeito benéfico ao hospedeiro, através da modificação da comunidade microbiana no hospedeiro ou no ambiente, o que proporciona melhorias na utilização dos alimentos, melhor resposta imunológica a doenças e qualidade de água” (VERSCHUERE et al., 2000). Logo, uma vez administrados, esses microrganismos são capazes de colonizar e se multiplicar no intestino do hospedeiro e proporcionar inúmeros benefícios pela modulação de vários sistemas biológicos do animal (CROSS, 2002). Assim, a manipulação da microbiota intestinal através da suplementação da dieta com microrganismos benéficos (probióticos) é um novo enfoque para a prevenção de doenças e para os aspectos nutricionais dos camarões cultivados (MOHAPATRA et al., 2012).

Diferentes benefícios são mencionados para o uso de probióticos na carcinicultura, como: a eliminação de patógenos através da produção de compostos inibitórios e de competição por nutrientes e locais de adesão; o fornecimento de nutrientes e incremento

da atividade enzimática que resultam em uma melhor nutrição dos animais cultivados; a conversão do material orgânico dissolvido na água de cultivo (biorremediação), contribuindo para uma melhor qualidade de água; e melhora da resposta imunológica (GATESOUBE, 1999; GOMEZ-GIL et al., 2000; IRIANTO e AUSTIN, 2002; BALCAZAR et al., 2006).

Entre as bactérias de interesse para uso como probióticos na aquicultura, as espécies do gênero *Bacillus* se destacam devido a características como a capacidade de controlar a proliferação de *Vibrio* spp., através da produção de compostos inibitórios (antibióticos naturais), competição com patógenos por nutrientes e locais de adesão e secreção de enzimas extracelulares (NINAWA e SELVIN, 2009). O gênero *Bacillus* é facilmente encontrado em sedimentos marinhos e naturalmente presente nas brânquias, cutícula e trato intestinal de organismos bentônicos como os camarões (SHARMILA et al., 1996). Essas bactérias podem ser administradas tanto através do alimento como diretamente na água de cultivo (MORIARTY, 1998), e têm demonstrado atividade inibitória contra espécies de *Vibrio*. Como exemplo, Vaseeharan e Ramasamy (2003) ao avaliarem o antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* BT 23 contra o *V. harveyi* em *P. monodon*, encontraram zonas inibitórias ao redor do crescimento do *Bacillus* de 3 a 6 mm e redução da mortalidade dos camarões em condições *in vivo*, demonstrando que o crescimento dessa espécie patogênica foi controlado.

O mecanismo de exclusão competitiva entre bactérias baseia-se na produção de substâncias primárias ou secundárias (compostos inibitórios) resultantes do metabolismo das células de bactérias probióticas responsáveis pela inibição de patógenos (VINE et al., 2006) que podem ser antibióticos naturais, bacteriocinas, lisozimas, proteases, sideróforos, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos que atuam contra patógenos de diferentes formas (WILLIAMS e VICKERS, 1986; VANDENBERGH, 1993; PYBUS

et al., 1994; PANIGRAHI e AZAD, 2007; TINH et al., 2007, SUGITA et al., 2009). Para que as bactérias probióticas possam exercer antagonismo contra patógenos ou qualquer outro benefício ao hospedeiro, a capacidade de colonização desses microrganismos no intestino do animal é uma característica fundamental. A falta de eficácia dessas bactérias numa condição *in vivo* pode ser resultado da morte da bactéria no trato digestório, da ingestão seletiva do hospedeiro ou eliminação devido a constante evacuação dos animais (RIQUELME et al., 2000). Qualquer inabilidade de competir por locais de adesão e sobreviver no muco da parede do intestino sugere que o probiótico pode não ser capaz de se multiplicar o bastante para compensar a descarga das fezes (VINE et al., 2006).

A competição por espaço para adesão e colonização na parede do intestino é um importante modo de ação contra bactérias potencialmente patógenas, uma vez que quando aderidos os patógenos causam malefícios ao hospedeiro (VINE et al., 2004; RINGO et al., 2007). Em estudo realizado por Luis-Villaseñor et al. (2011), espécies de *Bacillus* adicionadas a água foram capazes de aderir ao muco intestinal de *L. vannamei*, inibir o crescimento de *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbelli*, *V. alginolyticus* e *V. vulnificus* e, ainda, incrementar a sobrevivência e desenvolvimento larval dos camarões. Da mesma forma, Rengpipat et al. (2000) encontraram células viáveis de *Bacillus* S11 no intestino de *P. monodon* após ofertar essa bactéria aos animais através da alimentação.

Ao utilizar *B. subtilis* UTM 126 no controle de *Vibrio* spp., Balcazar et al. (2007), observaram que o mecanismo de ação do probiótico pode ter sido a exclusão competitiva, pois detectaram ao final do estudo a presença de *B. subtilis* no hepatopâncreas de juvenis de *L. vannamei*. A administração de *B. subtilis* através da dieta a juvenis de *L. vannamei* resultou em um aumento significativo da concentração

de *Bacillus* spp. e redução de *Vibrio* spp. no trato digestório dos animais durante o cultivo (ZOKAEIFAR et al., 2014). Silva et al. (2013), encontraram uma redução de *Vibrio* spp. tanto na água quanto em larvas e pós-larvas de *L. vannamei* após inclusão de *Bacillus* spp. no cultivo através da água ou alimento. Ke Li et al. (2007) ao administrar *B. licheniformis* a juvenis de *L. vannamei* encontraram uma quantidade significativamente mais baixa de *Vibrio* spp no trato intestinal desses animais. Ao administrar *B. subtilis* E20 na água de cultivo de larvas e pós-larvas de *L. vannamei*, Liu et al. (2009) encontraram melhor taxa de sobrevivência e desenvolvimento larval e maior inibição do crescimento de espécies de *Vibrio* na água.

De acordo com Decamp e Moriarty (2006), probióticos podem proporcionar um incremento na produção de camarão similar aquele encontrado quando substâncias antimicrobianas como os antibióticos são utilizadas. Rengpipat et al. (2000) demonstraram que é possível aumentar a produção de camarões pela adição de *Bacillus* S11 isolados do habitat natural de *Penaeus monodon* no cultivo dessa espécie, pois o crescimento e a sobrevivência das pós-larvas foram significativamente superiores comparados ao grupo controle. Várias pesquisas demonstram um incremento no crescimento dos camarões após adição de *Bacillus* spp. à dieta (KEYSAMI e MOHAMMADPOUR, 2012; SILVA et al., 2013; ZOKAEIFAR et al., 2014). Esse ganho de peso dos animais pode ser devido à contribuição de enzimas digestivas produzidas pelas bactérias na atividade enzimática do animal (WANG et al., 2007; YU et al., 2008).

Algumas bactérias podem participar do processo digestório dos camarões pela produção de enzimas extracelulares como proteases, amilases e lipases (OCHOA e OLMOS, 2006). A adição de *B. coagulans* ao cultivo de larvas de *L. vannamei* resultou em um aumento da atividade das enzimas lipase, amilase e protease que pode ter

contribuído para uma melhor absorção do alimento e aumento da sobrevivência (ZHOU et al., 2009). Em outro estudo, Wang et al. (2012) concluíram que a adição de *B. coagulans* à dieta de juvenis de *L. vannamei* também resultou em um aumento da atividade das enzimas amilase, lipase e protease e em um significativo ganho de peso dos camarões. Além disso, de acordo com Ziaei-Nejad et al. (2006) a utilização de probióticos pode estimular a atividade de enzimas endógenas do camarão. Nimrat et al. (2013) encontraram um significativo aumento na atividade da tripsina e um maior ganho de peso nos camarões após adicionarem *B. subtilis* à dieta de juvenis de *P. monodon*.

A proteína é o nutriente mais oneroso das rações e um fator limitante do crescimento dos camarões. Assim, a necessidade de altos teores proteicos nas rações faz o gasto com alimentação responder pelo maior custo da produção de camarões (Gimenez et al 2009). Entre proteases específicas, a tripsina e a quimotripsina são consideradas as mais abundantes enzimas proteolíticas dos camarões peneídeos e são responsáveis pela maior parte da digestão das proteínas dos alimentos em camarões peneídeos (LEMOS, 2000; PEREA et al., 2012). Segundo Dall (1992), a tripsina é a enzima mais importante presente nos camarões para digestão de proteínas, uma vez que esta é capaz de hidrolisar de 50% a 60% da proteína consumida pelo animal.

A composição natural da flora bacteriana intestinal de camarões marinhos pode ser modificada pelo fornecimento de bactérias probióticas diretamente na alimentação (ZIAEI-NEJAD et. al., 2006) e esta modificação pode estimular a resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por bactérias patogênicas (RENGPAT et al., 2000). Em estudo realizado por Rengpat et al. (2000), a utilização de *Bacillus* sp. proporcionou uma proteção contra doenças através da ativação das defesas imunológicas humoral e celular no camarão *P. monodon*. Ao administrar *B. subtilis* para juvenis de *L. vannamei*,

Tseng et al. (2009) observaram um incremento da atividade da fagocitose e um aumento na resistência dos camarões contra *V. alginolyticus*. Em estudo realizado por Li et al. (2009), houve uma maior resistência de *L. vannamei* a doença da mancha branca devido a um incremento em diferentes parâmetros imunológicos promovido pela adição de *Bacillus* à dieta dos camarões. A inclusão de *B. subtilis* no cultivo de larvas de *L. vannamei* resultou em um aumento significativo da expressão de genes do sistema imunológico, melhor desenvolvimento, sobrevivência e tolerância ao estresse (Liu et al., 2010).

O sistema imune dos crustáceos está vinculado à hemolinfa, formada de uma fração celular, os hemócitos, e de uma fração líquida, o plasma, onde estão dissolvidos os fatores responsáveis pelas respostas celulares e humorais, respectivamente as quais atuam juntas protegendo os animais de invasões e infecções causadas por patógenos (BACHÈRE, 2000a). O contato com o antígeno ativa os hemócitos e resulta na lise ou degranulação do invasor, liberando uma variedade de efetores imunológicos para o plasma e iniciando a ativação de diferentes mecanismos de defesa (BACHÈRE, 2000b).

Entre os mecanismos de defesa dos camarões está o sistema de ativação da pró-fenoloxidase (sistema proPO), que desencadeia o processo de melanização induzido pela ação da enzima fenoloxidase (PO) em resposta a identificação de intrusos pelos hemócitos (SODERHALL e CERENIUS, 1992; PEZZAROLO e BARRACCO, 1997). Esse sistema é ativado através de proteínas receptoras de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs) capazes de identificar os componentes da parede celular dos microrganismos, como o Lipopolissacarídeos ou Peptidoglicanos de bactérias e β -1,3-glucanos de fungos (SODERHALL et al., 1998; BARRACO et al., 2008). Recentemente, em estudo realizado por Wongsak et al. (2015), a adição de um prebiótico (β -glucan) e *B. subtilis* à dieta de *L. vannamei* promoveu um incremento na

expressão do gene Pro-fenoloxidase, o que estimulou a atividade da Fenoloxidase (PO), contribuindo para o estado imunológico do animal.

Pesquisas relatam uma maior resistência e sobrevivência dos camarões a infecções por espécies de *Vibrio* quando tratados previamente com probióticos (ZOKAEIFAR et al., 2012; HAO et al., 2014). Como exemplo, Zokaeifar et al. (2012) ao suplementarem a dieta de juvenis de *L. vannamei* com *B. subtilis* encontraram uma melhor performance de crescimento, de resistência ao *V. harveyi* e atribuíram esses resultados a um incremento na resposta imunológica dos camarões. Zokaeifar et al. (2014) demonstraram que após oito semanas de administração de *B. subtilis* a juvenis de *L. vannamei*, houve um aumento da expressão dos genes do sistema imunológico proPO, LGBP, PE e SP. Nesse estudo, após 24h de infecção os camarões foram significativamente mais resistentes à injeção de *V. harveyi*. Em outro estudo, Chiu et al. (2007), ao suplementarem a dieta de *L. vannamei* com *Lactobacillus plantarum*, encontraram um significativo aumento da proPO e relacionaram a um estímulo da PO e consequente aumento da resistência dos camarões à infecção por *V. alginolyticus*.

3- Referência bibliográfica

- AUSTIN, B.; ZHANG, X.H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Lett Appl Microbiol**, v.43, p.119-124, 2006.
- BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p.3-11, 2000a.
- BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, v.191, p. 71-88, 2000b.
- BALCAZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* v. 114, p. 173-186, 2006a.
- BALCAZAR, J.L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, P. D. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 96, p. 147-150, 2007.
- BATICADOS, M.C.L.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; CRUZ-LACIERDA, E.R.; DE LA PENA; L.D., SUNAZ, N.A. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. **Dis Aquat Org**, v. 9, p. 133-139, 1990.
- CHIU, C.H., GUU, Y.K., LIU, C.H., PAN, T.M., CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish Shellfish Immunol**. v.23, p.364-377, 2007.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS. Immunology and Medical. Microbiology*, v.34, p.245-253, 2002.
- DALL, W; MORIARTY, D.J.W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Bliss, D. E. The Biology of Crustacea, Internal Anatomy and Physiological Regulation. **Academic Press**, v.5, p.215-261, 1992.
- DECAMP, O., MORIARTY, D.J.W. Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. **World Aquaculture**, v.37 (4), p.60–62, 2006.
- DEFOIRDT, T., BOON, N., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., BOSSIER, P., 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent

- vibriosis in aquaculture as an example. **Trends Biotechnol**, v.25, p.472-479, 2007.
- ESIOBU, N., ARMENTA, L., IKE, J., 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. **Int. J. Environ. Health Res**, v.12, p.133–144, 2002.
- ESTEVE, M.; HERRERA, F. Hepatopancreatic Alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.76, p.1-5, 2000.
- GATESOUPÉ, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147-165, 1999.
- GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v.191, p. 259-270, 2000.
- GULLIAN, M., THOMPSON, F., RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, p.1-14, 2004.
- HAMZA, F., KUMAR, A. R., ZINJARDE, S. Antibiofilm potential of a tropical marine *Bacillus licheniformis* isolate: role in disruption of aquaculture associated biofilms. **Aquaculture Research**, p. 1–9, doi:10.1111/are.12716, 2015.
- HAO, K., LIU, J. Y., LING, F., LIUA, X. L., LUA, L., XIA, L., WANG, G. X. Effects of dietary administration of *Shewanella halotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.428–429, p.141-149, 2014.
- IRIANTO, A., AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **J. Fish Dis.**, v.25, p.633-642, 2002.
- JANARTHANAM, K., GEORGE, M.R., JOHN, K.R., JEYASEELAN, M.J.P. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of *Vibrio harveyi* using indigenous bacterium, *Bacillus* spp. **Indian J. Geo-Mar. Sci.** v.41, p.83-89, 2012.
- KARUNASAGAR, I., PAI, R., MALATHI, G. R. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, v.128, p.203-209, 1994.
- KE LI, ZHENG T.; YUN, T; FENG XI; JIANJUN Y.; GUOZHENG Z.; HONG, H. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and

- immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* **Biotechnol Lett**, v.29, p.525-530, 2007.
- KUMAR, B. K.; DEEKSHIT, D. K.; RAJ, J. R. M.; RAI, P.; SHIVANAGOWDA, B. M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture** v.433, p.247-251, 2014.
- LAVILLA-PITOGO, C.R.; BATICADOS, C.L.; CRUZ-LACIERDA, E.R.; DE LA PENA, L. Occurrence of luminous bacteria disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture**, v.91, p.1-13, 1990.
- LEMOES, D.; EZQUERRA, J. M.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. **Aquaculture**, 186, p.89-105, 2000.
- LI, C. C. & JIANN-CHU, C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. **Fish Shellfish Immunol.**, v.25, p.701-709, 2008.
- LI, J., TAN, B., MAI, K. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture** v.291, p.35-40, 2009.
- LI, C. C., YEH, S. T., CHEN, J. C. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. **Fish Shellfish Immunol.**, v.28, p.121-127, 2010.
- LIU, P.C.; LEE, K.K.; CHEN, S.N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Lett Appl Microbiol**, v.22, p.413-416, 1996.
- LIU C.H., CHIU C.S., LIN P.L., WANG SW. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20 from natto. **J Appl Microbiol** v.107, p.1031-41, 2009.
- LOMELÍ-ORTEGA, C. O; MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture**, v.434, p. 208-211, 2014.
- LUIS-VILLASENOR, I.E., MACIAS-RODRIGUEZ, M.E., GOMEZ-GIL, B., ASCENCIO-VALLE, F. Campa-Cordova, A.I., 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.321, p.136–144, 2011.

- MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**, ano 1, p.76-84, 2005.
- MOHAPATRA, S., CHAKRABORTY, T., KUMAR, V., DEBOECK, G., MOHANTA, K.N. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **J. Anim. Physiol. Anim.Nutr.** v.79, p. 405-430, 2012.
- MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164, p.351-358, 1998.
- MOSS, S. M. Marine shrimp farming in the western hemisphere: past problems, present solutions, and future visions. **Rev. Fish. Sci.**, v.10, p.601– 620, 2002.
- NEWAJ-FYZUL, A. AL-HARBI, A. H., AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v.431, p. 1-11, 2014.
- NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Vet. Microbiol.**, v.159 p.443-450, 2012.
- NIMRAT, S. TANUTPONGPALIN, P. SRITUNYALUCKSANA, K., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V. Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. **Aquacult Int**, v.21, p.655-666, 2013.
- NINAWA, A.S., SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. **Critical Reviews in Microbiology** v.35, p.43-66, 2009.
- OCHOA-SOLANO JL, OLMOS-SOTO J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiol.** v.23, p.519-25, 2006.
- PIZZUTTO, M. AND HIRST, R.G. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. **Dis Aquat Org**, v.21, p.61-68, 1995.
- PHUOC, L.H. (2008). Single and dual experimental infection of specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio* species. PhD thesis, Ghent University, Belgium. 2008.

- REID G, SANDERS ME, GASKINS HR, GIBSON GR, MERCENIER A, Rastall RA, ROBERFROID MB, ROWLAND I, CHERBUT C, KLAENHAMMER. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **J Clin Gastroenterol**, v.37, p.105–118, 2003.
- RENGIPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. and MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture** 191, 271–288, 2000.
- ROCHA, I.P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007: desempenho, desafios e oportunidades. **Panorama da Aquicultura**, v.17, n 104, p.26-31, 2007.
- SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; PEVA, L. ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v.191, p.133-144, 2000.
- SHARMILA R., ABRAHAM T.J., SUNDARARAJ V. Bacterial flora of semi-intensive pond-reared *Penaeus indicus* (H.Milne Edwards) and the environment. **Journal of Aquaculture in the Tropics** 11: 193-203, 1996.
- SILVA, E.F., SOARES, M.A., CALAZANS, N.F., VOGLEY, J.L., DO VALLE, B.C., SOARES, R., PEIXOTO, S. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquac. Res.** V.44, p.13-21, 2013.
- SÖDERHÄLL K, CERENIUS L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr Opin Immunol** v.8, p.10-23, 1998.
- SONG, Y.L.; LEE, S.P. Characterization of ecological implication of luminous *Vibrio harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Bull Inst Zool Acad Sin**, v.32, p.217-220, 1993.
- TINH, N.T.N., DIERCKENS, K., SORGELOOS, P., BOSSIER, P. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. **Mar. Biotechnol.** v.10, p.1-12, 2008.
- THOMPSON, F.L.; ABREU, P.C.; WASIELESKY, W. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. **Aquaculture**, v.191, p.271–288, 2004.
- TRHAN, L., NUNAN, J., REDMAN, R.M., MOHNEY, L.L., PANTOJA, C.R., FITZSIMMONS, K., LIGHTNER, D.V. Determination of the infectious nature of

- the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** v.105, p.45-55, 2013.
- TSENG, D.Y.; HO, P.L.; HUANG, S.Y.; CHENG, S.C.; SHIU, Y.L.; CHIU, C.S. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish Shellfish Immunol**, v.26, p.339-344, 2009.
- VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Lett Appl Microbiol**, v. 87, p. 36:83, 2003.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.64, p.655-671, 2000.
- VINE N.G.; LEUKES W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiology Reviews**, v.30(3), p. 404-427, 2006.
- WANG, Y., FUL, L., LIN, J. Probiotic (*Bacillus coagulans*) cell in the diet benefit the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Shellfish Research**, v.31(3), p. 855-860, 2012.
- WONGSASAK U.; CHAIJAMRUS S.; KUMKHONG S.; BOONANUNTANASARN S. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. **Aquaculture**, v.436 p.179-187, 2015.
- YOUSEFIAN, M., AMIRI, M.S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **Afr. J. Biotechnol.** v.8, p.7313-7318, 2009.
- YU, M.C., LI, Z.J., LIN, H.Z., WEN, G.L., MA, S. Effects of dietary medicinal herbs and *Bacillus* on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquac. Int.** 17, 377-384, 2008.
- ZHENG, Y., YUA, M. LIU, Y., SUA, Y., XUB, T., YUB, M. ZHANG, X. H. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. **Aquaculture**, v.451, p.163-169, 2016.
- ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M. H.; TAKAMI, G. A.; LOVETTI, D. L.; MIRVAGHEFI, A. R.; SHAKOURI, M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used

as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v252, p516-524, 2006.

ZHOU, X. A., WANG, YAN-BO, LI, WEI-FEN. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v287, 349–353, 2009.

ZOKAEIFAR, H., BABAEI, N., SAAD, C. R., KAMARUDIN, M. S., SIJAM, K., BALCAZAR, J. L. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology** v.36, p. 68-74, 2014.

4- Artigo científico

4. 1 - Artigo científico I

Artigo científico a ser encaminhado a Revista

Journal of Shellfish Research

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

Produção de enzimas digestivas e antagonismo contra *Vibrio* spp. de linhagens de *Bacillus* spp. candidatos a probiótico para utilização na carcinicultura.

Bacillus spp. com potencial para utilização na carcinicultura

Joana Lyra Vogeley*

*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura,
Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author – contact information:

Phone: +55 81 3320-6524

Email: joanavogeley@hotmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial de *Bacillus* spp. isolados do intestino de camarões peneídeos selvagens para utilização como probiótico na carcinicultura, através da realização de ensaios de antagonismo contra *Vibrio* spp. e de produção de enzimas digestivas. As bactérias *B. circulans* (BC) e *B. subtilis* (BS), isoladas do intestino de *Farfantepenaeus subtilis* capturados na costa nordeste do Brasil, demonstraram atividade antagonista contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* e *V. mimicus*. Essas bactérias foram posteriormente testadas contra *V. parahaemolyticus* (VP) em diferentes combinações de pH (5, 7 e 9), salinidade (10, 20 e 30 g L⁻¹) e tempo de cultura bacteriana (12, 24, 36, 48 e 60h). As bactérias foram capazes de inibir o crescimento de VP em uma ampla faixa de pH e salinidade. No entanto, o pH alcalino e um tempo de cultura prolongado reduziram a capacidade antagonista das bactérias. Os ensaios enzimáticos demonstraram uma efetiva produção de amilases, lipases e proteases inespecíficas e específicas, como a tripsina e a quimotripsina, as quais são as maiores responsáveis pela digestão das proteínas nos camarões. Essas características fazem dessas bactérias potenciais para utilização como probiótico no cultivo de camarões.

Palavras-chave: Probiótico, *in vitro*, atividade inibitória, enzimas.

1. Introdução

Probióticos são definidos como um “suplemento alimentar de microrganismos vivos que promove benefícios ao hospedeiro devido a uma melhora do balanço microbiano intestinal (Fuller 1989). Na aquicultura, bactérias probióticas geralmente são selecionadas pela capacidade desses microrganismos produzirem enzimas digestivas e compostos inibitórios contra patógenos através de testes realizados *in vitro* (Vaseeharan & Ramasamy 2003, Balcazar et al. 2007, Nakayama et al. 2009, Das et. al 2010, Barman et al. 2011, Janarthanam et. al 2012). Várias pesquisas demonstraram que bactérias selecionadas através da realização de ensaios *in vitro*, quando adicionadas ao cultivo através da água ou do alimento, resultam em benefícios aos animais cultivados atribuídos ao modo de ação dos probióticos, tais como: redução de bactérias do gênero *Vibrio* na água de cultivo e no hospedeiro, incremento do estado imunológico e da atividade de enzimas digestivas do animal (Li et al. 2009, Zhou et al. 2009, Tseng et al. 2009, Nimrat et al. 2012, Zokaeifar et al. 2012).

Para seleção de bactérias probióticas é necessário conhecer a origem da linhagem, compreender a interação com os patógenos e os fatores ambientais que regem a concorrência entre eles (Vine et al. 2004, Thin et al. 2008), uma vez que essas bactérias estarão sujeitas tanto as condições do ambiente de cultivo quanto a do trato digestório dos animais e devem, portanto, tolerar uma ampla faixa de temperatura, pH ou salinidade (Fuller 1989, Newaj-Fyzul et al. 2014). Além disso, *Vibrio* spp. estão naturalmente presentes no ambiente marinho e possuem uma elevada capacidade de multiplicação e adaptação a mudanças ambientais em sistemas aquícolas (Saulnier et al. 2000). Nesse contexto, a realização de ensaios *in vitro* que simulem condições ambientais adversas para avaliar a capacidade antagonista de bactérias candidatas a probiótico contra *Vibrio* spp. é uma importante ferramenta para seleção dessas bactérias.

As bactérias probióticas devem ser capazes de sobreviver e crescer no trato digestório do hospedeiro enquanto exercem os seus efeitos benéficos. De acordo com Verschuere et al. (2000) há uma maior probabilidade de eficácia das bactérias probióticas quando estas são isoladas de seu próprio hospedeiro. Boonthai et. al, (2011) demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* sp. isoladas do intestino de *Penaeus monodon* foram capazes de colonizar a água e o trato digestório desses animais sob condições de cultivo, reduzindo a concentração de *Vibrio* tanto no trato digestório quanto na água. Dessa forma, o isolamento de bactérias indígenas que foram capazes de colonizar o trato digestório de camarões peneídeos selvagens no seu ambiente natural pode ser uma alternativa promissora para a seleção de bactérias probióticas para a carcinicultura.

Bactérias do gênero *Bacillus* possuem características propícias para utilização na aquicultura como a capacidade de multiplicação na água e colonização no trato digestório dos camarões, produção de compostos inibitórios (bacteriocinas), competição com patógenos por nutrientes e locais de adesão, produção de substâncias imunoestimulantes e produção de enzimas digestivas (Moriarty 1998; Rengpipat et al. 1998; Irianto & Austin 2002, Ravi et al. 2007, Ma et al. 2009, Nakayama et al. 2009, Silva et al. 2013). Bactérias capazes de produzir enzimas digestivas podem contribuir para um aumento da atividade enzimática no trato digestório do hospedeiro, incrementando a digestão e absorção do alimento, resultando em uma melhor de conversão alimentar e crescimento (Ziaei-Nejad et al 2006, Wang et al. 2007, Zhou et al. 2009).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vitro* o potencial de *Bacillus* spp. isolados do trato digestório de camarões peneídeos selvagens para

utilização como probiótico na carcinicultura marinha, através da realização de ensaios de antagonismo contra espécies de *Vibrio* e de produção de enzimas digestivas.

2. Material e Métodos

2.1 Isolamento de *Bacillus* sp. candidatos a probiótico

Indivíduos selvagens da espécie *Farfantepenaeus subtilis* foram capturados na costa sul do estado de Pernambuco e transportados vivos ao Laboratório de Tecnologia em Aquicultura (LTA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os camarões foram desinfetados externamente com solução de etanol (70%), lavados três vezes com água destilada estéril e dissecados. Em seguida, os intestinos foram macerados e, com o auxílio de um *swab*, uma amostra foi inoculada em placas de petri contendo o meio de cultura seletivo Agar MYP (Agar Gema de Ovo Polimixina Vermelho Fenol) para o desenvolvimento de *Bacillus*. As placas foram incubadas em estufa durante 24 – 48 h a 30 °C.

Após o período de incubação, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram isoladas e purificadas de acordo com as suas características morfológicas distintas e submetidas aos testes presuntivos para identificação do gênero *Bacillus*: coloração de Gram, catalase e formação de esporos. Os esporos foram observados através da suplementação do meio de cultura com Sulfato de Manganês a 1% (MnSO_4) para posterior coloração com verde malaquita. Seis bactérias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* e foram utilizadas no ensaio de antagonismo preliminar *in vitro* contra diferentes espécies de *Vibrio*.

2.2 Ensaio preliminar do efeito antagonista de *Bacillus* spp. contra *Vibrio* spp.

A avaliação preliminar da atividade antimicrobiana de *Bacillus* spp. contra *Vibrio* spp. foi realizada através do método de difusão em poços. Os seis *Bacillus* isolados e um probiótico comercial (composto por cepas de *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. licheniformes*) foram testados separadamente contra *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, ambos provenientes do banco de cepas do Laboratório de Cultivo de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. mimicus* ATCC 33655 e *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Para tanto, cada cepa de *Bacillus* isolada e o probiótico comercial foram cultivados em caldo TSB (Triplic Soy Broth) acrescido de NaCl (2,0%) e incubados em estufa a 30 °C por 48 horas. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (4.000 rpm por 15 min), as células bacterianas foram suspensas e homogeneizadas em caldo TSB estéril e 20 µl de cada bactéria foram adicionados a três poços perfurados em placas de TSA (Triplic Soy Agar, enriquecido com 2% de NaCl) previamente semeadas com a utilização de suabes embebidos em uma solução com uma concentração de 10^8 cel ml⁻¹ de cada *Vibrio* separadamente (absorbância de 0,5 da escala de MacFarland). Ao quarto poço foi adicionado 20 µl de Caldo TSB estéril para verificação de uma possível atividade inibitória do meio (poço controle). As placas foram então incubadas em estufa a 30 °C durante 24 h e após esse período foi medido o diâmetro do halo inibitório (mm) ao redor dos poços com um paquímetro digital.

Entre os *Bacillus* testados, as bactérias candidatas a probiótico que promoveram halo inibitório contra todas as espécies de *Vibrio* spp. testadas foram identificados através de testes bioquímicos (API 50 CH - Biomerieux[®]). Essas bactérias foram então utilizadas em ensaios enzimáticos e em um segundo ensaio de antagonismo.

2.3 Efeito antagonista de *Bacillus* spp. contra *V. parahaemolyticus* sob diferentes condições de cultivo

Os *Bacillus* spp. e o probiótico comercial foram cultivados em caldo nutriente (TSB - Triplic Soy Broth) com diferentes condições de pH e salinidade para realização dos teste de antagonismo contra *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Inicialmente, o caldo nutriente foi suplementado com NaCl a fim de se obter meios de cultura bacterianos em quatro diferentes concentrações de sal: 0, 10, 20 ou 30 g L⁻¹. Para cada concentração de sal, o pH do meio foi ajustado para 5, 7 ou 9 através da adição de 1N NaOH e 1N HCl. Dessa forma, cada *Bacillus* e o probiótico comercial foi cultivado em diferentes combinações de salinidade e pH, totalizando doze condições de cultura para cada bactéria testada. A cada 12 horas, uma amostra de cada cultura foi centrifugada (4.000 rpm por 15 min), as células bacterianas foram suspensas e homogeneizadas em caldo TSB nas mesmas condições de salinidade e pH da cultura de origem e, em seguida, 20µl da suspensão bacteriana de cada *Bacillus* foram adicionados a três poços das placas de TSA (Triplic Soy Agar) previamente semeadas com uma concentração de 10⁸ cel/ml de *V. parahaemolyticus*, correspondente a absorvância de 0,5 da escala de MacFarland. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C (24h) e os diâmetros do halo inibitório (mm) ao redor dos poços foram medidos com um paquímetro digital. Este procedimento foi realizado até o tempo de 60h de cultivo dos *Bacillus* nas diferentes condições.

2.4 Determinação da atividade enzimática de *Bacillus* spp. *in vitro*

O objetivo desse ensaio foi determinar a produção de lipase, amilase e protease pelas células bacterianas. Para determinação da atividade proteolítica, os *Bacillus* spp. selecionados foram estriados em placas de petri contendo meio sólido ágar nutriente TSA (Tripit Soy Agar) acrescido de 0,01% de leite desnatado estéril. As placas foram

incubadas em estufa (30 °C) e a cada 24 h foi observado à presença e/ou ausência de halos de degradação ao redor das colônias bacterianas.

Para determinação da atividade amilolítica, os *Bacillus* spp. foram estriados em placas de TSA acrescido de amido (5%) e foram incubadas em estufa (30 °C) por um período de 24 a 72 horas. Em seguida, as placas foram expostas a uma solução de iodo a 1% para revelação da formação de halos de degradação. A atividade lipolítica foi determinada em placas de TSA acrescido de 2% de óleo de oliva e 1% de rodamina B a 0,01%. As placas foram incubadas em estufa de 24 a 48 h (30°C) e, posteriormente, foram expostas a luz ultravioleta para revelação de halos fluorescentes ao redor das colônias de *Bacillus* spp., caracterizando a produção de lipase.

Os halos de degradação ao redor das colônias bacterianas foram medidos com um paquímetro digital e expressam a atividade enzimática extracelular, a qual foi determinada pelo Índice Enzimático (IE), que é a relação do diâmetro do halo de degradação pelo diâmetro médio da colônia (Hankin et al. 1975).

2.6 Análise estatística

Modelos lineares generalizados (MLG) são úteis para avaliar o efeito de diferentes variáveis explicativas em uma variável resposta (McCullagh & Nelder, 1989; Dobson, 2002). Neste trabalho a variável resposta de interesse é a formação do halo de inibição, que expressa a capacidade de inibição de *V. parahaemolyticus* pelos *Bacillus* selecionados. As potenciais variáveis explicativas que afetam a formação desse halo seriam o tempo de cultura de *Bacillus* spp., o pH, a salinidade e as espécies de bactérias utilizadas (*Bacillus* spp. candidatos e o probiótico comercial). Esta última variável é categórica, enquanto que as demais são contínuas. Análises convencionais como a ANCOVA (Análise de Covariância) são casos específicos dos MLGs (Dobson, 2002).

Na ANCOVA assume-se que a variável resposta (*e.g.* diâmetro do halo) pode ser modelada em função de uma combinação de variáveis explicativas categóricas (*e.g.* tratamento) e contínuas (*e.g.* pH). As variáveis explicativas contínuas foram consideradas também na forma quadrática. A seleção das variáveis importantes a serem mantidas no modelo foi feita com base no cálculo do Critério de Informação de Akaike (CIA) (Akaike, 1974), o qual tende a selecionar modelos com balanço razoável entre viés e variância (Burnham & Anderson, 2002). O modelo final selecionado com o CIA é:

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot pH + \beta_2 \cdot tc + \beta_3 \cdot bac + \beta_4 \cdot sal + \beta_5 \cdot pH^2 + \beta_6 \cdot tc^2 + \beta_7 \cdot sal^2 + \beta_8 \cdot tc^3 + \beta_9 \cdot sal^3 + \beta_{10} \cdot pH : bac + \beta_{11} \cdot pH : sal + \beta_{12} \cdot tc : bac + \beta_{13} \cdot tc : sal + \beta_{14} \cdot bac : sal + \varepsilon$$

em que β_i com $i = \{1, \dots, 14\}$ são os parâmetros a serem calculados, e que refletem os efeitos das diferentes variáveis explicativas (*e.g.* pH) sobre a capacidade de inibição de *V. parahaemolyticus* através da formação do halo. Na equação acima dois pontos indicam interações de primeira ordem entre variáveis explicativas, e ε é um erro normal com média zero e desvio padrão σ^2 . Dessa forma, o modelo foi utilizado para fazer previsões quanto aos diâmetros dos halos para diferentes tratamentos e combinações de pH, salinidade e tempo de cultivo.

Os dados de quantificação da atividade enzimática proteolítica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se as premissas necessárias. Em seguida o teste t de Student foi utilizado para determinar diferenças significativas ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1 Ensaio preliminar do efeito antagonista de *Bacillus* spp. contra *Vibrio* spp.

Entre os seis *Bacillus* isolados do intestino de camarões selvagens, duas bactérias apresentaram antagonismo e promoveram halos de inibição contra todas as espécies de

Vibrio testadas. Essas bactérias foram identificadas como *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus circulans* (BC). O probiótico comercial também apresentou atividade inibitória contra *Vibrio* spp. e não houve antagonismo observado nos poços controles (Tabela 1).

Insira Tabela 1

3.2 Efeito antagonista de *Bacillus* spp. contra *V. parahaemolyticus* sob diferentes condições de cultivo

De uma maneira geral, as bactérias *B. subtilis*, *B. circulans* e o probiótico comercial testados foram capazes de inibir o crescimento de *V. parahaemolyticus* (VP) em uma ampla faixa de salinidade e pH. A análise de covariância (ANCOVA) demonstrou que o pH e o tempo de cultura bacteriana afetaram significativamente a atividade inibitória das bactérias contra *V. parahaemolyticus*. De uma forma secundária, a espécie bacteriana e a salinidade influenciaram a capacidade de inibição de VP pelas bactérias testadas.

Os coeficientes do modelo quadrático polinomial demonstram a influência na respectiva variável resposta e, associados a valores baixos de “p”, indicam diferenças significativas de zero (Tabela 2). Verificou-se que há diferenças significativas em vários dos termos isolados (em formas simples ou potenciais) e em várias interações. A interpretação desses efeitos pôde ser feita com o cálculo de predições da formação de halo inibitório médio esperado para cada combinação de espécie de bactéria, pH, tempo de cultivo e salinidade.

Insira Tabela 2

Previsões dos diâmetros médios de halos de inibição (mm) baseados nas estimativas dos parâmetros do modelo (Tabela 2) são mostradas na Figura 1. Considerando que os poços experimentais possuem 5 mm de diâmetro, a interpretação dos resultados restringiu-se às previsões de halos de inibição (zona clara ao redor dos poços) com diâmetro maior ou igual a 7 mm.

Insira Figura 1

A bactéria BC cultivada em pH 5 e 7 apresentou atividade inibitória contra VP para todas as salinidades testadas com a formação de halos que variaram entre 10 e 13 mm até as primeiras 36 horas de cultivo. À medida que o tempo de cultura dessa bactéria foi avançando até 60 horas, houve uma redução na capacidade de inibição do patógeno em pH ácido. No pH neutro essa bactéria inibiu o crescimento de VP durante todo o período experimental. Já no pH alcalino, o BC só foi capaz de inibir o crescimento de VP até as primeiras 24 horas (Figura 1A).

A bactéria BS cultivada em pH ácido e neutro apresentou atividade antimicrobiana com a formação de halos que variaram entre 8 e 13 mm para todas as salinidades durante todo o período experimental (60 horas). Logo, o tempo de cultura teve menor influência na atividade antimicrobiana dessa bactéria. No pH 9, essa bactéria não apresentou atividade inibitória contra VP em todo o período experimental (Figura 1B).

O probiótico comercial utilizado nesse estudo demonstrou atividade inibitória contra VP com halos que variaram entre 8 a 11 mm apenas nas primeiras 24 e 36 horas de cultura bacteriana em meio ácido e neutro, respectivamente. Em pH alcalino, o probiótico não apresentou atividade antimicrobiana.

De uma forma geral, observou-se que o pH alcalino e um tempo prolongado de cultura bacteriana promoveram uma redução na atividade antimicrobiana de BS, BC e do probiótico comercial contra VP nas diferentes condições, quando comparados com o pH ácido ou neutro, sobretudo nas fases iniciais da cultura bacteriana (até 24 ou 36 horas).

3.3 Determinação da atividade enzimática

As bactérias BC e BS apresentaram halos de degradação ao redor das colônias para a atividade proteolítica com 72 horas de incubação, onde o Índice Enzimático (IE) médio foi de $2,1 \pm 0,3$ para o BC e de $2,0 \pm 0,4$ para o BS. Quanto à atividade amilolítica, apenas o BS apresentou halo de degradação com IE médio de $2,2 \pm 0,2$. Para a atividade lipolítica, foi observada a formação de halos fluorescentes rosa-alaranjados, o que caracterizou a produção de lipase por ambas as bactérias testadas, com IE médios de $2,3 \pm 0,3$ para BC e $1,9 \pm 0,2$ para BS.

4. Discussão

As bactérias *B. subtilis* e *B. circulans* isoladas do trato digestório de camarões selvagens e o probiótico comercial foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de diferentes espécies de *Vibrio*. De acordo com Verschuere et al. (2000), os mecanismos de ação das bactérias para inibição de patógenos incluem a produção de bacteriocinas, lisozimas, proteases, peróxido de hidrogênio e alteração de pH pela produção de ácidos orgânicos. A capacidade de inibir diferentes patógenos é uma das principais características utilizadas para seleção de bactérias com potencial para serem utilizadas no cultivo de camarões como probiótico. Villaseñor et al. (2011) isolaram *Bacillus* spp. do intestino de *L. vannamei* selvagens e o teste de antagonismo *in vitro* revelou que

essas bactérias inibiram o crescimento de *V. harveyi* (CAIM 1793), *V. parahaemolyticus* (CAIM 170), *V. campbelli* (CAIM 333), *V. alginolyticus* (CAIM 57) e *V. vulnificus* (CAIM 157). Posteriormente, essas bactérias, quando adicionadas ao cultivo, incrementaram a sobrevivência de larvas de *L. vannamei*. Em outro estudo, ao utilizar *Bacillus*, Srinivas et al. (2010) demonstrou que a capacidade de inibição de *Vibrio* spp. encontrada em testes realizados *in vitro* foi confirmada *in vivo* quando larvas de *P. monodon* foram desafiadas com uma linhagem patogênica de *V. harveyi* (MCCB111) e obtiveram um significativo aumento na sobrevivência.

As bactérias utilizadas no presente estudo demonstraram uma efetiva atividade inibitória contra *V. parahaemolyticus* em uma ampla faixa de pH e salinidade. Em estudo realizado por Shakibazadeh et al. (2008), bactérias isoladas do trato digestório de *P. monodon* apresentaram uma elevada atividade inibitória *in vitro* contra *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* em diferentes temperaturas, pH e salinidades. Segundo esses autores, essa característica é fundamental devido às flutuações nos parâmetros físico-químicos de qualidade de água que normalmente ocorrem nos cultivos de camarões. Essas mudanças bruscas causam estresse e podem comprometer o estado imunológico dos animais cultivados deixando-os mais susceptíveis a ação de patógenos (Mohapatra et al. 2013). Embora *Vibrio* spp. possam ser causadores primários de doenças, essas bactérias também são consideradas agentes secundários de infecção e agem de forma oportunista quando os animais estão imunologicamente comprometidos devido ao estresse ambiental (Liu et al. 2010).

Vários estudos relataram um aumento da mortalidade dos camarões infectados com diferentes espécies de *Vibrio* quando submetidos a estresse por pH ou salinidade. Wang e Chen et al. (2005) demonstraram que juvenis de *L. vannamei* submetidos à estresse por salinidade tiveram uma redução na resposta imunológica, resultando numa

menor resistência a *V. alginolyticus*. Da mesma forma, Li et al. (2010) identificaram um decréscimo no estado imunológico e um consequente aumento da mortalidade dos camarões após estresse por baixa salinidade e concluíram que os animais tornaram-se mais vulneráveis à infecção por *V. alginolyticus*. Em outro estudo, camarões *L. vannamei* sujeitos a estresse por pH ácido (6,5) e alcalino (10,1) tiveram uma redução nos parâmetros imunológicos e aumento da mortalidade (Li et al. 2008). Phuoc et. al (2008) concluíram que em ausência de estresse, as pós-larvas de *L. vannamei* não foram suscetíveis a infecção por diferentes linhagens de *V. campbellii*, *V. harveyi* e *V. penaeicida*. Nesse sentido, as bactérias probióticas devem ser capazes de inibir a proliferação de patógenos mesmo em condições ambientais adversas, de forma a diminuir os riscos de doenças e mortalidade no momento em que o animal esteja imunologicamente comprometido.

No presente estudo, houve uma redução ou ausência da atividade inibitória de *B. subtilis*, *B. circulans* e do probiótico comercial contra *V. parahaemolyticus* quando submetidos ao pH 9. De acordo com Abrams et al. (2011), a perda da atividade em meio alcalino representa uma característica comum de alguns compostos inibitórios, os quais habitualmente possuem caráter acidófilo e são rapidamente desnaturadas em condições alcalinas.

Os probióticos devem ser capazes de tolerar as condições do trato digestório de forma a garantir a sua manutenção enquanto beneficia o hospedeiro (Vine et al. 2006). Segundo Tkhruni et al. (2013), os pré-requisitos para seleção de bactérias probióticas incluem segurança para o hospedeiro, viabilidade de industrialização, capacidade de aderência ao tecido epitelial do intestino, produção de substâncias antimicrobianas e resistência ao pH ácido. Em estudo recente, Alexandre et al. (2014) determinaram que o pH do sistema digestório dos camarões está em torno de 7,0. As bactérias *B. subtilis* e

B. circulans testadas em nosso estudo apresentaram uma maior capacidade de inibição do *V. parahaemolyticus* em pH neutro e, mesmo em pH ácido, continuaram inibindo o crescimento desse *Vibrio*. Além disso, estas bactérias foram isoladas do intestino de camarões peneídeos marinhos, o que pode conferir a esses microrganismos uma maior capacidade de colonização do trato digestório de outras espécies de camarões cultivadas comercialmente.

A maioria das bactérias produz e secreta compostos antimicrobianos na fase estacionária de crescimento (Tamehiro et al. 2002). Por outro lado, em algumas espécies, a síntese de compostos pode ocorrer durante a fase exponencial de crescimento desses microrganismos e ser interrompida quando as células entram na fase estacionária (Arauz et al. 2009). Tal fato pode ter acontecido em nosso estudo, considerando que, de uma forma geral, a maior atividade inibitória foi obtida até 24 h de cultura bacteriana e que, com o tempo prolongado até 60 horas, houve uma diminuição ou ausência de atividade antagonista de *B. subtilis*, *B. circulans* e do probiótico comercial contra o *V. parahaemolyticus*. Este fato nos leva a sugerir que em uma situação de cultivo (*in vivo*) essas bactérias sejam adicionadas a cada 24h ao ambiente de cultivo, o que corrobora com as recomendações do probiótico comercial utilizado no presente estudo, cuja orientação é adicioná-lo diariamente ao cultivo.

O índice enzimático (IE) é um parâmetro utilizado para estimativa da capacidade de um microrganismo produzir enzimas. A seleção de bactérias produtoras de enzimas pode ser realizada pela avaliação da hidrólise do nutriente em meio sólido (halo de degradação ao redor da colônia bacteriana), onde quanto maior o IE maior a concentração da enzima produzida e, conseqüentemente, maior a atividade enzimática (Ceska, 1971). Lealem & Gashe (1994) sugerem um índice enzimático $\geq 2,0$ para considerar um microrganismo como um produtor potencial de enzimas. Dessa forma, o

B. subtilis e *B. circulans* utilizados no presente estudo apresentaram efetiva produção de lipase, amilase e protease.

Bactérias capazes de produzir exoenzimas podem contribuir para um melhor aproveitamento dos nutrientes presentes nas rações formuladas, complementando a atividade enzimática do camarão e incrementando a digestibilidade do alimento (Ochoa-Solano, J. L e Olmos-Soto, J. 2006). De acordo com Yan-Bo Wang (2007) um melhor crescimento de *L. vannamei* foi resultado do aumento da atividade de enzimas digestivas promovido por *B. coagulans* adicionado à dieta, uma vez que estas bactérias podem ter contribuído com a atividade enzimática através da produção de enzimas exógenas ou induzido a produção de enzimas endógenas pelo camarão. O aumento da atividade da amilase, lipase e protease em larvas de *L. vannamei* tratadas com *B. coagulans* SC8168 pode ter contribuído para um incremento na digestão e absorção do alimento, resultando em uma maior sobrevivência (Zhou et al. 2009).

As bactérias *B. subtilis* e *B. circulans* isoladas do intestino de camarões selvagens apresentaram antagonismo contra diferentes espécies de *Vibrio* e foram capazes de inibir o crescimento de *V. parahaemolyticus* em uma ampla faixa de pH e salinidade. Além disso, essas bactérias são produtoras de lipases, amilases e proteases. Essas características fazem dessas bactérias potenciais para utilização como probiótico na carcinicultura marinha. Serão necessários testes para avaliarem tais benefícios *in vivo*. No entanto, a realização de ensaios e simulações *in vitro* ainda são os mecanismos mais utilizados para a seleção e prospecção de bactérias probióticas.

5. Referências

- Abrams, D., BarbosA, J., Albano, H. 2011.Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”. *Food Control*. 22:940-946
- Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., Penna, T. C. V. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 20:146-154.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical identification model. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Balcázar, J. L. & T. Rojas-Luna. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol*. 55:409-412.
- Barman, P., Banerjee, A., Bandyopadhyay, P., Chandra, K. M., Kumar, P., Mohapatra, D. 2011. Isolation, identification and molecular characterization of potential probiotic bacterium, *Bacillus subtilis* PPP 13 from *Penaeus monodon*. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*. 4:473-482
- Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., 2011. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquac. Nutr*. 17:634–644.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248–254.
- Burnham, K. & Anderson, D. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2a edição. Springer-Verlag, New York. 488p.

- Das, S., L. R. Ward & C. Burke. 2010. Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 305:32-41.
- Dobson, A. J. 2002. An introduction to generalized linear models. 2nd Edition. Chapman & Hall/CRC. 225 pp.
- Fuller, R., 1989. A review probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365–378.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607, 1975.
- Irianto, A. & B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25: 633-642.
- Janarthanam, K., George, M.R., John, K.R., Jeyaseelan, M.J.P., 2012. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of *Vibrio harveyi* using indigenous bacterium, *Bacillus* spp. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 41:83–89.
- Li, C. C. & Jiann-Chu, C. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish Shellfish Immunol.* 25:701-709.
- Li, C. C., Yeh, S. T., Chen, J. C. 2010. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish Shellfish Immunol.* 28:121-127.
- Liu, K. F., C. H. Chiu, Y. L. Shiu, W. Cheng & C. H. Liu. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 28:837-844.
- Luis-Villaseñor I. E., Macías-Rodríguez M. E., Gómez-Gil B., Ascencio-Valle F., Campa-Córdova A.I. 2012. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 321:136-144.

- Ma, C., Y. Cho & K. Oh. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture* 287:266-270.
- McCullagh, P & Nelder, J. A. 1989 Generalized Linear Models. London, Chapman & Hall. 513p.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., Mohanta, K.N., 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *J. Anim. Physiol. Anim.Nutr.* 79:405–430.
- Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164:351-358.
- Nakayama, T., H. Lu & N. Nomura. 2009. Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Lett. Appl. Microbiol.* 49:679-684.
- Newaj-Fyzul, A., A. H. Al-Harbi, B. Austin. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431:1–11.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet. Microbiol.* 159:443–450.
- Ochoa-Solano, J.L.; Olmos-Soto, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Aquaculture*, v.23, p.519-525, 2006.
- Phuoc, L.H. 2008. Single and dual experimental infection of specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio* species. PhD thesis, Ghent University, Belgium.

Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathambal, G., Kathiresan, K., Pandian, S.K., 2007.

Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 219–223.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 1998. Effects of aprobiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167:301–313.

Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, L. Peva & D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191:133-144.

Shakibazadeh, S., Saad, C. R., Christianus, A. Kamarudin, M. S., Sijam, K. Shamsudin, M. N., Neela, V. K. 2008. Evaluation of *in vitro* *Vibrio* static activity of *Shewanella* algae isolated from healthy *Penaeus monodon*. *African Journal of Biotechnology* 21:3952-3961.

Silva, E.F., Soares, M.A., Calazans, N.F., Vogeley, J.L., do Valle, B.C., Soares, R., Peixoto, S., 2013. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.* 44:13–21.

Tamehiro, N, Okamoto-Hosoya, Y, Okamoto, S, Ubukata, M, Hamada, M, Naganawa, H, Ochi1, K. 2002. Bacilysocin, a Novel Phospholipid Antibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 46:315-320.

Tkhruni, F. N., Karapetyan, K. J. Danova, S. T. Dimov, S. G. Karimpour. F. A. 2013. Probiotic properties of endemic strains of lactic acid bacteria. *J. BioSci. Biotech.* 2:109-115.

Tinh, N.T.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2008. A reviewof the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* 10:1–12.

- Tseng, D. Y., P. L. Ho, S. Y. Huang, S. C. Cheng, Y. L. Shiu & C. S. Chiu. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunol.* 26:339-344.
- Vaseeharan, B. & P. Ramasamy 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:83-87.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:655-671.
- Vine, N. G., Leukes W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases* 27:319-326.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol.* 30:404–427.
- Villaseñor, L. I. E., Macías-Rodríguez, M. E., Gómez-Gil, B, Ascencio-Valle, F., Campa-Córdova, A. I. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321:136-144.
- Wang, L.U & Chen, J.C. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish Shellfish Immunol*, 18:269-278.
- Zhou, X. A., Wang, Y, Li, W. 2009 Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287:349–353.
- Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive

enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 683–689.

Tabela 1 – Médias do diâmetro (mm) do halo de inibição promovido por *B. subtilis*, *B. circulans* e o Probiótico Comercial contra diferentes espécies de *Vibrio*.

Espécie de <i>Vibrio</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	Probiótico comercial
<i>V. harveyi</i>	++	++	++
<i>V. alginolyticus</i>	+++	+++	++
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	+++	++++	++
<i>V. mimicus</i> ATCC 33655	++	++	++
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	++	+++	++

Halos de inibição: ++ ≥ 8 e ≤ 12 mm; +++ > 12 mm ≤ 16 mm; ++++ > 17 mm

Tabela 2 – Estimativas dos parâmetros do modelo quadrático polinomial para o efeito antagonista de *B. circulans* (BC), *B. subtilis* (BS) e o Probiótico Comercial (PC) contra *V. parahaemolyticus*, sob diferentes condições de cultivo.

	Estimativa	Erro padrão	Valor de t	Valor de p
Intercepto	-32,1000	4,1100	-7,8180	2,98E-14
pH	12,8300	1,0700	11,9890	2,00E-16
TC	0,2816	0,1710	1,6490	0,099667
BS	4,7740	1,7600	2,7120	0,006905
PC	-1,8900	1,7600	-1,0740	0,283429
Sal	0,4617	0,1260	3,6680	0,00027
pH ²	-0,9646	0,0752	-12,8240	2,00E-16
TC ²	-0,0129	0,0053	-2,4510	0,014557
Sal ²	-0,0217	0,0096	-2,2600	0,024224
pH:BS	-0,5813	0,2130	-2,7320	0,006505
pH:PC	0,1729	0,2130	0,8130	0,416699
pH:Sal	-0,0317	0,0078	-4,0760	0,0000529
TC:BS	0,0292	0,0205	1,4250	0,154817
TC:PC	-0,0656	0,0205	-3,2060	0,00143
TC:Sal	0,0021	0,0007	2,8450	0,004617
BS:Sal	-0,1206	0,0311	-3,8800	0,000118
PC:Sal	0,0430	0,0311	1,3840	0,166995

*TC = Tempo de cultivo; Sal = Salinidade.

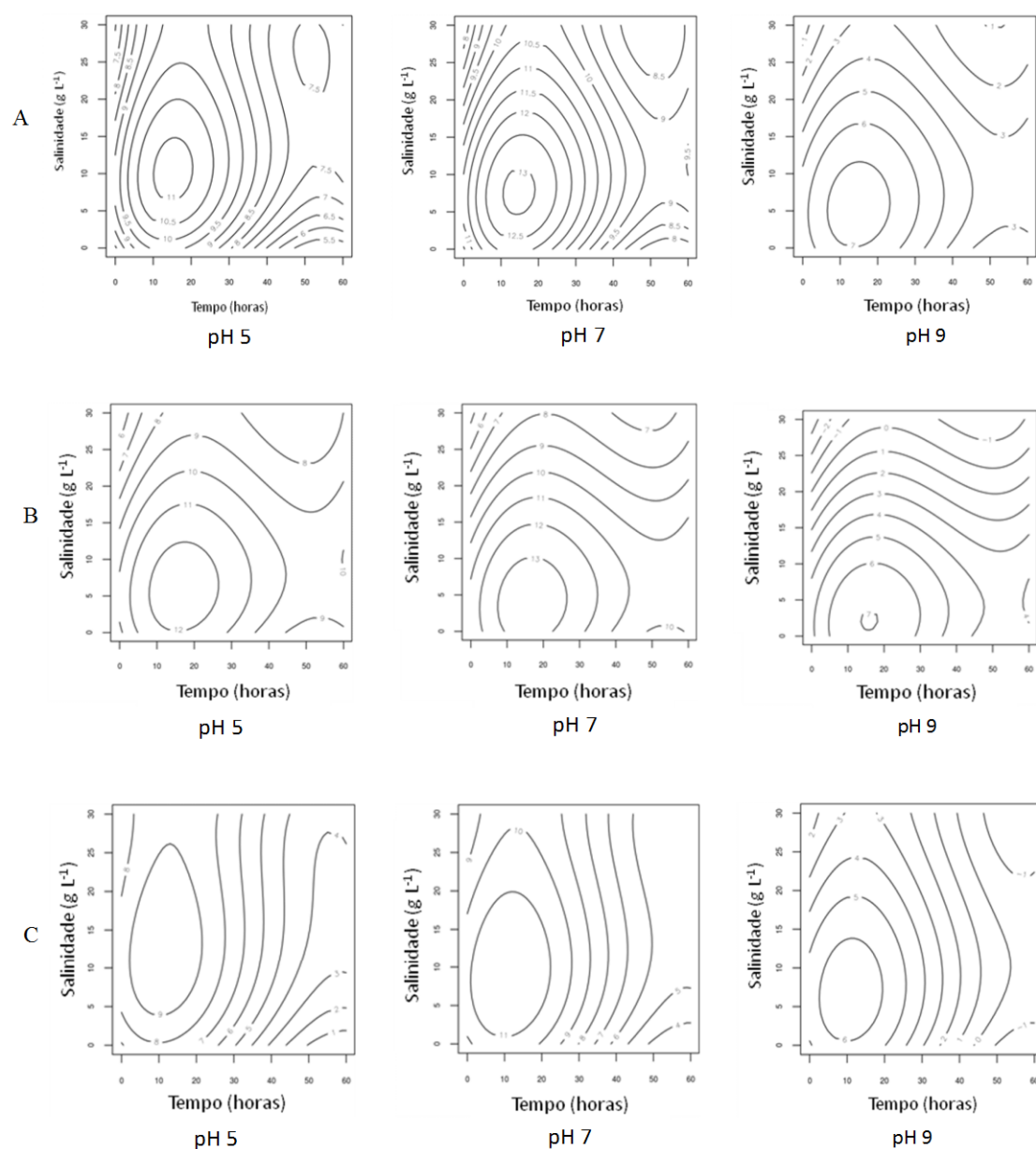


Figura 1 – Previsões dos diâmetros médios de halos de inibição (mm) do modelo polinomial de análise de antagonismo de *Bacillus circulans* (A), *Bacillus subtilis* (B) e Probiótico Comercial (C) contra *Vibrio parahaemolyticus*.

4. 2- Normas da Revista Journal of Shellfish Research

Author Guidelines

Original articles dealing with all aspects of shellfish research will be considered for publication. Manuscripts will be judged by the editors or other competent reviewers, or both, on the basis of originality, content, merit, clarity of presentation, and interpretations. Each article should be carefully prepared in the style followed in prior issues of the *Journal of Shellfish Research* before submission to the Editor. Papers published or to be published in other journals are not acceptable.

Title, Short Title, Key Words, Abstract: The title of the paper should be kept as short as possible. Please include a set of key words and a "short running title" of not more than 48 characters including spaces. Each manuscript must be accompanied by a concise, informative abstract, giving the main results of the research reported. The abstract will be published at the beginning of the article. No separate summary should be included.

Text: Manuscripts must be typed double-spaced throughout on one side of the paper, leaving ample margins, with the pages numbered consecutively. Lines should be numbered continuously from beginning to end of the manuscript. Scientific names of species should be underlined or in italics and, when first mentioned in the text, should be followed by the authority. Common and scientific names of organisms should be in accordance with American Fisheries Society Special Publications 16 and 17: *Common and Scientific Names of Aquatic Invertebrates from the United States and Canada: Mollusks*, and *CSNAIUSC: Decapod Crustaceans*, or relevant publications for other geographic regions.

The manuscript must be submitted electronically unless prior arrangements have been made with the Editor. A PDF, Word, or WordPerfect file for review purposes is acceptable. Electronic files of the final accepted manuscript for publication must be submitted in Word or WordPerfect. Authors of manuscripts submitted in files such as TEX or LATEX will be charged for the special processing required before the manuscript is suitable for printing.

Abbreviations, Style, Numbers: Authors should follow the style recommended by the 7th edition (2006) of the Council of Biology Editors [CBS] Style Manual, distributed by the American Institute of Biological Sciences. All linear measurements, weights, and volumes should be given in metric units.

Tables: Tables, numbered in Arabic, should be on separate pages with a concise title and explanatory legend at the top.

Illustrations: Authors should provide figures in electronic format. Illustrations should be planned so that important details will be clear after reduction to page size or less. No

drawing should be so large that it must be reduced to less than one third of its original size. Photographs and line drawings should be prepared so they can be reduced to a size no greater than 17.3 cm x 22.7 cm, and should be planned to occupy either the full width of 17.3 cm or the width of one column, 8.4 cm. Figure legends should be placed on separate sheets and numbered in Arabic.

Figure keys must be placed within the figure, not outside. If this information cannot be placed within the figure, then include the key information in the Figure legend. DO NOT place grid lines on graphs or draw boxes around graphs. Tick marks should be placed on the inside of the axis.

- The resolution of *line art should be* 1000 dpi and of *halftones/grayscale*s 300 dpi if no lettering, 500 dpi if figure contains lettering or other lines.
- TIF is the preferred file format, but EPS, JPG, PDF, BMP, PPT or Word files are also acceptable.
- If multiple figures are supplied together in one file, each figure must be clearly labeled.
- If each figure is supplied in its own file, the file should be named according to its figure number and format (e.g., fig2btif).

Color figures may be included for an additional fee. They must be saved as CMYK-encoded images. Color figures have the same resolution requirements as B/W.

NOTE: Color illustrations will be reproduced in color only when the author agrees to cover the cost associated with reproduction and printing in color.

Literature Cited: References should be listed alphabetically at the end of the article. Abbreviations in this section should be those recommended in the *American Standard for Periodical Title Abbreviations*, available through the American National Standard Institute, 1430 Broadway, New York, NY 10018. For appropriate citation format, see examples below and recent issues of the Journal:

- *Journal*: Watts, R. J., M. S. Johnson & R. Black. 1990. Effects of recruitment on genetic patchiness in the urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia. Mar. Biol. 105:145-151.
- *Book*: Claudi, R. & G. L. Mackie. 1994. Practical manual for Zebra Mussel monitoring and control. Boca Raton, FL: CRC Press. 227 pp.
- *Chapter in Edited Book*: Davio, S. R., J. F. Hewetson & J. E. Beheler. 1985. Progress toward the development of monoclonal antibodies to saxitoxin: antigen preparation and antibody detection. In: D. M. Anderson, A. W. White & D. G. Baden, editors. Toxic dinoflagellates. Amsterdam: Elsevier. pp. 343-348.

Authorship and Personal Communications: All individuals listed as authors must have agreed to authorship before the manuscript is submitted. Authors must obtain approval from individuals cited as a “personal communication”. The text citation for personal communications should include initial and last name, institution and date.

Page Charges: Authors or their institutions will be charged \$100.00 US per printed page. All page charges are subject to change without notice. A handling fee of \$60 will be charged for all manuscripts accepted for publication.

Proofs: Page proofs are sent to the corresponding author and must be corrected and returned, via email or fax, within 72 hours. Alterations other than corrections of printer's errors may be charged to the authors.

Offprints: Offprints and PDF files of published papers are available at cost to the authors. Information regarding ordering reprints will be available from The Sheridan Press at the time of printing.

Cover Photographs: Appropriate photographs, in either color or black and white, may be submitted for consideration for use on the cover of the *Journal of Shellfish Research*.

Submission/Correspondence: T**Submission/Correspondence:** An electronic copy of each manuscript submitted for publication consideration should be sent via email to the Editor, Dr. Sandra E. Shumway, Department of Marine Sciences, University of Connecticut, 1080 Shennecossett Rd., Groton, CT 06340. E-mail: sandra.shumway@uconn.edu.

4. 3 - Artigo científico II

Artigo científico a ser encaminhado a Revista

Aquaculture Nutrition

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

Efeito da suplementação da dieta de juvenis de *Litopenaeus vannamei* com *Bacillus circulans* e *Bacillus subtilis* na atividade de enzimas digestivas e na comunidade de *Bacillus* spp. e *Vibrio* spp. do trato digestório dos camarões.

Joana Lyra Vogeley*

*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura,
Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author – contact information:

Phone: +55 81 3320-6524

Email: joanavogeley@hotmail.com

Resumo

Juvenis de *Litopenaeus vannamei* ($1,05 \pm 0,05\text{g}$) foram alimentados com dietas suplementadas com *Bacillus subtilis* e *Bacillus circulans* (10^6 UFC g^{-1}), conforme a seguir: ração + *B. subtilis* (BS); ração + *B. circulans* (BC) e ração sem bactérias (Controle). A cada 15 dias, amostras de hepatopâncreas, intestino e fezes foram coletadas para quantificação bacteriana e da atividade de enzimas digestivas no hepatopâncreas. Ao final de 45 dias, houve um aumento significativo no peso dos camarões alimentados com BS e BC em relação ao controle. Houve um aumento da concentração de *Bacillus* spp. e redução de *Vibrio* spp. no intestino e hepatopâncreas dos camarões, com diferenças estatísticas sobretudo nos tempos 30 e 45 dias, e um aumento significativo de *Vibrio* spp. nas fezes dos camarões da dieta BS. *B. subtilis* e *B. circulans* foram isolados do trato gastrointestinal dos camarões alimentados com BS e BC. Houve um significativo aumento da tripsina, quimotripsina, lipase e amilase no hepatopâncreas dos camarões alimentados com BC e BS, principalmente após 30 dias. Esse aumento pode ter sido ocasionado pela colonização de *B. subtilis* e *B. circulans* no trato digestório dos camarões, resultando em uma melhor digestão dos nutrientes da ração e consequente ganho de peso dos animais.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., *Vibrio* spp., tripsina, quimotripsina, lipase, amilase.

1. Introdução

A utilização de alimentos funcionais pode ser uma opção economicamente viável para a indústria da aquicultura, uma vez que as despesas com rações comerciais representam em torno de 40 a 60% dos custos total de produção (Olmo et al., 2011). Um alimento funcional pode ser definido como aquele que, quando consumido regularmente como parte de uma dieta padrão, promove benefícios à saúde, reduzindo o risco de doenças, e afeta benéficamente algumas funções fisiológicas (como o metabolismo enzimático), resultando em vantagens para além de seu papel nutricional básico (Doyon & Labrecque, 2008; Jensen et al. 2015).

Doenças infecciosas no cultivo de camarões permanecem sendo um obstáculo para a atividade e inúmeros países registram perdas devido a enfermidades causadas por bactérias do gênero *Vibrio* (Nakayama & Nomura, 2009; Pham et al. 2014). Para controle de *Vibrio* spp., o abuso de drogas antimicrobianas na aquicultura resulta em uma evolução na resistência de linhagens bacterianas potencialmente patógenas (Esiobu et al. 2002). Dessa forma, a utilização de alimentos funcionais que contribuam tanto para o incremento da saúde quanto para o da nutrição dos camarões pode ser uma alternativa promissora. Nesse sentido, a manipulação da microbiota intestinal através da suplementação da dieta com microrganismos benéficos (probióticos) é um novo enfoque para a prevenção de doenças e para os aspectos nutricionais dos camarões cultivados (Mohapatra et al. 2012, Newaj-Fyzul et al. 2014).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001). Entre os benefícios, estão a melhora do sistema imunológico do hospedeiro, o incremento do estado nutricional dos animais através da produção de enzimas digestivas e a redução da incidência de patógenos através do mecanismo de exclusão competitiva

(Verschuere et al. 2000, Vine et al. 2006). Entre as bactérias usadas como probióticos na aquicultura, as espécies do gênero *Bacillus* se destacam devido a características como a capacidade de controlar a proliferação de *Vibrio* spp., através da produção de compostos inibitórios (antibióticos naturais) e competição por nutrientes e locais de adesão, e a secreção de enzimas extracelulares (Ninawe & Selvin, 2009). Assim, *Bacillus* podem ser capazes de colonizar o trato gastrointestinal dos camarões e excluir potenciais patógenos como *Vibrio* (Rengpipat et al. 2000, Ravi et al. 2007, Li et al. 2007, Nakayama & Nomura 2009, Xu et al. 2013), tornar os camarões mais resistentes a infecções por *Vibrio* (Sapcharoen & Rengpipat, 2013) e produzir enzimas digestivas, contribuindo com a digestão do alimento e crescimento dos camarões (Liu et al. 2009).

Apesar dos benefícios mencionados sobre a contribuição de *Bacillus* na produção de enzimas digestivas, poucas pesquisas abordam o efeito dessas bactérias na atividade enzimática dos camarões, principalmente no tocante às proteases endógenas, como a tripsina e a quimotripsina. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da suplementação da dieta de juvenis de *Litopenaeus vannamei* com *Bacillus circulans* e *Bacillus subtilis* na comunidade de *Vibrio* spp. e *Bacillus* spp. do hepatopâncreas, intestino e fezes e na atividade das enzimas protease total, proteases específicas (tripsina e quimotripsina), amilase e lipase nos camarões.

2. Material e Métodos

2.1 Dieta experimental

As bactérias *B. subtilis* e *B. circulans*, provenientes do intestino de camarões selvagens da espécie *Farfantepenaeus subtilis*, foram utilizadas como potenciais probióticos nesse estudo devido a características como produção de enzimas e capacidade antagonista contra diferentes espécies de *Vibrio in vitro* (Capítulo 1). Dessa

forma, as dietas experimentais foram compostas de ração comercial (40% proteína bruta, Camaronina CR2, Purina®) suplementada com as bactérias *B. circulans* e *B. subtilis* numa concentração de 10^6 UFC g⁻¹ de ração. Para adição dos *Bacillus* à ração, as bactérias foram cultivadas separadamente em caldo triptona de soja (TSB - Himedia®) durante 48 h a 30 °C. Em seguida, as culturas dos *Bacillus* foram centrifugadas (4000 rpm, 15 min) e os sobrenadantes descartados. As células bacterianas decantadas foram homogeneizadas em água marinha estéril de forma a obter uma solução pura de cada *Bacillus*. Assim, a ração comercial, previamente esterilizada em vapor fluente (15 min), foi imersa nas soluções de *B. subtilis* e de *B. circulans* separadamente (1:2) durante 20 min. Posteriormente, as rações foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Após esse procedimento, a confirmação da concentração de *Bacillus* nas dietas foi realizada através da técnica de plaqueamento, onde uma amostra de cada ração foi serialmente diluída (1/10) em solução salina estéril (2% NaCl) e espalhada em Agar MYP (Mannitol-egg Yolk-polymyxin Agar - Himedia®). As rações experimentais foram estocadas (-6 °C) por no máximo cinco dias e a viabilidade de *Bacillus* spp. foi avaliada durante esse período. Uma ração controle foi feita sem adição de *Bacillus* utilizando os mesmos procedimentos.

2.2 Desenho experimental

Um total de 65 juvenis de *L. vannamei* (peso médio inicial de $1,05 \pm 0,05$ g) foi distribuído aleatoriamente em tanques retangulares de polipropileno (0,48 x 0,56 x 0,89 m) com volume útil de 100 l, aeração constante, salinidade de 24 g l⁻¹ e temperatura de 28-29 °C mantida através de aquecedores de imersão com termostato. Os camarões foram alimentados com as seguintes dietas experimentais: ração + *B. subtilis* (BS); ração + *B. circulans* (BC) e ração sem adição de bactérias (Controle), totalizando três

tratamentos com quatro repetições cada. As dietas foram ofertadas *ad libitum* três vezes ao dia durante 45 dias. Ao final do experimento foram avaliados o peso final, o ganho de peso (Peso final – Peso inicial), a taxa de crescimento específico ($[\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}] / \text{dias}$) x 100) e a taxa de sobrevivência ($\text{n}^\circ \text{ de camarões final} / \text{n}^\circ \text{ de camarões inicial}$) x 100).

2.3 Atividade de enzimas digestivas

O hepatopâncreas de amostras de camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais (BS, BC e C) foram coletados a cada 15 dias para avaliação da atividade das enzimas digestivas protease total (inespecíficas), proteases específicas, amilase e lipase, totalizando três coletas (15, 30 e 45 dias). Dessa forma, os hepatopâncreas de quatro camarões de cada réplica foram removidos de maneira asséptica e imediatamente congelados a -80 °C (Zhou et al., 2011). Posteriormente, os hepatopâncreas foram descongelados, pesados e homogeneizados em solução salina estéril (9% NaCl) numa proporção de 40 mg de tecido por ml. Esses homogeneizados foram centrifugados (10000 g) durante 25 min (4 °C) e os sobrenadantes obtidos foram utilizados como extratos brutos para quantificação das atividades enzimáticas dos camarões de cada dieta experimental. Todos os ensaios enzimáticos foram conduzidos em triplicata. A dosagem de proteína total solúvel nos extratos brutos foi determinada como descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão.

A quantificação da atividade proteolítica total (protease total) foi realizada por meio da hidrólise de 1% de azocaseína dissolvida no tampão Tris-HCl a 0,1 M e pH 8.0 (Garcia-Carreño, 1992). Três alíquotas (30 µL) dos extratos brutos de cada tratamento foram incubados em microtubos com solução de substrato azocaseína (50 µL) por uma hora a 25 °C, conforme protocolo adaptado de Bezerra et al. (2005). A reação foi

interrompida com a adição de ácido tricloroacético a 10% (240 μ L) e a mistura foi centrifugada a 8000 g por 5 minutos. Posteriormente, 70 μ L desse sobrenadante foram adicionados em uma microplaca com 130 μ L de hidróxido de sódio 1 M (solução reveladora). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Rad680) em um comprimento de onda de 450 nm. Um controle negativo (branco) foi feito com a substituição dos extratos brutos por solução salina (9% NaCl).

A quantificação da atividade da tripsina e quimotripsina (proteases específicas) foi realizada em microplacas com a utilização dos substratos específicos N α -benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BApNA) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA), respectivamente (Bezerra et al., 2005), os quais foram utilizados numa concentração de 8 mM. Assim, os extratos brutos de cada tratamento (30 μ L) foram incubados com 140 μ L de tampão (Tris-HCl 0,1 M, pH 8) e 30 μ L do substrato específico por um período de 15 minutos. Em seguida, as leituras de absorbância foram mensuradas e registradas por meio de um leitor de microplacas (Bio-Rad 680) em um comprimento de onda de 405 nm.

Para a determinação da atividade amilolítica, uma alíquota de 20 uL do extrato bruto de cada tratamento foi adicionada a microtubos contendo 125 uL de solução de amido (2%) e 125 uL de solução tampão (Tris-HCl 0,1 M, pH 8). Os microtubos foram incubados a 37 °C por 10 minutos e, posteriormente, a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, 30 uL dessa mistura foram inoculadas em novos microtubos com 300 uL de ácido dinitrosalicílico (DNSA), os quais foram incubados em banho seco a 100° C (Adaptado de Bernfeld, 1955). Posteriormente, a coloração desenvolvida foi avaliada através de espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução de maltose padrão.

A atividade lipolítica foi realizada a partir da preparação de uma solução A de palmitato (3 g de palmitato para 1 ml de isopropanol) e de uma solução B de tritonX-100 (2 g) e goma arábica (0,5 g) para cada 10 ml de tampão Tris-HCl (0,05 M). Após o preparo das soluções, a solução de palmitato foi homogeneizada com a solução de tritonX-100 e goma arábica (1/10), formando uma nova solução. Para o ensaio de quantificação da atividade, 900 uL dessa nova solução foram adicionados com 100 uL dos extratos brutos dos tratamentos em microtubos e aquecidos a 37 °C por 15 minutos. Dos microtubos foram retirados 200 uL, adicionados em microplaca e submetidos a leitura de absorbância em espectrofotômetro (410 nm).

2.4 Análises bacteriológicas

A cada 15 dias de período experimental, amostras de intestino, hepatopâncreas e fezes dos camarões dos diferentes tratamentos (dietas BS, BC e C) foram coletadas para quantificação de *Vibrio* spp. e *Bacillus* spp. através da técnica de plaqueamento, totalizando três coletas (15, 30 e 45 dias). Os intestinos e hepatopâncreas de quatro camarões de cada réplica foram assepticamente removidos, pesados, macerados, serialmente diluídos (1/10) em solução salina estéril (2% NaCl) e uma amostra foi inoculada em placas de petri contendo Agar MYP (Mannitol-egg Yolk-polymyxin Agar - Himedia[®]), para quantificação de *Bacillus* spp. e Agar TCBS (Agar Tiussulfato Citrato Bile Sacarose - Himedia[®]) para quantificação de *Vibrio* spp. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa (24 h, 30 °C) para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Além da quantificação de *Bacillus* spp. presentes no intestino e hepatopâncreas dos camarões, as Unidades Formadoras de Colônias crescidas no meio Agar MYP foram observadas quanto ao tamanho, formato da borda, textura, brilho e coloração de

forma a encontrar no trato digestório dos animais alimentados com as dietas BS e BC os morfotipos atribuídos às bactérias *B. subtilis* e *B. circulans* utilizadas neste estudo, respectivamente. Dessa forma, as bactérias que apresentaram essas características foram submetidas aos testes presuntivos para o gênero *Bacillus* (Coloração de Gram, Catalase e de formação de esporos) e identificadas através de testes bioquímicos (API 50 CH - Biomerieux®).

A cada 15 dias, três camarões de cada réplica dos respectivos tratamentos foram coletados para quantificação de *Bacillus* spp. e *Vibrio* spp. das fezes, totalizando três coletas (15, 30 e 45 dias). Após a alimentação e constatação de que o intestino dos animais encontrava-se repleto, os camarões foram lavados externamente com água marinha estéril e imediatamente transferidos para recipientes de 2 l estéreis. Os recipientes foram abastecidos com água marinha estéril e os animais permaneceram nessas novas unidades experimentais até o esvaziamento do intestino. Posteriormente, os animais foram devolvidos as parcelas de origem e as fezes foram coletadas para realização do procedimento de quantificação bacteriana. As fezes foram pesadas, maceradas, serialmente diluídas (1/10) em solução salina estéril (2% NaCl) e submetidas a técnica de plaqueamento para quantificação de *Vibrio* spp. e *Bacillus* spp., conforme descrito anteriormente.

2.5 Análise estatística

Os dados referentes ao crescimento dos camarões, quantificação bacteriana e atividade enzimática foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se as premissas necessárias. Em seguida, o teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os tratamentos.

3. Resultados

3.1 Crescimento

Ao final dos 45 dias de alimentação dos camarões com as dietas BS, BC e controle não houve diferença significativa na sobrevivência dos animais entre os tratamentos. No entanto, houve um aumento significativo no peso final (g), ganho de peso (g) e taxa de crescimento específico (%/dia) dos camarões alimentados com as dietas BS e BC, quando comparados ao grupo controle (Tabela 1).

Inserir Tabela 1.

3.3 Atividade de enzimas digestivas

As atividades das proteases (específica e inespecífica), lipase e amilase foram avaliadas no hepatopâncreas de *L. vannamei* alimentados com as dietas experimentais BC, BS e C a cada 15 dias de cultivo. Os camarões alimentados com a dieta BC apresentaram um aumento significativo na atividade das proteases inespecíficas (protease total) aos 30 e 45 dias, quando comparados aos camarões das dietas BS e controle (Fig. 1).

Inserir Figura 1

Em relação às proteases específicas (tripsina e quimotripsina), houve um aumento significativo na atividade da tripsina nos camarões alimentados com as dietas BS e BC nos tempos 30 e 45 dias, quando comparados ao grupo controle. Além disso, a atividade da tripsina foi significativamente maior nos camarões alimentados com a dieta BC, quando comparados aos animais alimentados com a dieta BS (Fig. 2). Da mesma

forma, houve um aumento significativo da atividade da quimotripsina nos camarões alimentados com as dietas BS e BC aos 30 e 45 dias, quando comparados ao grupo controle. Além disso, aos 45 dias, a atividade dessa enzima nos cultivados com as dietas BC e BS diferiram entre si, com maior atividade nos camarões alimentados com a dieta BC (Fig. 3).

Inserir Figuras 2 e 3.

A atividade da lipase aumentou significativamente nos camarões alimentados com a dieta BS no tempo 15 dias, quando comparados aos animais alimentados com BC e controle. Porém aos 30 e 45 dias de cultivo, houve um aumento significativo na atividade dessa enzima nos camarões alimentados com a dieta BC, quando comparados aos tratamentos BS e controle (Fig. 4).

Inserir Figura 4

Apesar de ambos os tratamentos BS e BC apresentarem um aumento significativo da atividade da amilase nos tempos 30 e 45 dias em relação ao grupo controle, os valores de atividade desta enzima foram significativamente superiores apenas nos camarões alimentados com a dieta BC (Fig. 5).

Inserir Figura 5.

3.2 Análises bacteriológicas

As dietas BS e BC permaneceram com células bacterianas viáveis de *B. subtilis* e *B. circulans*, respectivamente, na concentração determinada para o experimento (10^6

UFC g⁻¹ de ração) durante todo o cultivo. Além disso, aos 30 e 45 dias de cultivo, os morfotipos de *B. subtilis* e *B. circulans* foram observados nas placas de Agar MYP com amostras do intestino e hepatopâncreas dos camarões e identificados bioquimicamente, sugerindo que houve colonização dessas bactérias no trato digestório dos animais.

A quantificação de *Bacillus* spp. e *Vibrio* spp. foi realizada no intestino, hepatopâncreas e fezes de *L. vannamei* alimentados com as dietas experimentais BC, BS e C a cada 15 dias de cultivo. Houve uma maior concentração de *Bacillus* spp. no intestino dos animais alimentados com as dietas BC e BS em relação ao controle com diferenças estatísticas em todos os tempos avaliados (15, 30 e 45 dias), exceto entre o tratamento BC e controle no tempo de 15 dias (Tabela 2). Em relação ao total de *Vibrio* spp., houve uma redução significativa dessas bactérias no intestino dos camarões alimentados com a dieta BS, nos tempos 30 e 45, e com a dieta BC ao final dos 45 dias de experimento, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Inserir Tabela 2.

Em relação quantificação de bactérias no hepatopâncreas, houve um aumento significativo de *Bacillus* spp. nos camarões dos tratamentos BS e BC nos tempos 30 e 45 dias em relação a dieta controle (Tabela 2). Ao final do experimento foi observada uma redução significativa de *Vibrio* spp. no hepatopâncreas nos camarões alimentados com a dieta BS, enquanto que aqueles oriundos do tratamento BC não diferiram significativamente do grupo controle (Tabela 3).

Houve um aumento na concentração de *Bacillus* spp. nas fezes dos camarões tratados com as dietas BS e BC, mas sem diferença significativa quando comparados ao grupo controle nos diferentes tempos avaliados (Tabela 2). Por outro lado, houve um

aumento significativo de *Vibrio* spp. nas fezes dos camarões tratados com a dietas BC aos 30 dias e dieta BS em todos os tempos avaliados em relação ao controle (Tabela 3).

Inserir Tabela 3.

4. Discussão

A suplementação da dieta de juvenis de *L. vannamei* com *B. subtilis* e *B. circulans* resultou em um aumento significativo do peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico dos camarões. Diferentes pesquisas demonstram um incremento no crescimento dos camarões após adição de *Bacillus* spp. à dieta (Liu, et al., 2009; Keysami e Mohammadpour, 2012; Silva et al., 2013; Zokaeifar et al., 2014). Esses autores sugerem que o ganho de peso dos camarões pode ser devido à contribuição de bactérias probióticas na digestão do alimento através de um aumento da atividade de enzimas digestivas no animal promovido pelas células bacterianas, contribuindo com um melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta. De acordo com Ochoa e Olmos (2006) algumas bactérias podem participar do processo de digestão dos camarões pela produção de enzimas extracelulares como proteases, amilases e lipases, melhorando o crescimento do animal. De fato, em nosso estudo, houve um incremento significativo da atividade de enzimas digestivas nos camarões cultivados com *B. subtilis* (BS) e *B. circulans* (BC) adicionados à dieta, o que pode ter proporcionado o ganho significativo de peso dos animais.

Diante do exposto, as células de *B. subtilis* e *B. circulans* podem ter complementado a atividade das enzimas protease, amilase e lipase, melhorando a digestão e absorção dos nutrientes do alimento, uma vez que espécies de *Bacillus* são capazes de produzir enzimas extracelulares e de digerir uma variedade de carboidratos, lipídios e proteínas (Moriarty, 1998; Ochoa e Olmos, 2006; Gomez e Shen, 2008). Em

consonância com o presente estudo, a adição de *B. coagulans* à dieta de juvenis de *L. vannamei* também resultou em um aumento da atividade das enzimas amilase, lipase e protease e em um significativo ganho de peso dos camarões (Wang et al., 2012). Yu et al. (2008) adicionaram *Bacillus* a alimentação de *L. vannamei* e obtiveram um aumento das atividades de protease e amilase no hepatopâncreas, resultando em um maior ganho de peso e taxa de crescimento específico dos camarões.

Resultados semelhantes ao nosso no tocante a atividade enzimática também foram encontrados em estudos realizados por Wang et al. (2007) e Zhou et al. (2009). Apesar de haver um consenso entre essas pesquisas de que o incremento da atividade enzimática nos animais pode ter tido contribuição das células bacterianas de *Bacillus*, esses autores comentam que não foi possível distinguir entre as enzimas produzidas pelos camarões daquelas sintetizadas pelas bactérias, assim como em nosso estudo. Por outro lado, mesmo que os *Bacillus* contribuam com uma pequena parte da produção de enzimas, a presença de células bacterianas no trato gastrointestinal do hospedeiro também pode estimular a atividade de enzimas endógenas do camarão (Ziaei-Nejad et al., 2006; Wang et al., 2007; Zhou et al., 2009). Esse fato pode ainda justificar o significativo aumento das proteases específicas tripsina e quimotripsina nos camarões alimentados com as dietas BC e BS em nosso estudo, quando comparados ao grupo controle.

Nimrat et al. (2013) ao adicionarem *B. subtilis* à dieta de juvenis de *P. monodon* encontraram um significativo aumento na atividade da tripsina e ganho de peso nos camarões. A tripsina e a quimotripsina são as enzimas proteolíticas mais abundantes e as maiores responsáveis pela digestão das proteínas dos alimentos em camarões peneídeos (Lemos, 2000; Perea et al., 2012). Considerando que a proteína é o nutriente mais oneroso das rações e um fator limitante do crescimento dos camarões (Gimenez et

al., 2009), a utilização de suplementos alimentares que incrementem a atividade da tripsina e quimotripsina, como o uso de bactérias probióticas, podem contribuir para um melhor aproveitamento do alimento e consequente ganho de peso e redução de custos com rações comerciais.

De uma forma geral, nós observamos que houve um aumento na concentração de *Bacillus* spp. no intestino e hepatopâncreas dos animais alimentados com as dietas BC e BS durante todo o período experimental, sobretudo a partir de 30 dias, em relação ao grupo controle. Apesar de ter havido uma tendência de aumento de *Bacillus* spp. também nas fezes dos animais alimentados com dietas BC e BS, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, possivelmente devido a uma retenção dessas bactérias no trato digestório dos animais. Esses resultados nos levam a sugerir que o aumento significativo da concentração de *Bacillus* spp. foi devido a colonização de *B. circulans* e *B. subtilis* no trato digestório dos animais, uma vez que essas bactérias foram isoladas de camarões alimentados com as dietas BC e BS. Adicionalmente, as atividades das enzimas digestivas no hepatopâncreas dos camarões alimentados com as dietas BC e BS também aumentaram, sobretudo, a partir de 30 dias de cultivo, reiterando a sugestão de que *B. circulans* e *B. subtilis* podem ter contribuído para o metabolismo enzimático dos animais.

Diversas pesquisas relatam o aumento da concentração de *Bacillus* spp. viáveis no trato digestório dos camarões em diferentes fases de desenvolvimento após administração dessas bactérias através da dieta (Rengpipat et al., 2000; Balcazar et al., 2007; Nimrat et al., 2012). De acordo com Ziaei-Nejad et al. (2006), a composição natural da flora bacteriana do trato digestório de camarões marinhos pode ser modificada pelo fornecimento de bactérias probióticas através da alimentação, o que corrobora com o aumento da concentração de *Bacillus* spp. no intestino e

hepatopâncreas dos camarões alimentados com *B. circulans* e *B. subtilis*. Em estudo realizado por esses mesmos autores, a administração de *Bacillus* aumentou significativamente a proporção dessas bactérias em larvas e no trato digestório de pós-larvas de *Fenneropenaeus indicus*. Em outro estudo, Nimrat et al. (2012), encontraram um aumento do número de *Bacillus* sp. no trato digestório dos animais após adição dessas bactérias à alimentação de *L. vannamei*.

Após a administração de *B. subtilis* a *L. vannamei* através da dieta, Zokaeifar et al. (2012) isolaram esse *Bacillus* do trato digestório dos camarões após oito semanas de cultivo. O conceito de probiótico perpassa pela capacidade desses microrganismos colonizarem o trato digestório do hospedeiro (Vine et al., 2004), mesmo que seja de forma transitória. No entanto, poucas pesquisas relatam que as bactérias adicionadas ao cultivo como probiótico através da dieta foram isoladas do trato gastrointestinal dos camarões tratados. Além disso, de acordo com Newaj-Fyzul et al. (2014), pesquisas que demonstrem a viabilidade das bactérias probióticas após adição ao alimento são escassas. Em nosso estudo, nós identificamos o *B. circulans* e o *B. subtilis* no trato gastrointestinal dos camarões alimentados com as dietas BC e BS, respectivamente, e essas bactérias permaneceram viáveis na ração durante todo o período experimental. Esse fato pode ter contribuído para a colonização e aumento de *Bacillus* spp. no trato digestório dos camarões tratados.

Bactérias do gênero *Bacillus* podem inibir o crescimento de espécies de *Vibrio* spp. (Nakayama & Nomura 2009, Xu et al. 2013). A administração de *B. subtilis* através da dieta a juvenis de *L. vannamei* resultou em um aumento significativo da concentração de *Bacillus* spp. e redução de *Vibrio* spp. no trato digestório dos animais durante o cultivo (Zokaeifar et al. 2014). Silva et al. (2013), encontraram uma redução de *Vibrio* spp. tanto na água quanto em larvas e pós-larvas de *L. vannamei* após inclusão

de *Bacillus* spp. no cultivo através da água ou alimento. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo, onde houve uma redução de *Vibrio* spp. no trato digestório dos camarões alimentados com ambas as dietas contendo *Bacillus* ao longo do cultivo, com diferenças significativas da dieta controle nos tempos 30 e 45 dias. Esse decréscimo de *Vibrio* spp. pode ter sido devido ao mecanismo de exclusão competitiva entre as bactérias, uma vez que *Bacillus* spp. são capazes de produzir substâncias antimicrobianas e de competir com outras bactérias por nutrientes e locais de adesão (Moriarty, 1998; Verschuere et al., 2000). Sugere-se que o mecanismo de exclusão de *Vibrio* spp. por *Bacillus* spp. em nosso estudo pode ainda ser corroborado pelo aumento de *Vibrio* spp. encontrado nas fezes dos camarões alimentados com as dietas BC e BS.

Ainda que tenha havido uma redução de *Vibrio* spp. no intestino e hepatopâncreas dos animais alimentados com *B. circulans* e *B. subtilis*, concentrações elevadas de *Vibrio* spp. foram encontradas. De acordo com Gomez-Gil et al., (1998), a presença de *Vibrio* spp. no hepatopâncreas, por exemplo, não significa que o animal está doente. Recentemente, Zheng et al. (2016) avaliaram a concentração bacteriana em *L. vannamei* saudáveis e doentes em diferentes fases de desenvolvimento. Bactérias do gênero *Vibrio* foram encontradas tanto em camarões saudáveis quanto em doentes, mas ocorreram em maior abundância nos camarões enfermos, apontando para um crescimento descontrolado de *Vibrio* spp. devido à doença. Por outro lado, considerando que *Vibrio* spp. são bactérias consideradas oportunistas (Saulnier et al. 2000), o controle desses microrganismos se faz necessário.

Em nosso estudo foi possível observar algumas peculiaridades no efeito de *B. circulans* e *B. subtilis* nos camarões. Embora ambas as bactérias possam ter influenciado no aumento da atividade de enzimas digestivas e no controle de *Vibrio* spp., a bactéria *B. circulans* parece ter sido mais eficiente em contribuir com o

metabolismo enzimático dos camarões, considerando que houve um aumento significativo das atividades das diferentes enzimas digestivas avaliadas, quando comparadas aos animais das dietas BS e Controle. Já a bactéria *B. subtilis* parece ter sido mais eficiente na colonização do trato digestório e no controle de *Vibrio* spp., uma vez que identificamos um aumento significativo de *Bacillus* spp. no intestino dos camarões já nos primeiros 15 dias de cultivo e redução de *Vibrio* spp. no intestino, após 30 dias, e no hepatopâncreas, após 45 dias, quando comparados aos camarões das dietas BC e Controle. Essas observações nos levam a refletir sobre o potencial da elaboração de probióticos com uma mistura de diferentes espécies bacterianas. De acordo com Hao et al. (2014), a combinação de linhagens bacterianas pode resultar em um aumento ou prolongamento dos efeitos desejáveis do probiótico no hospedeiro. Por outro lado, pesquisas devem ser conduzidas de forma a avaliar a influência mútua entre as bactérias para garantir os benefícios e respostas esperadas nos camarões. Adicionalmente, parece ser a primeira vez que a espécie *B. circulans* é avaliada como probiótico no cultivo de camarões.

5. Referências

Balcázar, J. L. & T. Rojas-Luna. (2007) Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Curr. Microbiol., 55,409-412.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Doyon, M & Labrecque, J. (2008) Functional foods: a conceptual definition. British Food Journal, 110, 1133 - 1149.

Esiobu, N., Armenta, L. & Ike, J. (2002) Antibiotic resistance in soil and water environments. *Int. J. Environ. Health Res*, 12, 133–144.

FAO/WHO (2001) Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/> Acessado em 26/01/2016 às 17:33h.

Fuller, R. (1989) A review probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378.

Hao, K., Liu, J. Y., Ling, F., Liua, X. L., Lua, L., Xia, L., Wang, G. X. (2014) Effects of dietary administration of *Shewanella halotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 428-429, 141-149.

Jensen, L. B., Provan, F., Larssen, E., Bron, J. E., Obach, A. (2015) Reducing sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of farmed Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) through functional feeds. *Aquaculture Nutrition*, 21, 983-993.

Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, J., Guozheng, Y., Hong, H. (2007) Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol Lett.*, 29, 525–530.

Liu C.H., Chiu C.S., Lin P. L. & Wang S.W. (2009) Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20 from natto. *Journal Appl Microbiol*, 107, 1031-41.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., Mohanta, K.N. (2012) Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *J. Anim. Physiol. Anim.Nutr.*, 79, p. 405-430.

Moriarty, D. J. W. (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.

Nakayama, T., H. Lu & N. Nomura. (2009) Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, 679-684.

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H. & Austin B. (2014) Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11.

Ninawe, A.S. & Selvin, J. (2009) Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 43-66.

Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T. & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet. Microbiol.*, 159, 443-450.

Nimrat, S. Tanutpongpalin, P. Sritunyalucksana, K., Boonthai, T. & Vuthiphandchai, V. (2013) Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. *Aquacult Int*, 21, 655-666.

Ochoa-Solano, J. L. & Olmos-Soto, J. (2006) The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Aquaculture*, 23, 519-525.

Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J & Contreras, R. (2011) Functional Feed Assessment on *Litopenaeus vannamei* Using 100% Fish Meal Replacement by Soybean Meal, High Levels of Complex Carbohydrates and *Bacillus* Probiotic Strains. *Mar. Drugs*, 9, 1119-1132.

Pham, D., Ansquer, D., Chevalier, A., Dauga, C., Peyramale, A. Wabete, N. & Labreuche, Y. (2014) Selection and characterization of potential probiotic bacteria for

Litopenaeus stylirostris shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture*, 432, 475-482.

Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S. & Menasaveta, P. (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 191, 271–288.

Ravi, A.V., Musthafa1, K.S., Jegathammbal, G., Kathiresan K., & Pandian, S.K. (2007) Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*

Sapcharoen, P. e Rengpipat, S. (2013) Effects of the probiotic *Bacillus subtilis* (BP11 and BS11) on the growth and survival of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, larvae. *Aquaculture nutrition*, v.19, p. 946-954.

Saulnier, D.; Haffner, P.; Goarant, C.; Peva, L.; Ansquer, D. (2000) Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191, 133-144.

Silva, E.F., Soares, M.A., Calazans, N.F., Vogeley, J.L., do Valle, B.C., Soares, R. & Peixoto, S. (2013) Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.*, 44,13-21.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & Verstraete, W. (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655-671.

Vine, N. G., Leukes W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., Hecht, T. (2004) Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 27,319-326.

Vine, N.G., Leukes, W.D. & Kaiser, H. (2006) Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol.* 30, 404–427.

Wang, L.U & Che N, J.C. (2005) The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish Shellfish Immunol, 18,269-278.

Wang, Yan Bo. (2007) Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 269, 259–264.

Wang, Y., Ful, L. & Lin, J. (2012) Probiotic (*Bacillus coagulans*) cell in the diet benefit the white shrimp *Litopenaues vannamei*. Journal of Shellfish Research, 31(3), 855-860.

Yu, M.C., Li, Z.J., Lin, H.Z., Wen, G.L. & MA, S. (2008) Effects of dietary medicinal herbs and *Bacillus* on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Int. 17, 377-384.

Zheng, Y., Yua, M. Liu, Y., Sua, Y., Xub, T., Yub, M. Zhang, X. H. (2016) Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at different health statuses and growth stages. Aquaculture, 451, 163-169.

Zhou, X. A., Wang, Y. & Li, W. (2009) Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality,survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture, 287, 349-353.

Ziaei-Nejad, S.; Rezaei, M. H.; Takami, G. A.; Lovetti, D. L., Mirvaghefi, A. R. & Shakouri, M. (2006) The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252, 516-524.

Zokaeifar, H., Balcazar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N. (2012) Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive

enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 33, 683–689.

Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K. & Balcazar. J. L. (2014) Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 36, 68-74.

Tabela 1 – Crescimento e sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* (media $\pm$ EP) alimentados durante 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias.

Tratamentos	Dieta BS	Dieta BC	Dieta C
Sobrevivência (%)	98,0 $\pm$ 1,0	98,3 $\pm$ 1,7	94,7 $\pm$ 3,2
Peso final (g)	6,11 $\pm$ 0,08 ^a	6,35 $\pm$ 0,16 ^a	5,69 $\pm$ 0,12 ^b
GP (g)	5,06 $\pm$ 0,08 ^a	5,30 $\pm$ 0,16 ^a	4,64 $\pm$ 0,12 ^b
TCE (%/dia)	3,91 $\pm$ 0,03 ^a	4,00 $\pm$ 0,06 ^a	3,75 $\pm$ 0,05 ^b

Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0.05).

Tabela 2 – Log de *Bacillus* spp. (Média $\pm$ EP) no intestino, hepatopâncreas e fezes de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias.

Tratamento	BS	BC	C
15 dias			
Intestino	7,21 $\pm$ 0,21 ^a	6,13 $\pm$ 0,43 ^b	5,69 $\pm$ 0,43 ^b
Hepatopâncreas	4,86 $\pm$ 0,50	4,64 $\pm$ 0,52	4,57 $\pm$ 0,26
Fezes	5,28 $\pm$ 0,04	5,29 $\pm$ 0,20	5,01 $\pm$ 0,01
30 dias			
Intestino	7,26 $\pm$ 0,07 ^a	7,28 $\pm$ 0,17 ^a	6,22 $\pm$ 0,15 ^b
Hepatopâncreas	6,16 $\pm$ 0,05 ^a	5,61 $\pm$ 0,22 ^a	5,03 $\pm$ 0,09 ^b
Fezes	5,32 $\pm$ 0,27	5,19 $\pm$ 0,66	4,95 $\pm$ 0,07
45 dias			
Intestino	7,37 $\pm$ 0,19 ^a	6,75 $\pm$ 0,19 ^a	5,87 $\pm$ 0,17 ^b
Hepatopâncreas	6,89 $\pm$ 0,18 ^a	6,36 $\pm$ 0,04 ^a	5,37 $\pm$ 0,09 ^b
Fezes	6,34 $\pm$ 0,01	6,33 $\pm$ 0,24	5,70 $\pm$ 0,30

Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0.05).

Tabela 3 – Log de *Vibrio* spp. (Média $\pm$ EP) no intestino, hepatopâncreas e fezes de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias.

Tratamento	BS	BC	C
15 dias			
Intestino	8,18 $\pm$ 0,18	8,11 $\pm$ 0,09	8,43 $\pm$ 0,08
Hepatopâncreas	5,17 $\pm$ 0,28	4,79 $\pm$ 0,55	5,68 $\pm$ 0,20
Fezes	5,95 $\pm$ 0,14 ^a	4,83 $\pm$ 0,31 ^b	4,35 $\pm$ 0,37 ^b
30 dias			
Intestino	7,19 $\pm$ 0,34 ^a	7,52 $\pm$ 0,10 ^{ab}	8,11 $\pm$ 0,05 ^b
Hepatopâncreas	5,20 $\pm$ 0,11	5,56 $\pm$ 0,35	5,81 $\pm$ 0,21
Fezes	6,16 $\pm$ 0,20 ^a	6,26 $\pm$ 0,10 ^a	5,12 $\pm$ 0,18 ^b
45 dias			
Intestino	6,91 $\pm$ 0,09 ^a	7,19 $\pm$ 0,15 ^a	8,24 $\pm$ 0,03 ^b
Hepatopâncreas	4,30 $\pm$ 0,65 ^a	5,17 $\pm$ 0,14 ^{ab}	5,89 $\pm$ 0,14 ^b
Fezes	6,81 $\pm$ 0,07 ^a	6,50 $\pm$ 0,18 ^{ab}	5,92 $\pm$ 0,17 ^b

Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0.05).

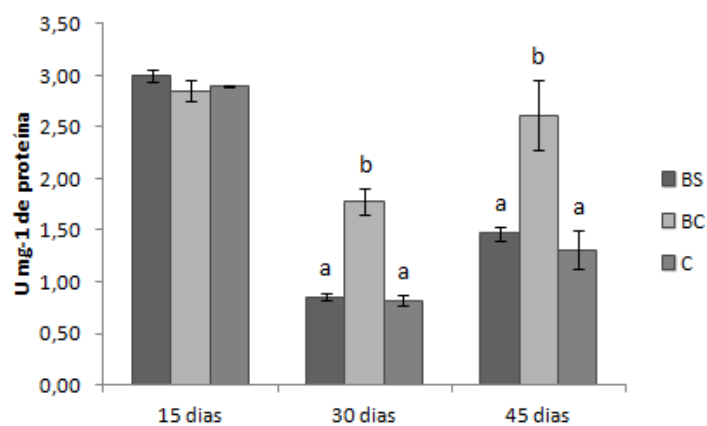


Fig. 1 – Atividade proteolítica total no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

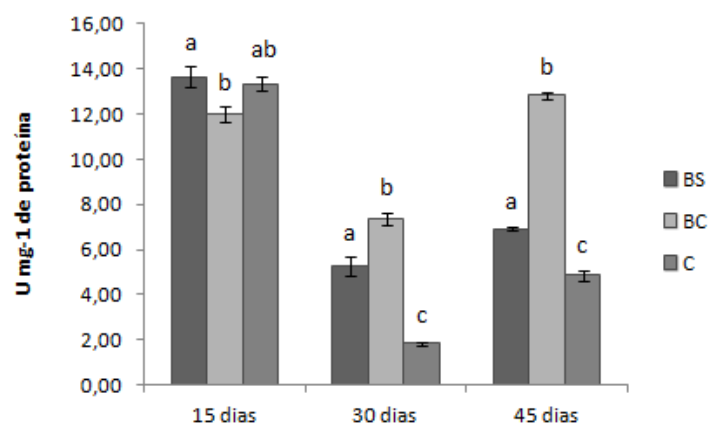


Fig. 2 – Atividade da enzima tripsina no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

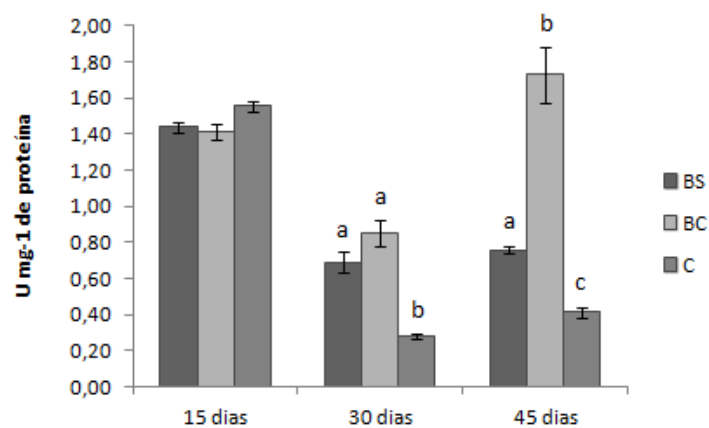


Fig. 3 – Atividade da enzima quimotripsina no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

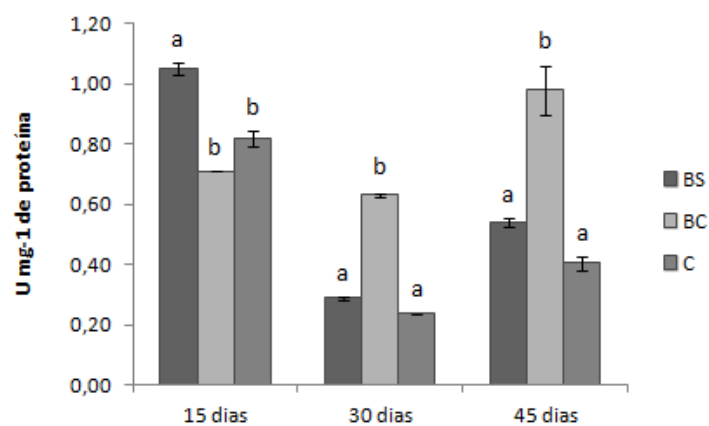


Fig. 4 – Atividade da enzima lipase no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

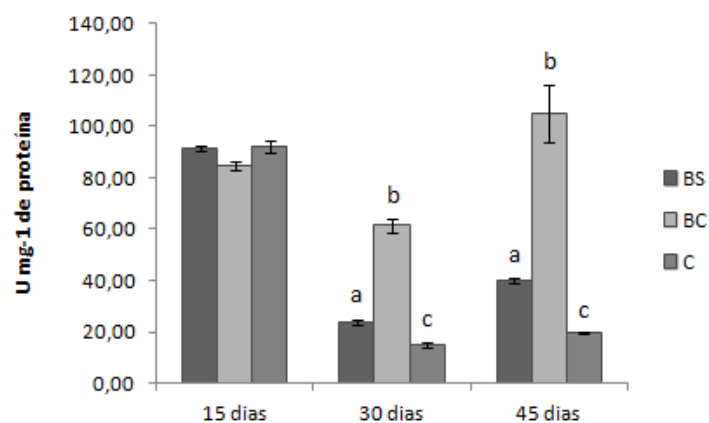


Fig. 5 – Atividade da enzima amilase no hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados ao longo de 45 dias com as dietas BS = ração + *Bacillus subtilis*; BC = ração + *Bacillus circulans* e C = ração sem adição de bactérias. Letras diferentes sobre as colunas em um mesmo tempo de cultivo indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

Normas da Revista *Aquaculture Nutrition**Preparation of the Manuscript*

All sections of the manuscript should be double-spaced and with 30mm margins. Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editor(s). Authors will receive prompt acknowledgement of receipt of their paper and a decision will be reached within 3 months of receipt. A manuscript should consist of the following sections:

Title page

This should include: the full title of the paper; the full names of all the authors; the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present addresses of the authors, if different from the above, should appear in a footnote); the name, address, and telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence and proofs should be sent; a suggested running title of not more than fifty characters, including spaces; and six key words to aid indexing.

Main text

Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgements, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and address given.

All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgements, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin.

Units and spellings

Système International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as g L⁻¹. Use the form g ml⁻¹ not g/mL. Avoid the use of g per 100g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the Concise Oxford Dictionary published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific names and statistics

Complete scientific names should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words. The generic name may subsequently be abbreviated to the initial, e.g. *Gadus morhua* L., otherwise *G. morhua*. Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

References (Harvard style)

References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hemre (1990). Joint authors should be referred to by et al. if there are more than two, e.g. Hemre et al. (1990).

More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers; journal titles should be abbreviated according to World List of Scientific Periodicals.

Lie, O., Lied, E. & Lambertsen, G. (1988) Feed optimization in Atlantic cod (*Gadus morhua*): fat versus protein content in the feed. *Aquaculture*, 69, 333-341.

Lall, S.P. (1989) The minerals. In: *Fish Nutrition* (Halver, J.E. ed.), 2nd edn, Vol. 1, pp. 219-257. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA.

Work that has not been accepted for publication and personal communications should not appear in the reference list, but may be referred to in the text (e.g. A. Author, unpubl. observ.; A.N. Other, pers. comm.). It is the authors' responsibility to obtain

permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript.

References in Articles

We recommend the use of a tool such as EndNote (<http://www.endnote.com/>) or Reference Manager (<http://www.refman.com/>) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Illustrations and tables

These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig. 1, Fig. 2, etc., in order of appearance. Three copies of each figure should be submitted and each figure should be marked on the back with its appropriate number, together with the name(s) of the author(s) and the title of the paper. Where there is doubt as to the orientation of an illustration the top should be marked with an arrow.

4. 4 - Artigo científico III

Artigo científico a ser encaminhado a Revista

Fish and Shellfish Immunology

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

Efeito da suplementação da dieta de *Litopenaeus vannamei* com *Bacillus* spp. isolados do intestino de camarões selvagens na expressão de genes da resposta imune antes e após infecção e desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

Joana Lyra Vogeley*

*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author – contact information:

Phone: +55 81 3320-6524

Email: joanavogeley@hotmail.com

Resumo

O desenvolvimento do cultivo de *Litopenaeus vannamei* continua limitado devido ao aumento de doenças. *Vibrio parahaemolyticus* é frequentemente relacionado a infecções e altas taxas de mortalidade no cultivo de camarões. O uso de probióticos é uma alternativa ao uso de antibióticos nos sistemas de cultivo. Entre os benefícios, a utilização de probióticos pode incrementar o estado imunológico dos camarões, tornando-os mais resistentes à doenças. As bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus circulans*, isoladas do intestino de camarões selvagens, foram adicionadas à ração comercial, perfazendo as seguintes dietas experimentais: ração + *B. Subtilis* (BS); ração + *B. circulans* (BC) e ração sem adição de bactéria (controle). Após 60 dias de cultivo, a quantificação da expressão de genes do sistema imunológico dos camarões foi realizada (proPO, LGBP e HEM). Além disso, os camarões foram infectados via injeção e desafiados via água com *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Após 24h, a expressão do gene proPO foi quantificada. O peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específico e expressão dos genes proPO, LGBP e HEM foram significativamente maiores ($p < 0.05$) nos animais alimentados com as dietas BS e BC. Contudo, não houve diferença estatística na expressão da proPO após infecção e desafio com *V. parahaemolyticus*. Por outro lado, os animais alimentados com a dieta BC tiveram uma maior sobrevivência após injeção ($p < 0.05$). Após desafio, houve uma redução de *Vibrio* spp. e significativo aumento de *Bacillus* spp. no intestino dos camarões alimentados com as dietas BC e BS. A suplementação da dieta de *L. vannamei* com *B. subtilis* e *B. circulans* contribuiu para um aumento no ganho de peso e redução de *Vibrio* spp. no intestino. O aumento da expressão do gene proPO nos camarões da dieta BC antes da infecção pode ter contribuído para uma maior resistência dos camarões ao *V. parahaemolyticus*.

Palavras-chave: Probiotico, Expressão genética, PCR, Pro-fenoloxidase.

1. Introdução

O desenvolvimento da indústria de cultivo de camarões marinhos, sobretudo a produção da espécie *Litopenaeus vannamei*, continua limitado devido ao aumento de doenças causadas por vírus ou bactérias (Wongsasak et al., 2015). Bactérias do gênero *Vibrio* estão frequentemente associadas ao surgimento de doenças nos camarões cultivados e a espécie *Vibrio parahaemolyticus* é comumente relacionada a infecções e altas taxas de mortalidade em *L. vannamei* (Kumar et al., 2014, Lomeli-Ortega et al., 2014). Nesse contexto, a prevenção de doenças é, atualmente, o maior desafio da carcinicultura (Hamza et al., 2015).

Para evitar o surgimento ou a proliferação de patógenos, o uso de antibióticos passou a ser uma prática comum entre os produtores (Moriarty, 1999). No entanto, essa medida resulta no desenvolvimento de patógenos mais resistentes e virulentos (Moriarty, 1999, Bachere, 2000). Dessa forma, um método alternativo que vem surgindo em detrimento do uso de antibióticos é a utilização de probióticos nos sistemas de cultivo. Probióticos podem ser definidos como “suplemento alimentar de microrganismos vivos que promove benefícios ao hospedeiro devido a uma melhora do balanço microbiano intestinal” (Fuller, 1989). Entre os benefícios, há um crescente interesse na utilização desses microrganismos para controle de patógenos ou para incremento do estado imunológico dos camarões, de forma a torná-los mais resistentes à doenças.

Para o controle de patógenos, o modo de ação desses probióticos é através da exclusão competitiva, onde esses microrganismos podem produzir compostos inibitórios e disputar com os patógenos por locais de adesão ou nutrientes (Verschuere et al. 2000).

No tocante à imunidade, os componentes da parede celular de microrganismos usados como probióticos, como fungos e bactérias, podem estimular o sistema imunológico dos camarões (Bachere, 2000).

O sistema imune dos crustáceos está relacionado à hemolinfa, que é constituída de plasma e hemócitos, os quais são responsáveis pelas respostas humorais e celulares, respectivamente (Vazquez et al., 2009). Entre as reações imunológicas dos camarões está o sistema de ativação da pró-fenoloxidase (sistema proPO), o qual desencadeia o processo de melanização induzido pela ação da enzima fenoloxidase (PO) em resposta a identificação de agentes estranhos pelos hemócitos (Soderhall e Cerenius, 1992; Pezzarolo e Barracco, 1997).

Bactérias do gênero *Bacillus* são potenciais para utilização na aquicultura devido à capacidade de produção de compostos antibióticos, secreção de enzimas e competição por espaço e nutrientes (Moriarty, 1998). Além disso, algumas pesquisas demonstram que a utilização de *Bacillus* na aquicultura pode promover um incremento na resposta imunológica dos camarões. Como exemplo, a utilização de *Bacillus* S11 proporcionou uma proteção contra *V. harveyi* através da ativação das defesas imunológicas humorais e celulares no camarão *Penaeus monodon* (Rengpipat et al., 2000).

Em estudo realizado por Li et al. (2009), houve uma maior resistência de *L. vannamei* à doença da mancha branca devido a um incremento nos diferentes parâmetros imunológicos promovido pela adição de *Bacillus* à dieta dos camarões. A inclusão de *B. subtilis* no cultivo de larvas de *L. vannamei* resultou em um aumento significativo da expressão do gene pró-fenoloxidase, vinculado ao sistema proPO, melhor desenvolvimento, sobrevivência e tolerância ao estresse (Liu et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da suplementação da dieta de juvenis de *L. vannamei* com espécies de *Bacillus* isoladas do

intestino de camarões selvagens na expressão de genes da resposta imunológica antes e após infecção e desafio com *V. parahaemolyticus*.

2. Material e Métodos

2.1 Linhagens bacterianas

As bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus circulans* utilizadas neste estudo foram previamente isoladas do intestino de camarões selvagens da espécie *Farfantepenaeus subtilis* devido a características como produção de exoenzimas e capacidade antagonista contra diferentes espécies de *Vibrio* (Capítulo 1). A espécie *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 foi utilizada para experimentos de infecção dos camarões via injeção intramuscular e de desafio via água.

2.2 Dieta experimental

As dietas experimentais foram compostas de ração comercial (40% proteína bruta, Camaronina CR2, Purina®) suplementada com as bactérias *B. circulans* e *B. subtilis* numa concentração de 10^6 UFC g⁻¹ de ração. Para tanto, as bactérias foram cultivadas separadamente em caldo triptona de soja (TSB - Himedia®) durante 48 h a 30 °C. Em seguida, as culturas dos *Bacillus* foram centrifugadas (4000 rpm, 15 min) e os sobrenadantes descartados. As células bacterianas decantadas foram homogeneizadas em água marinha estéril de forma a obter uma solução pura de cada *Bacillus*. Assim, a ração comercial, previamente esterilizada em vapor fluente (15 min), foi imersa nas soluções de *B. subtilis* e de *B. circulans* separadamente (1:2) durante 20 min. Posteriormente, as rações foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Após esse procedimento, a confirmação da concentração de *Bacillus* na dieta foi realizada através da técnica de plaqueamento, onde uma amostra de cada ração foi serialmente

diluída (1/10) em solução salina (2% NaCl) e espalhada em Agar MYP (Mannitol-egg Yolk-polymyxin Agar - Himedia®). As rações foram estocadas (-6 °C) por no máximo cinco dias e a viabilidade de *Bacillus* spp. foi avaliada durante esse período. Uma ração controle foi feita sem adição de *Bacillus* utilizando os mesmos procedimentos.

2.3 Desenho experimental

Um total de 65 juvenis da espécie *L. vannamei* (peso médio inicial de $1,05 \pm 0,05$ g) foram distribuídos aleatoriamente em tanques retangulares de polipropileno (0,48 x 0,56 x 0,89 m) com volume útil de 100 L, aeração constante, salinidade de 24g L⁻¹ e temperatura de 28-29 °C mantida através de aquecedores de imersão com termostato. Os camarões foram alimentados com as seguintes dietas experimentais, totalizando três tratamentos com quatro repetições cada: ração + *B. subtilis* (BS); ração + *B. circulans* (BC) e ração sem adição de bactéria (Controle). As dietas foram ofertadas *ad libitum* três vezes ao dia durante 60 dias. Ao final do experimento foram avaliados o peso final, o ganho de peso (Peso final – Peso inicial), a taxa de crescimento específico ($[\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}] / \text{dias} \times 100$), a taxa de sobrevivência ($(\text{n}^\circ \text{ de camarões final} / \text{n}^\circ \text{ de camarões inicial}) \times 100$) e a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico dos camarões dos respectivos tratamentos. Além disso, os camarões foram infectados via injeção intramuscular e desafiados via água com *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

2.4 Expressão relativa de genes do sistema imunológico

A hemolinfa dos animais foi utilizada para quantificação da expressão relativa de genes associados ao sistema imunológico dos camarões através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real (RT-PCR). A coleta de hemolinfa foi realizada ao

final dos 60 dias de alimentação dos camarões com as dietas experimentais BS, BC e C. Dessa forma, a hemolinfa de 32 espécimes de cada tratamento foi coletada do sinus ventral dos camarões com a utilização de uma seringa de 1 ml. A expressão relativa dos seguintes genes foi avaliada: Pro-fenoloxidase (proPO), proteína de ligação β -1,3-glucano (LGBP), Hemocianina (HEM) e o gene normalizador Beta-actina (ACT-controle). Os pares de primers específicos utilizados estão descritos na tabela 1.

Inserir Tabela 1.

A PCR em tempo real foi realizada usando o RNA extraído da hemolinfa para a construção das bibliotecas de cDNA, utilizando três *pools* para cada tratamento. O RNA total foi extraído da hemolinfa dos camarões utilizando Trizol (Invitrogen) e quantificado por análise espectrofotométrica em 260 e 280 nm através do Nanovue (GE Healthcare). A síntese de cDNA foi feita usando o *kit ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas de acordo com métodos descritos por Livak e Schmittgen (2001), assim como para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ e obtenção da quantificação relativa dos transcritos. O calibrador das reações foi o grupo não tratado com bactérias adicionadas à ração (Controle) para os transcritos com expressão aumentada ou diminuída mediante ao tratamento com bactérias (BC e BS).

As amplificações com *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) foram realizadas em um termociclador Step One Plus (Applied Biosystems) e as reações consistiram de 1 μ L of cDNA (5 ng), 12,5 μ L de *SYBR[®] Green* e 0,3 μ M de cada *primer* (concentração final) em um volume final de 25 μ L. RNA ribossomal 18S foi usado como controle interno. O ciclo térmico utilizado foi: (94°C - 1 min, 60°C -1 min) x 40

ciclos, seguidos de uma curva de dissociação. As curvas de dissociação foram analisadas para confirmar a especificidade das amplificações e todas as reações foram realizadas em triplicata.

2.5 Infecção via injeção

Após alimentação com as dietas experimentais durante 60 dias, dez camarões de cada tratamento foram mantidos nas mesmas condições para realização de um experimento de infecção através da injeção de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. O *V. parahaemolyticus* foi cultivado em caldo triptona de soja (TSB - Himedia[®]) durante 24 h a 30 °C. Em seguida, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado e uma solução de *V. parahaemolyticus* foi feita através da suspensão das células bacterianas decantadas em um volume de solução salina (0,9% NaCl) estéril (SS) correspondente a uma concentração de 10^8 UFC ml⁻¹, de acordo com a curva de absorbância (600 nm). Para infecção dos camarões, a solução de *V. parahaemolyticus* foi ajustada com SS para uma concentração de 10^6 UFC ml⁻¹ (solução de infecção). Dez camarões de cada tratamento foram injetados com 100 µl da solução de infecção no terceiro segmento abdominal. Um controle positivo (CP) foi realizado, onde animais não submetidos aos tratamentos com as dietas experimentais foram injetados com 100 µl de solução salina estéril para avaliar uma possível mortalidade devido ao procedimento de injeção. Durante o período de infecção, os camarões continuaram a ser alimentados com a respectiva dieta de cada tratamento. A infecção teve duração de 96 h e a cada 24 h a mortalidade foi avaliada.

Após 24 h de infecção, a hemolinfa dos camarões sobreviventes nesse período foi coletada para quantificação da expressão relativa do gene Pro-fenoloxidase (proPO), conforme descrito anteriormente. A hemolinfa dos camarões do controle positivo

também foi coletada para identificar uma possível mortalidade em decorrência do procedimento de coleta.

2.6 Desafio via água

Ao final dos 60 dias de cultivo com as dietas experimentais (BS, BC e C), 18 camarões de cada tratamento foram transferidos para três novas unidades experimentais (10 l) mantidas nas mesmas condições dos tanques de origem. Os camarões foram desafiados com a adição de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 na água de cultivo numa concentração de 10^6 UFC ml^{-1} . A solução de *V. parahaemolyticus* para inóculo na água de cultivo foi realizada conforme descrito anteriormente. Após 24 h de desafio via água, a hemolinfa de três camarões de cada replicação foi coletada para quantificação da expressão relativa do gene Pro-fenoloxidase (proPO), conforme descrito anteriormente. A mortalidade acumulada foi avaliada ao final de dez dias de desafio.

2.7 Quantificação bacteriana

Ao final do desafio com *V. parahaemolyticus* via água, amostras do intestino de três camarões de cada réplica foram coletadas para quantificação de *Vibrio* spp e *Bacillus* spp. A quantificação foi realizada através da técnica de plaqueamento. Os intestinos foram assepticamente removidos, macerados, serialmente diluídos (1/10) em solução salina estéril (2% NaCl) e inoculados em Agar MYP (Mannitol-egg Yolk-polymyxin Agar - Himedia[®]), para quantificação de *Bacillus* spp., e em Agar TCBS (Agar Tiussulfato Citrato Bile Sacarose - Himedia[®]) para quantificação de *Vibrio* spp. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa (24 h, 30 °C) para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

2.8 Análise estatística

Os dados referentes ao desempenho zootécnico, expressão de genes e quantificação bacteriana foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se as premissas necessárias. Em seguida o teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os tratamentos.

3. Resultados

3.1 Desempenho zootécnico

Durante todo o período experimental, as dietas BS e BC permaneceram com células bacterianas viáveis de *B. subtilis* e *B. circulans*, respectivamente, na concentração determinada para o experimento (10^6 UFC g⁻¹ de ração). Ao final dos tratamentos com as dietas experimentais, não houve diferenças significativas na sobrevivência dos camarões. No entanto, houve um incremento significativo no peso dos camarões alimentados com as dietas BS ($8,22 \pm 0,16$ g) e BC ($8,18 \pm 0,08$ g), quando comparados aos camarões da dieta controle ($7,68 \pm 0,12$ g). Da mesma forma, os camarões submetidos à dieta BS e BC apresentaram um maior ganho de peso e taxa de crescimento específico (Tabela 2).

Inserir Tabela 2.

3.2 Expressão relativa de genes do sistema imunológico

De acordo com os resultados da PCR em tempo real (RT-PCR), as dietas com adição de *B. subtilis* (BS) e *B. circulans* (BC) influenciaram na modulação da expressão de genes do sistema imunológico dos camarões. A expressão relativa do gene proPO foi significativamente maior nos animais alimentados com a dieta BC, quando comparados

aos camarões alimentados com BS e Controle (Figura 1). Quanto ao gene LGBP, os camarões alimentados com a dieta BS apresentaram um aumento significativo na expressão desse gene (Figura 2). Já para o gene HEM, houve um aumento significativo na expressão dos animais alimentados com as dietas BS e BC, quando comparados com a dieta Controle (Figura 3).

Inserir Figuras 1, 2 e 3.

3.3 Infecção e desafio com *V. parahaemolyticus*

Após 60 dias de alimentação com as dietas experimentais, os camarões foram infectados via injeção intramuscular com *V. parahaemolyticus*. Após 24 h de infecção, os animais alimentados com a dieta BC apresentaram uma significativa maior sobrevivência, quando comparados aos camarões da dieta BS e Controle (Figura 4). Em seguida, houve uma brusca queda na sobrevivência dos camarões. Após 96 h de infecção, apenas 15% dos camarões da dieta BC permaneceram vivos. Não houve mortalidade nos camarões do controle positivo quando injetados com solução salina estéril (0,9% NaCl) ou quando submetidos à coleta de hemolinfa.

Após alimentação dos animais com as dietas experimentais durante 60 dias, os camarões foram desafiados com *V. parahaemolyticus* via água. No entanto, não houve diferença significativa na sobrevivência dos camarões entre os tratamentos (Figura 5).

Inserir Figuras 4 e 5.

Após 24 h de infecção dos animais via injeção, não houve diferença significativa entre os tratamentos na expressão do gene proPO. No entanto, observamos um aumento

na expressão desse gene nos camarões das dietas Controle e BS (Figura 6), quando comparados a expressão da proPO nesses mesmos tratamentos antes da infecção (Figura 1). Já para a dieta BC, observamos uma estabilização da expressão da proPO após 24 h de infecção. Resultados semelhantes foram encontrados na expressão da proPO após 24 h de desafio com *V. parahaemolyticus* via água (Figura 7).

Inserir Figuras 6 e 7.

3.4 Quantificação bacteriana

Após dez dias de desafio dos camarões com *V. parahaemolyticus*, houve um aumento da concentração de *Vibrio* spp. no intestino dos camarões do grupo controle e uma redução nos camarões alimentados com as dietas BS e BC. No entanto, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Por outro lado, houve um aumento significativo de *Bacillus* spp. no intestino dos camarões alimentados com as dietas BC e BS, os quais diferiram entre si e em relação ao controle (Figura 8).

Inserir Figura 8.

4. Discussão

A adição de *B. subtilis* e *B. circulans* à dieta de *L. vannamei* contribuiu significativamente para o crescimento dos camarões, resultando em um maior ganho de peso e taxa de crescimento específico. Várias pesquisas demonstram que a inclusão de probióticos na alimentação dos camarões contribui para um melhor desempenho zootécnico dos animais (Gullian et al., 2004; Silva et al. 2013). Em pesquisa realizada por Balcazar et al. (2007), a adição de *B. subtilis* UTM 126 no cultivo de *L. vannamei*

resultou em um aumento significativo do peso e taxa de conversão alimentar. Assim como Wang et al., (2012) que avaliaram os efeitos de *B. coagulans* como suplemento em dietas oferecidas a *L. vannamei* e identificaram um maior ganho de peso e sobrevivência nos camarões. Recentemente, Jamali et al. (2015) concluíram que *Bacillus* podem incrementar as taxas de crescimento e sobrevivência de larvas de *L. vannamei*, uma vez que o enriquecimento de *Artemia urmiana* e *Brachionus plicatilis* com *B. licheniformis* e *B. subtilis* resultou em um maior comprimento, peso e sobrevivência dos camarões.

Além de contribuir com uma melhor performance de crescimento e sobrevivência, a adição de *Bacillus* à alimentação de *L. vannamei* também contribui com uma melhora do estado imunológico e resistência a doenças nos animais (Sapcharoen e Rengpipat, 2013). Estudos têm demonstrado que a utilização de bactérias probióticas pode beneficiar o sistema imunológico dos camarões cultivados através da avaliação de diferentes respostas como quantidade de hemócitos, atividade da enzima Fenoloxidase (PO), atividade fagocítica, atividade oxidativa, atividade de lisozima, concentração de proteínas no plasma, resistência a patógenos e expressão de genes associados ao sistema imunológico dos animais (Tseng et al. 2009, NavinChandran et al. 2014, Pattukumar et al, 2014, Wu et al., 2014, Ferreira et al. 2015).

Em nosso estudo, a suplementação da dieta de juvenis de *L. vannamei* com *B. subtilis* (BS) e *B. circulans* (BC) influenciou na modulação da expressão dos genes vinculados a resposta imunológica HEM, proPO e LGBP. Houve um aumento significativo na expressão do gene HEM nos camarões alimentados com a dieta BC e BS, quando comparados ao grupo controle. A Hemocianina é uma proteína presente na hemolinfa de artrópodes que é relacionada com o armazenamento e transporte de oxigênio, além de também está envolvida em outros processos fisiológicos como a

resposta imune do animal (Zhang et al., 2009). Já os genes proPO e LGBP estão relacionados ao sistema de ativação da pró-fenoloxidase (*sistema* proPO). Esse sistema é considerado uma importante ferramenta de resposta imunológica nos crustáceos, uma vez que é um dos mecanismos presentes na hemolinfa de reconhecimento e combate dos patógenos. O sistema proPO é ativado através de proteínas receptoras de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs) capazes de identificar o intruso via Lipopolissacarídeos ou Peptidoglicanos de bactérias e β -1,3-glucanos de fungos (Soderhall et al. 1998, Barraco et al. 2008).

No presente estudo, a expressão dos genes proPO e LGBP foi significativamente maior nos camarões alimentados com as dietas BC e BS, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Em pesquisa realizada por Wongsak et al. (2015), a adição de um prebiótico (β -glucan) e *B. subtilis* à dieta de *L. vannamei* promoveu um incremento na expressão do gene proPO. Segundo esses autores, o aumento da expressão da proPO estimulou a atividade da Fenoloxidase (PO), contribuindo para o estado imunológico do animal. Em outro estudo, Zokaeifar et al. (2012) ao suplementarem a dieta de juvenis de *L. vannamei* com *B. subtilis* encontraram uma melhor performance de crescimento, de resistência ao *V. harveyi* e atribuíram esses resultados a um incremento na resposta imunológica dos camarões promovido pelo aumento da expressão dos genes Peroxinectina (PE), Serino-protease (SP), LGBP e proPO.

Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Hao et al. (2014) ao adicionarem diferentes bactérias à dieta dos camarões, entre elas, *B. subtilis* isolados do intestino de *L. vannamei*, como aumento significativo do peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específico e da expressão dos genes LGBP e proPO. Segundo esses autores, o aumento da expressão da LGBP pode estar relacionado com uma maior

regulação do gene proPO e ativação do sistema proPO. A proteína de ligação Lipopolisacarídeo- e β -1,3-glucano (LGBP) é uma PRPs que reconhece e responde a intrusos microbianos, resultando na ativação do sistema proPO (Sritunyalucksana et al 2000). No entanto, ao final dos 60 dias de tratamento com as dietas BC e BS, nós não encontramos relação entre a expressão do gene LGBP com o gene proPO, uma vez que o significativo aumento da expressão da LGBP no camarões da dieta BS não influenciou a expressão do gene proPO. Assim como o aumento da expressão da proPO nos camarões da dieta BC não foi acompanhado por uma regulação do gene LGBP. Da mesma forma Chiu et al. (2007), ao suplementarem a dieta de *L. vannamei* com *Lactobacillus plantarum*, encontraram um significativo aumento da proPO e relacionaram a um estímulo da PO e consequente aumento da resistência dos camarões à infecção por *V. alginolyticus*. Contudo, os autores também não observaram um aumento da expressão da LGBP. De acordo com Vargas-Albores et al. (2000) a reação de ativação do sistema proPO não ocorre apenas na presença de proteínas de reconhecimento de padrões moleculares, como a LGBP.

Após 24h de infecção via injeção e desafio via água com *V. parahaemolyticus*, não houve diferenças significativas na regulação da expressão do gene proPO nos camarões dos diferentes tratamentos. No entanto, houve um aumento na expressão da proPO nos animais dos tratamentos BS e grupo Controle, quando comparados com a expressão desse gene antes da infecção e desafio. Essa regulação da expressão após a infecção e desafio com *V. parahaemolyticus* pode ter sido devido ao reconhecimento de Lipopolissacarídeos presentes na parede celular de bactérias gram negativas como as do gênero *Vibrio*, desencadeando a ativação do sistema proPO (Johansson and K. Soderhill, 1989).

Os animais submetidos à dieta BC tiveram uma sobrevivência significativamente maior após infecção dos camarões com injeção de *V. parahaemolyticus* (VP), quando comparada aos tratamentos BS e Controle. Essa maior sobrevivência foi observada até o final das 96h de infecção. Nos camarões alimentados com a dieta BC, a expressão da proPO manteve-se regulada antes e após a infecção. Esse fato nos leva a sugerir que a regulação da expressão da proPO antes da infecção contribuiu para uma melhor resposta dos camarões diante do patógeno, tornando-os mais resistentes ao *V. parahaemolyticus*. O aumento da expressão do gene proPO nos tratamentos BS e C apenas após a infecção parece não ter interferido na resposta desses camarões diante da infecção por *V. parahaemolyticus*.

Várias pesquisas demonstram uma maior resistência e sobrevivência dos camarões a infecções por espécies de *Vibrio* quando tratados previamente com probióticos (Vaseeharan e Ramasamy, 2003, Li et al., 2008, Chiu et al. 2007, Zokaeifar et al. 2012, Hao et al. 2014). Zokaeifar et al. (2014) demonstraram que após oito semanas de administração de *B. subtilis* a juvenis de *L. vannamei*, houve um aumento da expressão dos genes proPO, LGBP, PE e SP. Nesse estudo, após 24h de infecção os camarões foram significativamente mais resistentes à injeção de *V. harveyi* ATCC 14126, alcançando até 63,33% de sobrevivência quando comparados ao controle (20,00%). Em outro estudo, a adição de *Lactobacillus lactis* à dieta de *Marsupenaeus japonicus* resultou em um significativo aumento da sobrevivência dos camarões infectados com *Vibrio penaeicida* (Maeda et al. 2014). Camarões previamente tratados com mix de *Bacillus* através da dieta tiveram 33% de sobrevivência após injeção com *V. parahaemolyticus*, quando comparados com os camarões não tratados (9%) com *Bacillus* (Luis-Villasenor et al. 2013).

Em nosso estudo apesar de uma maior sobrevivência encontrada nos camarões do tratamento BC houve uma elevada mortalidade dos animais injetados com *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. *V. parahaemolyticus* têm sido frequentemente associados a infecções, doenças e altas mortalidades em organismos aquáticos (Joshi, 2014). De acordo com Martines Diaz et al. (2013), *V. parahaemolyticus* é um importante patógeno para camarões, é comum nos sistemas de aquicultura e a linhagem ATCC 17802 está mundialmente disponível. Em estudo realizado por esses autores, após 48h de infecção de *Artemia* com esse *V. parahaemolyticus* houve um rápido aumento na mortalidade dos animais, alcançando 50%. Em outro estudo realizado com *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, após 96h de infecção, larvas de *L. vannamei* infectadas com 10^6 UFC/ml apresentaram $59 \pm 4.9\%$ de mortalidade (Lomelí-Ortega et al. 2014).

Os camarões alimentados com as dietas BS e BC obtiveram uma maior sobrevivência após desafio com *V. parahaemolyticus* via água. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos. De acordo com Xia et al. (2015), a rota de infecção é o fator que mais contribui e resulta em mortalidade nos testes de desafios. Logo, apesar de ter havido elevada mortalidade dos camarões infectados com *V. parahaemolyticus* via injeção, a rota de infecção pode estar relacionada com uma menor mortalidade dos animais desafiados via água com a mesma bactéria.

Houve um incremento significativo na concentração de *Bacillus* spp. no intestino dos camarões alimentados com *B. circulans* e *B. subtilis*, sugerindo que estes *Bacillus* podem ter colonizado o trato digestório dos animais. Além disso, houve uma redução na concentração de *Vibrio* spp. no intestino dos camarões alimentados com as dietas BC e BS, quando comparados com o grupo controle. Estudos demonstram que após a oferta de *Bacillus* através da alimentação há um aumento na concentração de *Bacillus* spp. e

redução de *Vibrio* spp. no trato digestório dos animais (Zokaeifar et al. 2014). Esse fato pode ocorrer devido à competição entre as bactérias por nutrientes ou espaço (Moriarty, 1998; Rengpipat, et al., 1998; Verschuere et al., 2000).

Em estudo realizado por Luis-Villaseñor et al. (2011), espécies de *Bacillus* adicionadas a água foram capazes de aderir ao muco intestinal de *L. vannamei*. Boonthai et. al, 2011 demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* sp. isoladas do intestino de *Penaeus monodon* foram capazes de colonizar a água e o trato digestório desses animais sob condições de cultivo, reduzindo a concentração de *Vibrio* tanto no trato digestório quanto na água. Ke Li et al (2007) ao administrar *B. licheniformis* a juvenis de *L. vannamei* encontraram uma quantidade significativamente mais baixa de *Vibrio* spp no intestino desses animais.

Nossos resultados demonstraram que a suplementação da dieta de juvenis de *L. vannamei* com *B. subtilis* e *B. circulans* pode ter contribuído para o aumento no ganho de peso, redução de *Vibrio* spp. no intestino e melhora do estado imune dos animais, demonstrado pela regulação da expressão dos genes proPO, LGBP e HEM. O aumento da expressão do gene proPO nos camarões alimentados com *B. circulans* antes da infecção pode ter contribuído para uma maior resistência dos animais ao *V. parahaemolyticus*. Diante do exposto, as bactérias *B. subtilis* e *B. circulans* isoladas de camarões selvagens podem ser potenciais para utilização como probióticos na carcinicultura.

5. Referências bibliográficas

Balcázar, J. L. & T. Rojas-Luna. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Current Microbiology, v.55, p.409-412, 2007.

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

Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., Nimrat, S. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquac. Nutr.* 17:634–644, 2011.

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

Ferreira, G. S.; Bolívar, N. C.; Pereira, S. A.; Guertler, C.; Vieira, F. N.; Mouriño, J. L. P.; Seiffert, W. Q. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.448, p. 273–279, 2015.

Fuller, R. A review probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v.66, p.365-378, 1998.

Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.233, p.1-14, 2004.

Hamza, F., Kumar, A. R., Zinjarde, S. Antibiofilm potential of a tropical marine *Bacillus licheniformis* isolate: role in disruption of aquaculture associated biofilms. *Aquaculture Research*, p. 1–9, doi:10.1111/are.12716, 2015.

Hao, K., Liu, J. Y., Ling, F., Liua, X. L., Lua, L., Xia, L., Wang, G. X. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.428-429, p.141-149, 2014.

Jamali, H.; Imani, A.; Abdollahi, D., Roozbehfar, R., Isari, A. Use of Probiotic *Bacillus* spp. in Rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia (*Artemia urmiana*)

Enrichment: Effects on Growth and Survival of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Larvae. Probiotics & Antimicro. Prot., v.7, p. 118-125, 2015.

Johansson, M. W.; SijderhAl, K. Cellular immunity in crustaceans and the prop0 system. Parasitol. Today 5:171-176; 1989.

Ke Li, Zheng T.; Yun, T; Feng XI; Jianjun Y.; Guozheng Z.; Hong, H. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Biotechnol Lett, v.29, p.525-530, 2007.

Kumar, B. K.; deekshit, D. K.; Raj, J. R. M.; Rai, P.; Shivanagowda, B. M.; Karunasagar, I. Diversity of *vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. Aquaculture, v.433, p.247-251, 2014.

Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, J., Guozheng, Y., Hong, H. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Biotechnol Lett., v.29, p.525–530, 2007.

Liu, K. F., C. H. Chiu, Y. L. Shiu, W. Cheng & C. H. Liu. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol., v. 28, p.837-844, 2010.

Lomelí-Ortega, C. O.; Martínez-Díaz. S. F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. Aquaculture, v.434, p.208-211, 2014.

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

Luis-Villasenor, I. Thelma Castellanos-Cervantes, Bruno Gomez-Gil, Angel E. Carrillo-Garcia, Angel I. Campa-Cordova, Felipe Ascencio. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. World J Microbiol Biotechnol, v.29, p.257–265, 2013.

Maeda M. & A. Shibata & G. Biswas & H. Korenaga; T. Kono & T. Itami & M. Sakai. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) Intestine and Assessment of Immunomodulatory Role of a Selected Strain as Probiotic. Mar Biotechnol, v.16, p.181–192, 2014.

Martínez-Díaz, S. F. e Hipólito-Morales, A. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. Aquaculture 400–401, p.120–124, 2013.

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

NavinChandran, M.; Iyapparaj, P.; Moovendhan, S.; Ramasubburayan, R.; Prakash, S.; Immanuel, G.; Palavesam, A. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. Fish & Shellfish Immunology, v. 36, p. 38-45, 2014.

Pattukumar, V.; Kanmani, P.; Satish kumar, R.; Yuvaraj, N.; Paari, A.; Arul, V. Enhancement of innate immune system, survival and yield in *Penaeus monodon* reared in ponds using *Streptococcus phocae* PI80. Aquaculture Nutrition, v. 20, p. 505-513, 2014.

Perazzolo, L. M. e Barracco, M. A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Developmental & Comparative Immunology, Vol. 21, No. 5, p. 385-395, 1997.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth.

Aquaculture 167:301–313, 1998.

Sapcharoen, P. e Rengpipat, S. Effects of the probiotic *Bacillus subtilis* (BP11 and BS11) on the growth and survival of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, larvae. *Aquaculture nutrition*, v.19, p. 946-954, 2013.

Silva, E.F., Soares, M.A., Calazans, N.F., Vogeley, J.L., do Valle, B.C., Soares, R., Peixoto, S. Effect of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during larvae and postlarvae culture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.*, v.44, p.13-21, 2013.

Soderhall, K.; Cerenius, L. Crustacean immunity. *Annual Rev. of Fish Diseases*, p.23-23, 1992.

Soderhall. K.: Cerenius, L.: Johansson, M. W. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Primordial Immunity: foundations for the vertebrate immune system*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v.712, p.155-161, 1994.

Sritunyalucksana, K e Soderhall. K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, v. 191, p.53–69, 2000.

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

Vargas-Albores, F. e Yepiz-Plascencia, G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191, p.13–21, 2000.

Vaseeharan, B e Ramasamy, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol*, v. 87, p. 36:83, 2003.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & Verstraete, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v.64, p.655-671, 2000.

Wang, Y., Ful, L. & Lin, J. Probiotic (*Bacillus coagulans*) cell in the diet benefit the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, v.31(3), p.855-860, 2012.

Wongsasak U.; Chaijamrus S.; Kumkhong S.; Boonanuntanasarn S. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture*, v.436 p.179-187, 2015.

Xia, Q.; Baojie Wang; Mei Liu; Keyong Jiang; Lei Wang. A new method to evaluate the effects of bacterial dosage, infection route and *Vibrio* strain in experimental challenges of *Litopenaeus vannamei*, based on the Cox proportional hazard model. *Fish & Shellfish Immunology* v.46, p.686-692, 2015.

Zhang, Y.; Yan, F.; Hua, Z.; Zhao, X., Min, S.; Du, Z.; Zhao, S. Ye, X.; Li, Y. Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity. *Fish & Shellfish Immunology*, v.27, p.330–335, 2009.

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

Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K. & Balcazar. J. L. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi*

infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, v.36, p.68-74, 2014.

Tabela 1 – Primers específicos utilizados para quantificação relativa de genes associados ao sistema imunológico de *Litopenaeus vannamei*.

Primer	Sequência (5' – 3')	Referência
proPO F	CGGTGACAAAGTTCCTCTTCG	Lai et al., 2005
proPO R	TGCAGGTCGCCGTAGTAAG	
LGBP F	CATGTCCAACCTTCGCTTTCAGA	Cheng et al., 2005
LGBP R	GCTCCGTAGGGCCAGTTAC	
HEM F	CTTAGTGGTTCTTGGGCTTGTC	Cheng et al., 2005
HEM R	GGTCTCCGTCCTGAATGTC	
Beta-actina F	CCACGAGACCACCTACAAC	GenBank acesso nº: AF300705
Beta-actina R	TCCTTCTGCATCCTGTTCGG	

Tabela 2 – Crescimento e sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* cultivado durante 60 dias com *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus circulans* (BC) adicionados à dieta.

Tratamentos	Controle	BS	BC
Sobrevivência (%)	94,1 ± 3,4	96,1 ± 3,9	98,0 ± 2,0
Peso final (g)	7,68 ± 0,12 ^b	8,22 ± 0,16 ^a	8,18 ± 0,08 ^a
Ganho de Peso (g)	6,63 ± 0,12 ^b	7,17 ± 0,16 ^a	7,13 ± 0,08 ^a
Taxa de Crescimento Específico (%)	4,42 ± 0,03 ^b	4,57 ± 0,04 ^a	4,56 ± 0,02 ^a

Valores (media ± EP) com diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0.05).

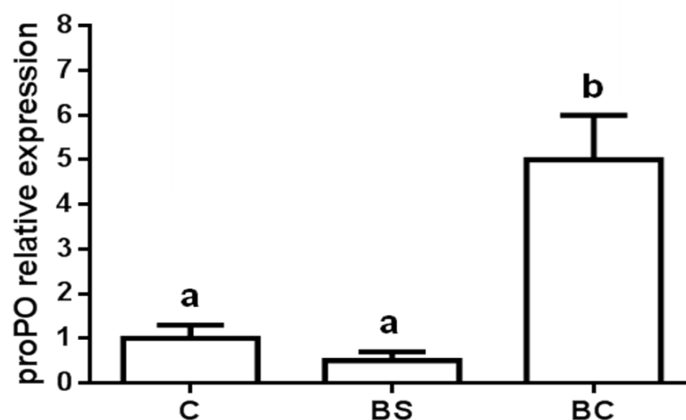


Figura 1. PCR em tempo real da expressão relativa do gene pró-fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados durante 60 dias com as dietas C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas.

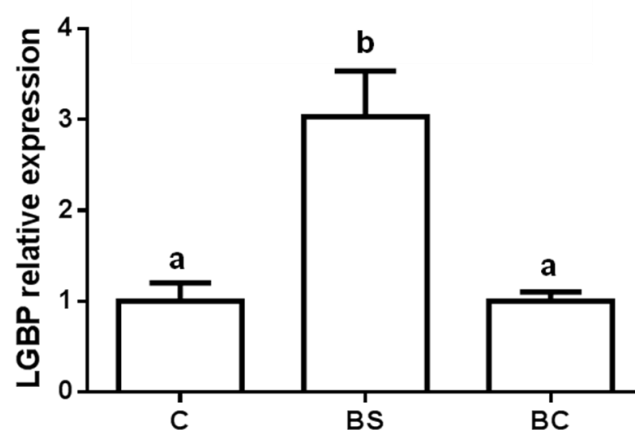


Figura 2. PCR em tempo real da expressão relativa do gene LGBP na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados durante 60 dias com as dietas C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas.

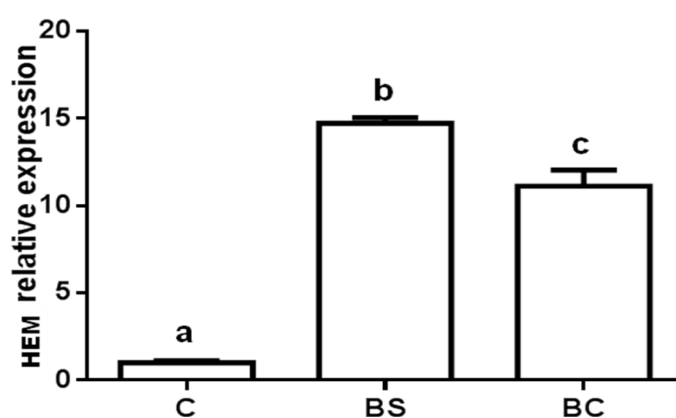


Figura 3. PCR em tempo real da expressão relativa do gene Hemocianina (HEM) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados durante 60 dias com as dietas C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas.

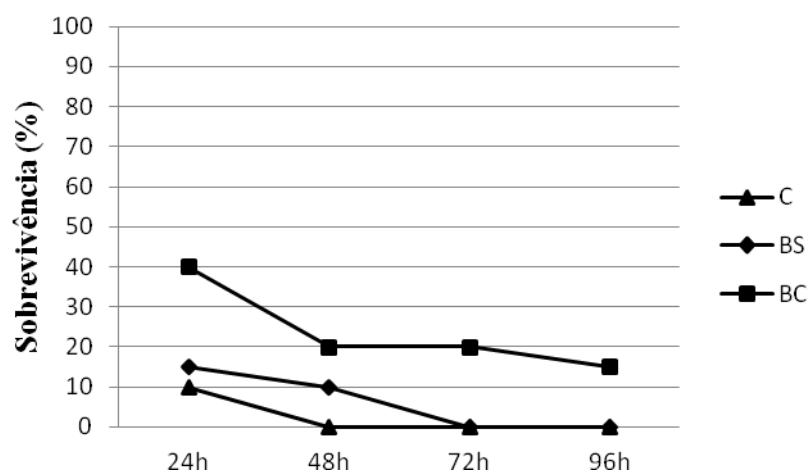


Figura 4. Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* durante 96h de infecção com *Vibrio parahaemolyticus* via injeção, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*.

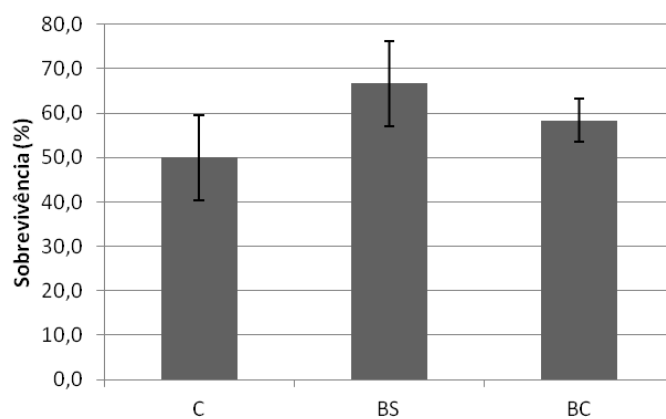


Figura 5. Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* após 10 dias de desafio com *Vibrio parahaemolyticus* via água, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*.

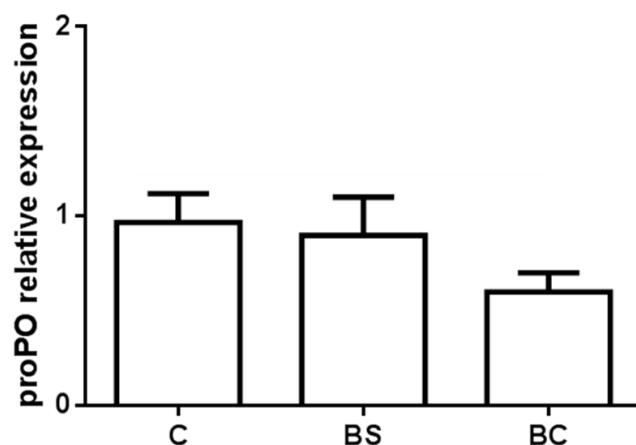


Figura 6. PCR em tempo real da expressão relativa do gene pró-fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* após 24h de infecção com *Vibrio Parahaemolyticus* via injeção, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média (n = 3) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas.

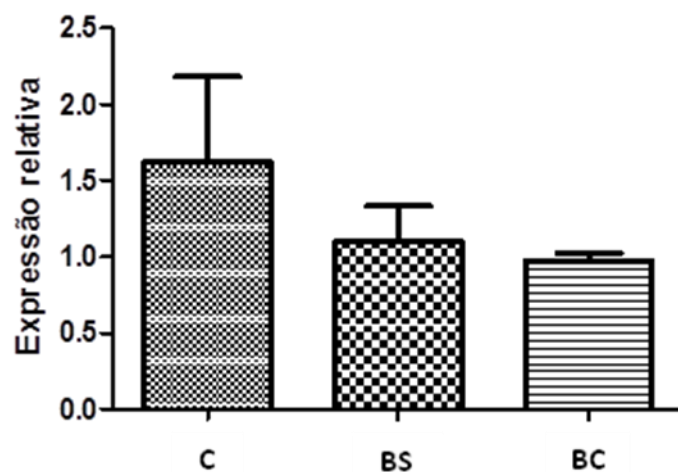


Figura 7. PCR em tempo real da expressão relativa do gene pró-fenoloxidase (proPO) na hemolinfa de *L. Vannamei* após 24h de desafio com *V. Parahaemolyticus* via água, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*. Todos os dados foram normalizados com o gene da β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas.

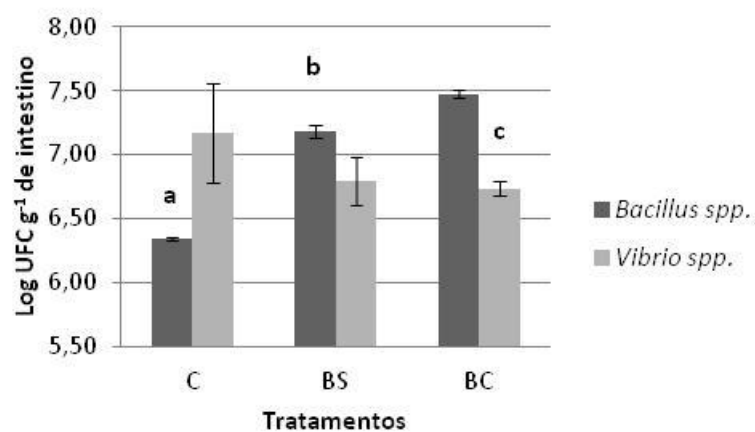


Figura 8. Concentração de *Bacillus* spp. e *Vibrio* spp. no intestino de *Litopenaeus vannamei* após 10 dias de desafio com *Vibrio parahaemolyticus* via água, onde C = ração sem adição de bactérias, BS = ração + *Bacillus subtilis* e BC = ração + *Bacillus circulans*.

4.3.1 Normas da Revista *Fish and Shellfish Immunology*

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement. Figures and tables embedded in text. Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing; do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. Examples: Reference to a journal publication: [1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. Reference to a book: [2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book: [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website: [4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).