



FÁTIMA LUSCHER ALBINATI

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
CANDIDATAS A PROBIÓTICO PARA UTILIZAÇÃO
EM CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO (*Litopenaeus
vannamei*, Boone, 1931)**

Feira de Santana, BA
2012

FÁTIMA LUSCHER ALBINATI

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
CANDIDATAS A PROBIÓTICO PARA UTILIZAÇÃO
EM CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO (*Litopenaeus
vannamei*, Boone, 1931)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Teshima

Feira de Santana, BA
2012

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Tecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Às professoras e colegas Dr^a Ana Paula Uetanabaro e Dr^a Elisa Teshima pela orientação e apoio.

Aos professores Alaise Gil Guimarães, Hélio Kamida, José Arlindo Pereira Pereira, João Carlos Teixeira Dias, Luís Gustavo Tavares Braga, pela participação na avaliação deste trabalho, pelas sugestões e pelas informações técnicas.

Ao pessoal que esteve comigo no laboratório nos quatro anos de trabalho, ajudando e principalmente dividindo as tantas alegrias e as muitas dificuldades. A lista é grande, espero não negligenciar ninguém: Patrícia, Vanessa, Annamaria e Tony, Denilson, Natiara, Nilmara, Irlane, Ana Cláudia, Joelandi, Thaise, Dalila, Marília Costa, Nara, Emanuelle, Priscila, Júlio, Ana Carla, Camilla, Milaine, Brisa, Marcielle, Emília e Verônica.

Às estagiárias voluntárias que estiveram mais próximas tanto no aprendizado como no trabalho, Tainá Chagas, Tainá bióloga, Joyce e Dilliany.

Às queridas alunas Carla Dantas, Ailana Correia e Sara Nascimento (*in memorian*), pelos incríveis e divertidos momentos de aprendizado.

Às amigas do cuscus com ovo no café da manhã, das conversas sérias e também divertidas D. Wilma e D. Joselita, pelo carinho e amizade.

Ao pessoal da portaria, Sr Nelson, D. Carmem, Sr Cardoso e Danilo, que esteve sempre presente, especialmente nos inúmeros fins de semana de trabalho pesado.

Aos amigos e colegas de doutorado pela convivência em especial aos que contribuíram em diferentes momentos, Carla, Carol, Catiane, Edna, Luciano, Sérly.

Aos meus filhos, netos, nora e genros pela compreensão e carinho.

Ao Bispo pelo companheirismo de sempre, incentivo constante e acima de tudo paciência incondicional.

À Deus sempre!

Resumo

A carcinicultura é uma atividade suscetível a doenças que podem levar a redução na produtividade e aumento na mortalidade, gerando perdas econômicas significativas para o setor. Os suplementos probióticos têm sido utilizados como alternativa para enfrentar esse problema e o uso de cepas probióticas, isoladas de camarões de cultivo ou de ambiente natural tem sido avaliado no controle de doenças na carcinicultura. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos da microbiota intestinal de camarões de ambiente marinho natural, caracterizar, selecionar e testar bactérias candidatas a probiótico que possam ser utilizadas na prevenção de doenças infecciosas e na melhoria do desempenho zootécnico do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*). A partir de amostras intestinais de camarão selvagem (*Penaeus schimitti*), coletadas no município de Santo Amaro da Purificação, Bahia, foram obtidos dezoito isolados de bactérias ácido lácticas, dos quais onze apresentaram coloração de Gram positiva, teste de catalase negativo e morfologia celular de coco ou cocobacilo. Todas as culturas foram testadas *in vitro* para resistência a acidez e sais biliares, sendo selecionados quatro isolados (PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20), submetidos a ensaios *in vivo* para avaliação de desempenho zootécnico de juvenis de camarão *Litopenaeus vannamei* e desafio frente ao *Vibrio harveyi*. Estes isolados foram identificados por biologia molecular e as espécies confirmadas pelo perfil de fermentação de carboidratos como sendo *Enterococcus faecium* (PURS17), *Enterococcus gallinarum* (PURS2, PURS8 e PURS20). Os parâmetros zootécnicos avaliados: taxa de sobrevivência, peso final, ganho de peso e biomassa final, não diferiram ($p > 0,05$) entre cepas probióticas. Após o desafio com *Vibrio harveyi* o nível de bactérias lácticas nos camarões não reduziu em nenhum tratamento e para bactérias heterotróficas totais houve redução significativa ($p < 0,05$) apenas para o controle positivo. Para *Vibrios* spp. foram detectadas reduções significativas ($p < 0,05$) em todos os tratamentos, exceto para o PURS8 (*E. gallinarum*). Estes resultados indicam uma resposta positiva das culturas probióticas PURS2, PURS20 (*E. gallinarum*) e PURS17 (*E. faecium*) na inibição do *Vibrio harveyi*. Após o desafio a taxa de sobrevivência dos camarões alimentados com dieta suplementada com *E. gallinarum* e *E. faecium* e no controle negativo foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo. A redução da população de vibrios e a maior taxa de sobrevivência nos camarões alimentados com dieta suplementada com as cepas probióticas podem relacionar-se entre si, possivelmente pela colonização do intestino e hepatopâncreas por estes microrganismos, por exclusão competitiva ou ainda por ação de bacteriocinas.

Palavras-chave: *Vibrio harveyi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, desempenho zootécnico, microbiota

Abstract

Shrimp farming is an activity susceptible to diseases that can lead to reduced productivity and increase mortality, generating significant economic losses for the sector. Probiotics supplements have been used as an alternative to solve this problem and the use of probiotic strains isolated from shrimp farming or natural environment has been evaluated to shrimp farming disease control. The aim of this study was to isolate microorganisms from the intestinal tract of natural marine environment shrimps, characterize, select and test possible probiotic bacteria that can be used in the prevention of infectious diseases and improving the growth performance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). From bowel samples of wild shrimp (*Penaeus schimitti*), collected in Santo Amaro da Purificação-Bahia, were isolated eighteen strains of lactic acid bacteria, which eleven was Gram-positive, catalase negative and coccus-rod shaped cell morphology. All cultures were tested *in vitro* for acidity and bile salts resistance, and four selected strains (PURS2, PURS8, PURS17 and PURS20), subjected to *in vivo* tests to evaluate growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* and challenged against the *Vibrio harveyi*. These strains were identified by molecular biology and species confirmed by carbohydrate fermentation profile as *Enterococcus faecium* (PURS17) and *Enterococcus gallinarum* (PURS2, and PURS8 PURS20). The performance parameters evaluated: survival rate, final weight, weight gain and final biomass did not differ ($P > 0,05$) between probiotics strains. After challenge with *Vibrio harveyi*, levels of lactic acid bacteria in shrimp was not reduced ($p > 0,05$) in any treatment and heterotrophic bacteria was significantly reduced ($p < 0.05$) only for the positive control. For *Vibrios* spp. were detected significant reductions ($p < 0.05$) in all treatments, except for the PURS8 (*E. gallinarum*). These results indicate a positive response of the probiotic cultures PURS2, PURS20 (*E. gallinarum*) and PURS17 (*E. faecium*) in inhibition of *Vibrio harveyi*. After challenge the survival rate of shrimp fed with *E. faecium* and *E. gallinarum* supplemented diet and the negative control was statistically superior ($p < 0.05$) compared to positive control. The reduced population of vibrios and higher survival rate in shrimp fed probiotic strains may be linked, possibly as a result of the intestine and hepatopancreas colonization by this microorganisms, by competitive exclusion or by action of bacteriocins.

Keywords: *Vibrio harveyi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, growth performance, microbiota

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVO	15
2.1.	OBJETIVO GERAL	15
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1.	ESTADO DA ARTE DA CARCINICULTURA NO BRASIL	17
3.2.	AS DOENÇAS DOS CAMARÕES E O USO DE ANTIBIÓTICOS	18
3.3.	PROBIÓTICOS	20
3.3.1.	Conceitos e considerações	20
3.3.2.	Probióticos avaliados para uso na aquicultura	22
3.3.3.	Seleção de bactérias candidatas a probiótico	24
3.3.4	Qualidade da água de cultivo de camarões	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1.	COLETA DAS AMOSTRAS	26
4.2.	ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO	26
4.2.1.	Isolamento de bactérias ácido lácticas	26
4.2.2.	Caracterização dos isolados quanto a morfologia celular, coloração de Gram, teste de catalase, fermentação de glicose e de outros carboidratos.	27
4.2.3.	Caracterização dos isolados como potenciais probióticos	28
4.2.3.1.	Teste de inibição frente ao patógeno <i>Vibrio harveyi</i>	28
4.2.3.2.	Resistência a baixos níveis de pH	29
4.2.3.3.	Resistência a presença de sais biliares	30
4.2.4.	Identificação Molecular	31
4.2.4.1.	Extração do DNA	31
4.2.4.2.	Amplificação, purificação e sequenciamento	32
4.2.4.3.	Análise dos resultados dos sequenciamentos	32
4.3.	MANUTENÇÃO DAS CEPAS	32
4.4.	ENSAIO <i>IN VIVO</i>	33
4.4.1.	Formulação e preparo das dietas experimentais	33
4.4.2.	Avaliação da eficiência e segurança da aplicação no cultivo	34
4.5.	MÉTODOS DE ANÁLISE DOS DADOS	36

5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMARÃO ..	37
5.2.	CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS	39
5.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS COMO POTENCIAIS PROBIÓTICOS	40
5.3.1.	Teste de inibição frente ao <i>Vibrio harveyi</i>	40
5.3.2.	Resistência a baixos níveis de pH	41
5.3.3.	Resistência a sais biliares	43
5.4.	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA (CLÁSSICA E MOLECULAR) DOS ISOLADOS PURS2, PURS8, PURS17 E PURS20	45
5.5.	ENSAIO <i>IN VIVO</i>	51
5.5.1.	Viabilidade celular das dietas experimentais	51
5.5.2.	Ensaio de crescimento	53
5.5.2.1.	Qualidade físico-química e microbiológica da água de cultivo	53
5.5.2.2	Desempenho zootécnico	57
5.5.3.	Ensaio de desafio com <i>Vibrio harveyi</i>	59
6.	CONCLUSÕES	63
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Contagem em UFC.mL ⁻¹ de bactérias heterotróficas em ágar Marine, vibrios em ágar TCBS e bactérias ácido lácticas em ágar MRS 2% PUR, para amostras de intestino de camarão selvagem (<i>Penaeus schimitti</i>)	37
TABELA 2.	Concentração celular em Log de UFC.mL ⁻¹ , dos isolados submetidos a diferentes pH (4,5; 4,0 e 3,5), no tempo zero (T0) e após três horas (T3) de exposição aos pH testados e variação ocorrida entre as médias (CV)	42
TABELA 3.	Viabilidade celular (UFC.g ⁻¹) dos isolados bacterianos (PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20) concentrados e inoculados nas dietas, avaliados no início e no final do período experimental de 44 dias	51
TABELA 4.	Salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água de cultivo de camarões <i>L. vannamei</i> alimentados com dietas com diferentes bactérias candidatas a probiótico ao final de 30 dias de experimento	54
TABELA 5.	Sobrevivência, peso final, ganho de peso, biomassa final de camarões alimentados com dietas com diferentes bactérias candidatas a probiótico	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Velocidade de crescimento específico (h^{-1}) dos isolados bacterianos em caldo MRS 2% com 0,3% e sem sais biliares	44
FIGURA 2.	Avaliação microbiológica da água dos diferentes tratamentos durante o período de ensaio de crescimento	55
FIGURA 3.	Contagem microbiológica das bactérias lácticas, víbrios e bactérias heterotróficas na água dos diferentes tratamentos antes e após o desafio com <i>Vibrio harveyi</i>	59
FIGURA 4.	Contagem microbiológica de bactérias lácticas, víbrios e bactérias heterotróficas nos camarões dos diferentes tratamentos antes e após o desafio com <i>Vibrio harveyi</i>	60

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	Formulação e composição centesimal da dieta experimental extrusada utilizada no ensaio de desempenho e desafio dos camarões	33
QUADRO 2.	Características morfológicas e fisiológicas das bactérias isoladas de amostras de intestino de camarão selvagem (<i>Penaeus schimitti</i>) e cultivadas em ágar MRS 2% PUR	39
QUADRO 3.	Fermentação dos carboidratos do kit API CH50 após 72h/37°C pelos isolados	47

LISTA DE ABREVIACÕES

ABCC	Associação Brasileira dos Criadores de Camarão
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Industrial
CHL	Meio MRS sem glicose, sem extrato de carne e com púrpura de bromocresol
CON	Controle negativo
COP	Controle positivo
CTAB	Tampão de extração (brometo de N-acetil-n-n-n-trimetilamônio com 100 mM Tris-HCl pH 8,1; 4 M NaCl; 2% CTAB; 20 mM EDTA; 1% PVP)
CV	Coeficiente de variao entre mdias
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization)
HET	Bactérias heterotrficas
IMNV	Vírus da Mionecrose Infecciosa
LAB/BAL	Bactérias cido lácticas
LAPEM	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia
LMR	Limites máximos de resíduos
MPA	Ministério da Pesca e da Aquicultura
MRS	Meio de cultura de Man, Rogosa e Sharpe
MRS 2%	Agar ou caldo MRS com 2% de NaCl
MRS 2% PUR	Meio gar MRS com 2% de NaCl; 0,004% de púrpura de bromocresol e 0,5% de carbonato de cálcio
NHP	Necrose hepatopancretica
NRC	National Research Council
OTC	Oxitetraciclina
PL₃₀	Pós larva de camarão com trinta dias de vida
PLs	Pós larvas de camarão
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes
PURS1	Bactéria n 1 isolada de intestino de camarão selvagem (<i>Litopenaeus schimitti</i>) em meio MRS com Púrpura de Bromocresol
PURS2	Bactéria n 2 isolada da mesma maneira que a n1
PURS3	Bactéria n 3 isolada da mesma maneira que a n1
PURS5	Bactéria n 5 isolada da mesma maneira que a n1
PURS6	Bactéria n 6 isolada da mesma maneira que a n1
PURS7	Bactéria n 7 isolada da mesma maneira que a n1
PURS8	Bactéria n 8 isolada da mesma maneira que a n1
PURS9	Bactéria n 9 isolada da mesma maneira que a n1
PURS10	Bactéria n 10 isolada da mesma maneira que a n1
PURS11	Bactéria n 11 isolada da mesma maneira que a n1
PURS12	Bactéria n 12 isolada da mesma maneira que a n1

PURS13	Bactéria nº 13 isolada da mesma maneira que a nº1
PURS15	Bactéria nº 15 isolada da mesma maneira que a nº1
PURS16	Bactéria nº 16 isolada da mesma maneira que a nº1
PURS17	Bactéria nº 17 isolada da mesma maneira que a nº1
PURS19	Bactéria nº 19 isolada da mesma maneira que a nº1
PURS20	Bactéria nº 20 isolada da mesma maneira que a nº1
PURS21	Bactéria nº 21 isolada da mesma maneira que a nº1
T0	Tempo logo após exposição dos inóculos aos níveis de pH (3,5; 4,0 e 4,5)
T3	Tempo de três horas após exposição dos inóculos aos níveis de pH (3,5; 4,0 e 4,5)
TCBS	Agar Thiosulfato Citrato Bile Sucrose
TSA/MAR	Agar Triptona de Soja preparado com água do mar filtrada e esterilizada por autoclavagem (121°C/15min)
TSB/MAR	Caldo Triptona de Soja, preparado com água do mar filtrada e esterilizada por autoclavagem (121°C/15min)
TSV	Vírus da Síndrome de Taura
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFC.mL⁻¹	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFC.g⁻¹	Unidades formadoras de colônia por grama
V.715	Cepa de <i>Vibrio harvey</i> adquirido da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Industrial (CBMAI)
v/v	volume/volume
VIB	Vibrios
WSSV	Vírus da Mancha Branca
YHV	Vírus da Cabeça Amarela
-	Negativa para reações que mantiveram a cor roxa até 72h de incubação no kit API 50 CH
(+)	Fracamente positiva para reações que mudaram de cor com 48h de incubação no kit API 50 CH
+	Positiva para reações que mudaram de cor com 24h de incubação no kit API 50 CH
+s	Lentamente positivas para reações que mudaram de cor com 72h de incubação no kit API 50 CH

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a FAO (2012), a produção mundial do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) ultrapassou 2,7 milhões de toneladas no ano de 2010, sendo a espécie de crustáceo mais cultivada no mundo.

No Brasil, a introdução de *Litopenaeus vannamei* no fim da década de 1980 trouxe grande impulso à carcinicultura marinha (PONTES; ARRUDA, 2005).

Os índices zootécnicos utilizados na criação do *Litopenaeus vannamei* no Brasil são: densidade de estocagem entre 30 e 40 pós-larvas/m²; sobrevivência de 60% a 75%; peso final de 8 a 12 gramas; conversão alimentar entre 1,5 e 1,7; número de cultivos por ano entre 2,5 e 2,8, em sistema semi-intensivo, o que leva a uma produtividade da ordem de seis toneladas/ha/ano. Nesse sistema, a ração participa com 65% a 80% dos custos totais (MADRID, WURMANN, 2011).

O cultivo semi-intensivo do *Litopenaeus vannamei* trouxe segurança, viabilizando técnica e economicamente a atividade, que passou por uma evolução excepcional com aumentos sucessivos de produtividade e produção, até o ano de 2003, quando, acometida de uma série de situações desfavoráveis, principalmente a infestação do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), enfrentou uma crise de grandes proporções (PONTES; ARRUDA, 2005, MADRID; WURMANN, 2011).

A carcinicultura é atividade em grande desenvolvimento e expansão no Brasil, tendo atingido em 2003 a produção de 90.190 toneladas, com destaque para os estados do nordeste. A Bahia acompanha esta tendência de desenvolvimento tanto no crescimento do número de produtores como nos problemas advindos de uma atividade cultural intensiva, como os problemas de manejo, de desempenho além dos problemas de sanidade (ABCC, 2005; SANCHES; PANNUTI; SEBASTIANI, 2008). Em 2003 havia 42 fazendas de cultivo de camarão no estado, ocupando cerca de 1800 hectares de área de viveiros, embora a quase totalidade da produção estivesse concentrada nos municípios de Valença e de Jandaira (SAMPAIO; COSTA; SAMPAIO, 2008).

Devido ao fato da carcinicultura ser um sistema de cultivo que se desenvolve essencialmente no ambiente aquático, o desempenho e a sanidade da cultura estão diretamente ligados à qualidade da água. Aliado a isto, o ciclo de vida dos camarões envolve várias fases, que vão dos estádios larvais (náuplio, protozoa, misis e pós-larva) aos juvenis e adultos, sendo que em cada uma das fases e a cada ecdise, os animais estão sujeitos a mudanças significativas, que ocasionam estresse adicional. As variações de fatores ambientais, que incluem temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido, compostos nitrogenados e a presença de agentes potencialmente patogênicos tornam a atividade sujeita ao aparecimento de doenças bacterianas como vibrioses e hepatopancreatite necrosante e virais como Vírus da Síndrome de Taura (TSV), o Vírus da Cabeça Amarela (YHV) e o Vírus da Mancha Branca (WSSV) (ABCC, 2005). As fases em que o camarão se apresenta mais suscetível merecem atenção redobrada, em especial a fase larval, quando os camarões ainda não apresentam uma microbiota intestinal definida, sendo esta fortemente influenciada pelas condições do meio aquático (BOYD, 2000, 2002; NUNES e MARTINS, 2002; DECAMP, 2004).

A intensificação das criações de camarão submete-os ao estresse que pode induzir o aparecimento de doenças, o acúmulo de sedimentos e a deterioração da qualidade da água de cultivo (WAINBERG, 2000).

A ocorrência de doenças infecciosas tem reduzido a produção em vários países do mundo nas últimas décadas, sendo que o recente retorno dos níveis de produção em áreas que se recuperaram da doença não tem sido suficiente para compensar as perdas nas áreas que ainda sofrem com surtos de doenças (KAUTSKY et al., 2000; SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003).

Entre os produtos utilizados como agentes profiláticos para se evitar as doenças dos camarões são empregados agentes quelantes, antifúngicos, vitamina C, carotenóides, ácidos graxos e antibióticos. No entanto, o uso de antibióticos de forma indiscriminada ocasiona problemas como danos ecológicos e danos à saúde humana, com o surgimento de resistência microbiana. Além disso, barreiras e restrições internacionais às exportações do camarão têm gerado forte pressão no sentido de buscar novas estratégias para o controle de doenças e o

fornecimento do camarão seguro para consumo (KAUTSKY et al., 2000; SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003).

Assim, surge o probiótico como tecnologia alternativa para estes problemas, através das modificações que podem ocasionar na microbiota dos animais, nos tanques e lagoas de cultivo e seu uso tem se tornado gradativamente reconhecido como importante para o controle de doenças em aquicultura, sem deixar resíduos na carcaça animal. Várias formulações microbianas têm sido comercializadas para a aquicultura, mas a diversidade da microbiota nos ambientes de criação torna a seleção de probióticos, para esta atividade, complexa e o uso dessas formulações contestado por alguns autores por falta de esclarecimentos quanto à sua eficácia. O uso de cepas probióticas, isoladas de camarões de cultivo como de ambiente natural, pode representar um avanço no controle de doenças na carcinicultura, especialmente na fase larval dos animais, reduzindo o impacto ambiental causado pelo uso indiscriminado de antibióticos (MORIARTY, 1998; GATESOUBE, 1999; VERSCHUERE et al., 2000).

A identificação de um (ou mais) microrganismo(s) candidato(s) a probiótico para camarão, capaz de promover a saúde animal e de contribuir para o incremento da eficiência zootécnica e da sustentabilidade ambiental, social e econômica da atividade é a principal justificativa deste trabalho, contribuindo com a geração de um potencial produto biotecnológico.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi, a partir de microrganismos da microbiota natural de camarões marinhos selvagens (*Penaeus schimitti*), encontrar bactérias candidatas a probiótico que possam ser utilizadas na prevenção de doenças infecciosas e na melhoria do desempenho zootécnico do camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar microrganismos da microbiota intestinal de camarões marinhos selvagens (*Penaeus schimitti*);
- b) Caracterizar e identificar molecularmente os microrganismos isolados;
- c) Selecionar, *in vitro*, espécie(s) bacteriana(s) que apresentem potencial probiótico quanto a capacidade de inibição da bactéria *Vibrio harveyi*, patogênica para o camarão *Litopenaeus vannamei* e quanto a resistência a baixos níveis de pH e presença de sais biliares;
- d) Testar, *in vivo*, em cultivo experimental de camarão *Litopenaeus vannamei*, os isolados bacterianos selecionados, sobre o desempenho zootécnico e a capacidade de colonização intestinal e de defesa contra o patógeno *Vibrio harveyi*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. 1. ESTADO DA ARTE DA CARCINICULTURA NO BRASIL

O cultivo de camarão marinho no Brasil, no âmbito empresarial, teve início nos anos 80, com a introdução da espécie exótica *Penaeus japonicus* (camarão japonês). Nos anos seguintes, devido a vários fatores adversos, entre eles a falta de um plano abrangente de pesquisa e validações tecnológicas, além de grandes dificuldades para garantir o desenvolvimento, a reprodução e a própria sobrevivência desta espécie em condições tropicais, levaram a um fracasso em sua domesticação, tendo a carcinicultura brasileira dirigido sua atenção para espécies nativas como, *Penaeus subtilis*, *P. schmitti*, *P. brasiliensis* e *P. paulensis*. Contudo, a baixa produtividade e pouca lucratividade dessas espécies fizeram com que, em 1993, se iniciasse o cultivo do *Litopenaeus vannamei*, espécie exótica com capacidade de adaptação às mais variadas condições locais de cultivo, o que contribuiu para elevá-la à condição de principal espécie da carcinicultura brasileira (ABCC, 2005).

Desde o final da década de 1980, a carcinicultura brasileira apresentou ritmo acelerado de crescimento, com taxas superiores a 60% ao ano, até o ano de 2003, quando atingiu a produção de 90.190 toneladas, com exportações de 58.455 toneladas e receita de US\$226,0 milhões (SANCHES; PANNUTI; SEBASTIANI, 2008). Essa curva de crescimento, no entanto, reverteu-se a partir de 2004, com uma queda acentuada na produção brasileira de camarões, devido a uma série de problemas de ordem econômica (ação “antidumping”, imposta pelos Estados Unidos, desvalorização do dólar) e sanitária (incidência de enfermidades e outros fatores adversos) (ROCHA, 2007; SUSSEL; VIEGAS; PARISI, 2010).

Este quadro persiste ainda hoje e o setor em 2010 direcionou toda sua produção para o mercado interno, que absorveu 97% da produção nacional de 80.000 mil toneladas, exportando apenas 2.000 toneladas com uma receita de US\$ 15 milhões (XIMENES; VIDAL; FEITOSA, 2011). De acordo com dados oficiais do Ministério da Pesca e da Aquicultura (MPA, 2012) em 2010, a produção aquícola marinha nacional foi de 85.058 t (69.422,4 toneladas de camarão) e o nordeste brasileiro continua sendo o maior produtor de pescado marinho, com 79,2% da produção brasileira, sendo que a Bahia produziu nesse ano mais de

seis mil toneladas de camarão marinho. Em 2011, o Brasil exportou apenas 108 toneladas num valor estimado em um milhão de dólares (ABCC, 2012).

3.2. AS DOENÇAS DOS CAMARÕES E O USO DE ANTIBIÓTICOS

A carcinicultura é uma atividade particularmente sensível à ocorrência de doenças e, em paralelo ao desenvolvimento de métodos de cultivo mais intensivos, tem havido em nível mundial uma maior incidência de patologias nas espécies cultivadas, comprometendo muitas vezes o sucesso da produção em larga escala (ALFONSO et al., 1997).

Bactérias patogênicas, como *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum* e *V. parahaemolyticus*, frequentemente estão associadas à mortalidade em larviculturas e viveiros de engorda. O uso de antibióticos tem sido empregado, resultando no aparecimento de cepas de bactérias resistentes a antibióticos nas criações de camarão (GULLIAN; THOMPSON; RODRIGUEZ, 2004).

O uso de antimicrobianos visando prevenir ou eliminar enfermidades na carcinicultura tem sido relatado, sendo a oxitetraciclina um dos compostos de uso mais frequente (MOHNEY et al., 1997; CRUZ-LACIERDA; DE LA PEÑNA; LUMANLAN-MAYO, 2000; BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002; BRAY et al., 2006; NOGUEIRA-LIMA; GESTEIRA; MAFEZOLI, 2006; LYLE-FRITCH; ROMERO-BELTRÁN; PAÉZ-OSUNA, 2006; LAVORANTE et al. 2009).

No Brasil o uso de antibióticos na piscicultura é baseado na Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999), que considera a aplicação de tetraciclina, eritromicina e oxitetraciclina. Nos camarões estes mesmos antibióticos são recomendados como profiláticos contra o agente da Necrose hepatopancreática (NHP) e em doenças causadas por bactérias psicrófilas (CARVALHO et al., 2009). Entretanto, no Guia Prático da Sanidade dos Animais Aquáticos publicado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais, o uso de biocidas é proibido em aquicultura (CARVALHO; PÉREZ; JARDIM s/d).

O Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado – PNCRC (BRASIL, 2012), tem o objetivo de fiscalizar e monitorar a utilização de substâncias danosas à saúde humana nos alimentos. Devido à ausência de legislação reguladora para a utilização de oxitetraciclina (OTC) na aquicultura brasileira, são adotados os limites máximos de resíduos (LMR) aprovados nos regulamentos internacionais. Para camarões um dos mais rigorosos critérios de avaliação de produtos alimentícios é estabelecido pelo mercado europeu, principal destino da produção brasileira, que adota um LMR de $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (LAVORANTE et al. 2009).

As alterações adversas na saúde e no desempenho de camarões marinhos cultivados são desencadeadas por desequilíbrios entre as condições ambientais dos viveiros, os agentes potencialmente patogênicos e a saúde geral dos camarões. Doenças causadas por agentes bióticos e abióticos interferem no estado imunológico dos camarões, podendo favorecer ataques de patógenos oportunistas, levando à debilitação e morte dos mesmos (NUNES; MARTINS, 2002). Ainda em 2011, a ocorrência de enfermidades nos cultivos apresenta-se como desafio significativo e a intensificação dos sistemas produtivos é a principal razão para esse problema (NATORI et al., 2011), situação reforçada por Flores-Miranda et al. (2011) que afirmaram que as doenças infecciosas são a maior preocupação e o principal fator limitante ao desenvolvimento da carcinicultura.

Esta situação tem alertado para a necessidade da criação de medidas profiláticas e terapêuticas mais eficazes, ambientalmente corretas e que não tragam risco à saúde humana. O controle de doenças na aquicultura exige, cada vez mais, uma abordagem efetiva e ambientalmente segura. O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos utilizados mundialmente tem estimulado a investigação de meios alternativos para o controle de patógenos, como por exemplo, o uso de microrganismos benéficos. De acordo com Fuller (1992), o uso de bactérias probióticas, baseado no princípio da exclusão por competição e/ou atuando como imunoestimulante, é um dos mais promissores métodos preventivos desenvolvidos na luta frente às doenças nos últimos anos. As restrições ao uso de antimicrobianos, mediante imposições legais, paralelo a uma maior conscientização quanto à necessidade de garantir produtos saudáveis e inócuos ao consumidor final, contextualizam a

importância do desenvolvimento e da utilização dos probióticos na carcinicultura (SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003).

3.3. PROBIÓTICOS

3.3.1 Conceitos e considerações

O conceito atual de probiótico mais utilizado é a de Fuller (1989), que o define como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro animal por melhorar seu balanço microbiano intestinal”. Salminen et al. (1999) propuseram defini-lo como “preparações de células microbianas ou componentes de células microbianas que tenham efeito benéfico na saúde e bem-estar do hospedeiro”, podendo ser viáveis ou não, sendo esta definição não restrita ao uso de probióticos no alimento.

Moriarty (1998) estendeu tais definições para a aquicultura, considerando a adição do probiótico (bactérias vivas) em tanques e lagoas nas quais os animais vivem, uma vez que estes microrganismos modificam a composição bacteriana da água e sedimentos, agindo não apenas como suplemento alimentar, mas também como aditivo à água. Relativo à aplicação na aquicultura, Gatesoupe (1999) propôs uma definição alternativa para probiótico: “células microbianas que são administradas de modo a penetrarem no trato gastrointestinal e se manterem vivas, com o objetivo de melhorar a saúde”. Este autor considerou a passagem das bactérias pelo trato digestivo como requisito obrigatório para serem classificadas como probiótico.

Verschuere et al. (2000) definiram probiótico como microrganismos vivos capazes de modificar a comunidade microbiana ambiental e a relação microrganismo-hospedeiro. O probiótico poderia atuar por: exclusão competitiva, melhora na eficiência alimentar, ação imunoestimulante no hospedeiro e maior resistência contra doenças. Em adição, proporcionaria uma melhor qualidade da água, através da degradação da matéria orgânica, conversão de amônia tóxica em nitritos, e estes em nitratos menos tóxicos.

Num ambiente aquático, hospedeiros e microrganismos compartilham o mesmo ecossistema, conseqüentemente, a comunidade bacteriana é facilmente influenciada por diversos parâmetros, incluindo a presença de outros microrganismos liberados pelas fezes dos animais, alimento, etc, que podem promover variações na densidade populacional de um patógeno. Os alimentos fornecidos são adicionados à água podendo adsorver bactérias (oriundas do próprio alimento), ou absorvê-las (quando presentes no ambiente aquático), antes de serem ingeridos pelos animais. Esses alimentos poderão causar a introdução de bactérias, incluindo as potencialmente patogênicas, no trato intestinal dos animais (DECAMP, 2004).

A alta densidade de animais por tanques de cultivo e em lagoas, prática bastante comum na aquicultura, contribui para a difusão de patógenos no meio ambiente aquático, que recebe regularmente alimentos ricos em proteína, ideal para o cultivo de bactérias. A interação entre microrganismos e seus efeitos nos animais e no meio ambiente de cultivo ainda permanece obscuro, resultando, frequentemente, numa abordagem incorreta dos problemas. Conseqüentemente, as doenças têm sido tratadas, muitas vezes, sem se estabelecer ou solucionar a causa primária (MORIARTY, 1999).

Relativo às considerações anteriores, pode-se inferir que conceituar o termo probiótico quanto à aplicação na aquicultura, requer abrir mão de conceitos pré-estabelecidos e considerar a complexa interação do meio aquático com os organismos e microrganismos nele presentes ou incorporados.

Geralmente, cepas probióticas são isoladas da microbiota nativa ou exógena de animais aquáticos. Bactérias anaeróbicas facultativas, Gram negativas, como *Vibrios* e *Pseudomonas* constituem a microbiota nativa predominante em variadas espécies de peixes marinhos (ONARHEIM et al., 1994). Bactérias produtoras de ácido láctico, que são prevalentes no intestino de mamíferos e aves (*Bifidobacterium* em humanos, *Lactobacillus* em suínos, roedores e aves e *Enterococcus* em carnívoros), são geralmente sub-dominantes em peixes e representados essencialmente pelo gênero *Carnobacterium* (RINGO e VADSTEIN, 1998).

Os probióticos apresentam como mecanismos de ação: a) a exclusão competitiva; b) a utilização de fontes de nutrientes e enzimas, disponibilizando-as e contribuindo para a digestão; e, mais recentemente admitido, c) a influência benéfica sobre a qualidade da água. Durante o ciclo produtivo dos camarões, níveis elevados de bactérias Gram-positivas podem minimizar o acúmulo de partículas de carbono orgânico dissolvido (o que é bem descrito para o *Bacillus* sp.), melhorando a qualidade da água, a sobrevivência e a velocidade de crescimento dos animais, além de incrementar o *status* sanitário dos juvenis e de reduzir a concentração de vibrios patogênicos no meio (DALMIN; KATHIRESAN; PURUSHOTHAMAN, 2001).

Assim, considerando todos esses aspectos, Mangoni et al., (2011), afirmaram que o uso de probiótico como aditivo na dieta transforma essa própria dieta em um alimento funcional que afeta positivamente o organismo que o consome.

3.3.2 Probióticos avaliados para uso na Aquicultura

Bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e leveduras têm sido os principais alvos de pesquisas para uso de probiótico na aquicultura, com inúmeros relatos bem sucedidos. Bacteriófagos, microalgas e imunoestimulantes também têm sido avaliados, apesar das discordâncias entre autores (IRIANTO e AUSTIN, 2002). Dentre as principais bactérias Gram-positivas testadas na aquicultura encontram-se espécies dos gêneros: *Bacillus* (RENGPIPAT et al., 1998; CHANG e LIU, 2002), *Carnobacterium* (JOBORN et al., 1997; ROBERTSON et al., 2000), *Enterococcus* (CHANG e LIU, 2002), *Lactobacillus* (NIKOSKELAINEN et al., 2001; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2005; PANIGRAHI et al, 2005), *Streptococcus* (LARA-FLORES et al., 2003), entre outras. Além disso, muitos produtos comerciais e culturas mistas contendo principalmente *Bacillus* spp. têm sido testados (ALFONSO et al., 1997; DEVARAJA; YUSOFF; SHARIFF, 2002; WANG; XU; XIA, 2005; DECAMP; MORIARTY, 2005). Em estudos anteriores, a exemplo de Toro (2005), Franco (2009) e Souza et al. (2010), estas bactérias, geralmente isoladas do trato digestivo de algumas espécies de peixes, crustáceos e mariscos, ou ainda da areia e água do mar, foram avaliadas *in vitro* e/ou *in vivo*, tendo sido, em alguns casos, encontrados bons resultados.

Do mesmo modo, bactérias Gram-negativas têm sido avaliadas quanto ao potencial como probiótico no cultivo de peixes e mariscos, destacando-se os gêneros *Aeromonas* (LATEGAN; TORPY; GIBSON, 2004), *Alteromonas* (ABRAHAM, 2004), *Pseudomonas* (BLY et al., 1997; VIJAYAN et al., 2006), *Roseobacter* (PLANAS et al., 2005) e *Vibrio* (SOTOMAYOR e BALCÁZAR, 2003).

Leveduras, principalmente as pertencentes aos gêneros *Saccharomyces* e *Phaffia* (SCHOLZ et al., 1999; LARA-FLORES et al., 2003), têm sido igualmente empregadas na aquicultura, sendo sua utilização, bastante comum em produtos comerciais.

Muitos estudos revelaram aspectos positivos na utilização de microrganismos probióticos, incluindo, por exemplo: redução do número de patógenos e melhora na qualidade da água (ALFONSO et al., 1997), melhora do apetite e/ou desempenho das espécies cultivadas (DECAMP e MORIARTY, 2005, VIEIRA et al., 2007), redução de mortalidade (MORIARTY, 1998; RENGPIPAT et al., 1998; VASEEHARAN e RAMASAMY, 2003, RAVI et al., 2007, VIEIRA et al., 2007), diminuição da microbiota patogênica intestinal (GULLIAN; THOMPSON; RODRIGUEZ, 2004, TORO, 2005), e maior resistência às doenças (PATRA; MOHAMED, 2003; SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003; ABRAHAM, 2004).

Por outro lado, a realização de novos estudos *in vitro*, e especialmente *in vivo*, é indispensável e de grande importância, uma vez que nem sempre foram observadas correspondências dos resultados, alertando à necessidade de constantes pesquisas que possibilitem um maior conhecimento da interação dos probióticos com diferentes espécies bacterianas (GRAM et al., 2001; PADILHA, 2005).

Buntin; Chanthachum; Hongpattarakere (2008) isolaram 160 culturas de bactérias ácido lácticas do trato gastro-intestinal de peixes, camarões e moluscos e os submetem a testes de resistência a sais biliares, a pH ácido e de atividade inibidora contra os patógenos humanos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. Do total de amostras isoladas, foram selecionadas três cepas, que foram identificadas a partir

de suas sequências de nucleotídeos como *Pediococcus pentosaceus* LM2, *Pediococcus pentosaceus* SL4 e *Enterococcus faecium* SF, como potenciais probióticos.

Flores-Miranda et al. (2011) avaliaram o uso de uma mistura de quatro cepas de bactérias ácido lácticas e uma levedura adicionadas à ração comercial oferecida para camarões submetidos a injeção com *Vibrio sinaloensis*. Os autores verificaram que os animais alimentados com a ração que continha a mistura probiótica, oferecida a cada três dias, apresentaram maior sobrevivência ao desafio com o patógeno e maior número de hemócitos totais.

3.3.3 Seleção de bactérias candidatas a probiótico

O critério utilizado na escolha de probióticos deve estar baseado no potencial de colonização das bactérias candidatas, na capacidade de competição e antagonismo contra patógenos, no efeito imunoestimulante e influência sobre o crescimento dos camarões (GATESOUBE, 1999; GOMEZ-GIL; ROQUE; TURNBULL, 2000). Gómez-Gil; Roque; Turnbull (2000) salientam que, para a seleção de bactérias probióticas para o uso em aquicultura, devem-se observar os seguintes passos: a) coleta de informações anteriores; b) aquisição de probióticos potenciais; c) avaliação do potencial probiótico na competição com as cepas patogênicas; d) avaliação da inocuidade do potencial probiótico para o animal hospedeiro; e) avaliação dos efeitos do potencial probiótico no organismo do hospedeiro; e f) análise econômica da relação custo / benefício.

É essencial o conhecimento dos mecanismos de ação para definir critérios de seleção para potenciais probióticos. Assim, mais informações das interações microrganismo/hospedeiro *in vivo* e o desenvolvimento de ferramentas de monitoramento (por exemplo, biologia molecular) são ainda necessárias para melhor compreensão da composição e funcionamento da microbiota nativa, tão bem como as culturas microbianas de probióticos (BALCAZAR et al., 2006). Aliado a isto, segundo recomendações de Toro (2005), há a necessidade de trabalhos de seleção de cepas isoladas de camarões nativos, próprios da costa brasileira, para verificação de suas propriedades probióticas e ação imunoestimulante.

Deve-se ainda levar em conta, na seleção das bactérias, que os probióticos podem ser administrados ao hospedeiro ou adicionados ao ambiente aquático de várias maneiras como: a) adição via alimento vivo (GOMEZ-GIL et al., 1998); b) por banho (AUSTIN et al., 1995; GRAM et al., 1999); c) adição à água de cultivo (MORIARTY, 1998; SPANGGAARD et al. 2001) e d) adição à dieta artificial (RENGPIPAT et al., 2000).

3.3.4 Qualidade da água de cultivo de camarões

Dentre os parâmetros de qualidade de água que interferem na homeostase do camarão no ambiente de cultivo, podendo levá-lo ao estresse crônico e à doença, destacam-se a concentração de oxigênio dissolvido, a variação de salinidade e de temperatura e o pH, sendo a concentração do oxigênio dissolvido na água a variável que mais influencia o bem-estar dos organismos aquáticos (BOYD, 2000).

Enquanto a concentração de oxigênio na água deve ser mantida acima de 4mg.L^{-1} (BOYD, 2002), como limite mínimo para o bem-estar dos camarões, a salinidade dos viveiros de camarão varia durante o ano e os principais fatores que afetam a concentração de sais na água nas fazendas de camarão marinho são a precipitação e a evaporação (VINATEA, 1997). Pillay (1990) relata que a espécie *L. vannamei* suporta salinidade de 0 a 50 g.L^{-1} , mas a faixa ideal de salinidade para o cultivo estaria entre 15 e 25 g.L^{-1} (VINATEA, 1997).

Em função da própria composição da água do mar, normalmente o pH da água de cultivo do camarão marinho mantém-se alcalino (HERNANDEZ; NUNES, 2001, CAMPOS et al. 2008).

Outro fator importante é a temperatura da água do cultivo, que pode variar diariamente e de acordo com a estação do ano e, sendo o camarão um animal pecilotérmico, mudanças bruscas ou frequentes da temperatura afetam seu metabolismo e podem induzir estresse. Costa et al. (2010) analisando parâmetros indicativos de qualidade de água em viveiros de camarão em Santa Catarina, observaram que a variação na temperatura da água dos viveiros entre $24,6$ e $29,3^{\circ}\text{C}$ favorece a manifestação da enfermidade da mancha branca em camarões *Litopenaeus vannamei*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e no laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) do Departamento de Ciências Biológicas, ambos da Universidade Estadual de Feira de Santana, além de contar com o apoio de uma unidade privada de aquicultura em Salvador, do proprietário Prof. Dr. Ricardo Albinati, que cedeu suas instalações para o estudo *in vivo* com os camarões.

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Para a seleção inicial de bactérias para o estudo foram coletadas amostras de camarão selvagem (*Penaeus schimitti*), com 80 exemplares, pescados em mar aberto nas proximidades da Fazenda Oruabo, da empresa Bahia Pesca, localizada no distrito de Acupe, município de Santo Amaro da Purificação, Bahia. Os animais foram abatidos por choque térmico, com imersão em água e gelo, conforme procedimentos estabelecidos para o abate comercial de camarão (PORTELA, 2009), sendo em seguida transportados sob refrigeração (caixa de isopor com gelo) ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Feira de Santana.

4.2. ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

4.2.1. Isolamento de bactérias ácido lácticas

As carcaças dos camarões foram enxaguadas com solução salina 0,85% estéril (RENGPIPAT et al., 2008) aspergidas com solução alcoólica 70% e escorridas por cinco minutos. Em seguida foram presas, utilizando alfinetes de aço estéreis, em placas de isopor, higienizadas com solução clorada a 20%, seguida de solução alcoólica 70% e secas ao ar. As carapaças foram abertas por um corte longitudinal na região dorsal, a musculatura foi cuidadosamente afastada e o trato intestinal retirado com o auxílio de pinça, sendo transferido para tubo de ensaio contendo solução salina 0,85% estéril. Cada tubo contendo 9 mL de solução salina recebeu o trato intestinal de 10 animais. Todo o material utilizado para a

retirada do intestino foi esterilizada previamente e, entre a abertura de cada carcaça, foi feita a imersão em solução alcoólica 70% seguida de flambagem em bico de Bunsen.

Com os tratos intestinais extraídos foram preparadas diluições seriadas (1:10) utilizando solução salina 0,85%. Foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-6} semeando alíquotas de 100 μL , em duplicata, nas placas previamente preparadas, utilizando a técnica do plaqueamento em superfície com espalhamento por alça Drigalsk. As placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 48h. Para o isolamento das bactérias ácido lácticas utilizou-se o meio seletivo ágar MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) adicionado de 2% de NaCl, 0,004% de púrpura de bromocresol e 0,5% de carbonato de cálcio (MARTINS et al. 2006; RENGPIPAT; RUEANGRUKLIKHIT; PIYATIRATITIVORAKUL, 2008).

4.2.2. Caracterização dos isolados quanto a morfologia celular, coloração de Gram, teste de catalase, fermentação de glicose e de outros carboidratos

Colônias isoladas do trato intestinal de camarão selvagem (*Penaeus schimitti*), com base na coloração desenvolvida pelas colônias em meio ágar MRS com adição de 2% de NaCl; 0,004% de púrpura de bromocresol e 0,5% de carbonato de cálcio (MRS 2% PUR), foram transferidas para caldo MRS com adição de 2% de NaCl (MRS 2%) e incubadas a 35°C por 24h. Em seguida, utilizando a técnica da semeadura por estrias, os caldos de cultura foram semeados em placas de ágar MRS 2% incubadas a 35°C por 48h para a verificação da pureza. As culturas puras foram avaliadas quanto à morfologia celular, coloração de Gram e teste de catalase conforme metodologia proposta por Silva; Junqueira; Silveira, 2001.

Para verificação da capacidade de produção de gás a partir da fermentação de glicose utilizou-se tubos contendo caldo MRS 2% ajustado para 5% de glicose e tubos de Durham invertidos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Os caldos foram inoculados com uma alçada das culturas ativadas por 24h a 35°C e, em seguida, incubados por 24h a 35°C.

Testes de fermentação de carboidratos foram realizados por meio de kits API CH 50 (BioMerieux – França). Para o preparo do inóculo, as culturas puras foram ativadas três vezes em caldo MRS 2%, sendo a última ativação feita em 20 mL de caldo MRS 2%. Após o crescimento cada cultura foi distribuída em tubos de centrífuga estéreis (50 mL) sendo

centrifugadas a 2560 $\times g$ por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pelete de cada cultura ressuspenso em 5 mL de solução tampão fosfato (pH 7,2) estéril, para lavagem das células. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e o concentrado celular foi ressuspenso em 5 mL do mesmo tampão e utilizado como inóculo. O inóculo foi ajustado para densidade óptica de $0,7 \pm 0,2$ em espectrofotômetro a 550 nm pela adição de gotas do inóculo inicial em 5 mL de água destilada. O dobro da quantidade de gotas do inóculo, ajustado para cada cultura, foi adicionado em 10 mL do meio CHL (MRS sem glicose, sem extrato de carne e com o indicador de pH púrpura de bromocresol, conforme metodologia descrita por Teshima, 2001. Cada suspensão bacteriana em meio CHL foi distribuída com o auxílio de micropipeta nos 50 poços das bandejas do kit API correspondentes as fontes de carbono, sendo os poços recobertos com óleo mineral para fornecer a anaerobiose, conforme orientação do fabricante. A alteração da cor do meio, de roxo para amarelo, indica que ocorreu produção de ácido a partir da respectiva fonte de carbono. As reações foram acompanhadas diariamente e os resultados anotados considerando-se: + reação positiva para aquelas que com 24h de incubação apresentaram mudança de cor, – negativa para as que se mantiveram com a cor roxa até as 72h de incubação, (+) fracamente positivas para as reações que apresentaram mudança de cor somente com 48h de incubação e +s lentamente positivas para as reações que apresentaram mudança de cor apenas com 72h de incubação.

4.2.3. Caracterização dos isolados como potenciais probióticos

4.2.3.1. Teste de inibição frente ao patógeno *Vibrio harveyi*

As culturas isoladas foram submetidas ao ensaio de inibição frente ao microrganismo patogênico *Vibrio harveyi* (V.715), adquirido da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, utilizando-se uma adaptação do método de Tagg e Mc Given (1971) conforme descrito por Toro (2005), onde discos de meio sólido semeados com as culturas isoladas após crescimento foram colocados sobre placas contendo meio recém inoculado com a bactéria patogênica, sendo em seguida incubados a 30°C por 24h.

Para o ensaio de inibição, as culturas isoladas foram reativadas três vezes em caldo MRS 2% (inóculo de 3% v/v) e incubadas por 24h a 35°C, obtendo-se a concentração de 10^9 UFC.mL⁻¹. Após a terceira ativação as culturas isoladas foram inoculadas por espalhamento com alça Drigalsk em placas de meio ágar MRS 2%, utilizando 100 µL e incubadas a 35°C/48h. Após incubação, pequenos fragmentos de forma circular (discos de gelose) de 6 mm de diâmetro foram feitos no ágar utilizando canudos descartáveis estéreis. Estes discos de ágar foram retirados cuidadosamente das placas utilizando palitos estéreis, sendo então colocados sobre placas de ágar Triptona de Soja (TSA/MAR) inoculadas com a cepa V.715 de *Vibrio harveyi*, sendo em seguida incubadas a 30°C/24h.

A cepa de *Vibrio harveyi* (V.715) foi reativada duas vezes (inóculo 3% v/v) em caldo Triptona de Soja (TSB/MAR), e incubada a 30°C por 18h. Após a segunda ativação o caldo de cultura contendo 10^7 UFC.mL⁻¹ foi inoculado por espalhamento com alça Drigalsk, utilizando 100 µL, em placas com ágar TSA/MAR.

Os meios de cultivo Triptona de soja (ágar e caldo) utilizados para o crescimento do *Vibrio harveyi*, foram preparados com água do mar filtrada, usando filtro de papel comum para eliminação de sujidades, sendo em seguida esterilizada por autoclavagem (121°C/15min) e denominados ágar TSA/MAR e caldo TSB/MAR.

A inibição do crescimento foi determinada pela presença do halo claro produzido ao redor do disco após 24h de crescimento. Os testes foram executados em triplicata.

4.2.3.2. Resistência a baixos níveis de pH

As culturas isoladas foram ativadas três vezes em caldo MRS 2% utilizando inóculo de 5% (v/v) e incubadas a 35°C por 24h. Testou-se a resistência das culturas após 3 horas de exposição a diferentes níveis de pH (3,5; 4,0 e 4,5) em caldo MRS 2% ajustados com HCl 0,2 M. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi transferida para 10 mL de caldo MRS 2% com o pH a ser testado. Foi feita a contagem em placa com meio ágar MRS 2%, utilizando a técnica do espalhamento para diluições seriadas (1:10) de 10^{-4} a 10^{-6} , no tempo zero e após três horas de exposição aos diferentes pH (MARTINS et al., 2006). Foram feitas três repetições. Para as

análises estatísticas, os dados de UFC.mL^{-1} foram submetidos à análise de variância para comparar os valores gerados nos tempos zero e após três horas de exposição, nos meios com os pH ajustados para 3,5; 4,0 e 4,5.

4.2.3.3. Resistência a presença de sais biliares

As culturas isoladas foram ativadas três vezes em caldo MRS 2% utilizando inóculo de 5% (v/v) e cultivadas a 35°C por 24h. Avaliou-se a resistência das culturas a sais biliares através de curvas de crescimento em caldo MRS 2% contendo 0,3% de sais biliares (bile bovina da Sigma) e caldo MRS 2% sem sais biliares, segundo metodologia descrita por NEWMANN e FERREIRA, 1995. Os meios inoculados foram incubados em banho-maria a 35°C por 24h e o crescimento avaliado a cada hora durante seis horas seguidas. Utilizou-se o espectrofotômetro da marca Biochrom, Mod. Libra S2 para leitura de absorbância em comprimento de onda de 580 nm. A cada tempo de leitura o equipamento foi zerado com caldo MRS 2% sem bile e com caldo MRS 2% com 0,3% de bile, de acordo com a cultura a ser avaliada. Foram realizadas três repetições para cada cultura e para cada condição de cultivo (com e sem bile).

Através dos dados de absorbância obtidos nas curvas de crescimento em meio com 0,3% de bile e controle, determinou-se a velocidade de crescimento específica (μ) para cada isolado utilizando a seguinte fórmula (TESHIMA, 2001):

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

onde:

$\ln x$ = logaritmo natural da absorbância do isolado no tempo t

$\ln x_0$ = logaritmo natural da absorbância do isolado no tempo zero

t = tempo (horas)

μ = velocidade de crescimento específica (h^{-1})

A velocidade de crescimento específica obtida nos meios foi analisada pelo teste “t”, ao nível de significância de 5% de probabilidade.

4.2.4. Identificação Molecular

4.2.4.1. Extração do DNA

Os isolados selecionados através de testes de resistência a sais biliares, a baixos níveis de pH e antagonismo frente ao patógeno *Vibrio harveyi* foram cultivados em tubos do tipo Falcon (50 mL), contendo 10 mL de caldo MRS 2% por 24 horas, a 35°C. As culturas foram centrifugadas a 2560 x g por 15 minutos a 4°C, descartando-se o meio de cultura sobrenadante.

O DNA genômico foi extraído conforme protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). Ao pelete bacteriano adicionou-se água ultrapura estéril, procedeu-se nova centrifugação a 12.000 x g por 10 min., com descarte do sobrenadante. Ao material resultante foi adicionado 650 µL de tampão de extração CTAB (brometo de N-acetil-n-n-n-trimetilamônio contendo 100 mM Tris-HCl pH 8,1; 4 M NaCl; 2% CTAB; 20 mM EDTA; 1% PVP) (ROGERS; BENDICH, 1994) previamente aquecido em banho Maria a 65 °C e macerado com esferas de vidro em aparelho Fast Prep™, por 30 seg. sob agitação de 4,5 m/s e, posteriormente, incubados a 65 °C por 60 min. Em seguida adicionou-se 650 µL clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) e incubou-se sob agitação em temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 x g por 20 min., sendo a fase líquida superior, contendo o material genético de interesse, coletado cuidadosamente e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. O DNA foi então precipitado (v/v) com isopropanol 100% gelado, centrifugado a 12.000 x g por 10 min., seguido pelo descarte total do isopropanol, sendo lavado com 1mL de etanol 70% refrigerado por três vezes. O etanol foi descartado e as amostras foram secas à temperatura ambiente. A ressuspensão do DNA foi feita com 55 µL água ultrapura previamente autoclavada. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da análise.

A análise quantitativa do material extraído foi realizada por meio de espectrofotometria em Nanodrop 2000 (Spectrophotometer/ Thermo Fisher Scientific™) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.2.4.2. Amplificação, purificação e sequenciamento

Os DNA genômicos extraídos dos isolados foram encaminhados para amplificação, purificação e sequenciamento na Macrogen (USA), sendo utilizados para amplificação dos fragmentos de 16S rDNA os primers universais 518F (5'- CCAgCAgCCgCggTAATACg - 3'), 800R (5'- TACCAgggTATCTAATCC -3'), 27F (5'- AgAgTTTgATCMTGGCTCAg -3') e 1492R (5'- TACggYTACCTTgTTACgACTT -3') .

4.2.4.3. Análise dos resultados dos sequenciamentos

O resultado foi recebido em eletroferogramas, que foram analisados quanto a sua qualidade e em seguida feito o alinhamento das sequências e montagem dos *contigs* utilizando o *software* SaqMan do pacote Lasergene 7.1.0 (BURLAND, 2000). As informações das sequências obtidas foram submetidas ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL, et al., 1997) (NCBI -<www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando as sequências de nucleotídeos como *input* (BLASTn), contra o base de dados *Nucleotide Collection (nr/nt)*.

4.3. MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Os isolados que apresentaram características de cocobacilos ou cocos Gram-positivos, catalase negativa, foram cultivadas em caldo MRS 2% por 24h a 35°C. Em seguida, a massa celular foi concentrada por centrifugação a 2560 *xg* por 15 minutos a 4°C. Cada pelete foi ressuspendido em tampão fosfato pH 7,2 e novamente centrifugado nas mesmas condições por duas vezes para lavagem. Em seguida, foram ressuspendidos em caldo MRS. Alíquotas destas culturas foram transferidas para tubos de criopreservação contendo 10% de glicerol (solução a 20%) e mantidas a -20°C (TESHIMA, 2001). Foram mantidas também em agar MRS 2% em tubos inclinados sob refrigeração, para uso mais frequente e repicadas a cada três semanas.

4.4. ENSAIO *IN VIVO*

4.4.1. Formulação e preparo das dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas segundo as exigências nutricionais da espécie (NRC, 2011), conforme apresentado no Quadro 1 e receberam diferentes suplementos durante o processamento, sendo quatro inóculos bacterianos, na concentração de 10^{10} UFC.mL⁻¹ (dietas teste) e um meio de cultura estéril (controle).

Na mistura das dietas experimentais foi acrescentado o inóculo com as bactérias candidatas a probiótico, distribuídas em cinco tratamentos: Controle (sem probiótico), PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20, siglas utilizadas para a caracterização dos isolados bacterianos.

QUADRO 1. Formulação e composição centesimal da dieta experimental extrusada utilizada no ensaio de desempenho e desafio dos camarões.

INGREDIENTE	QUANTIDADE (%)
Farinha de peixe	20,3
Extrato de soja	16,2
Farinha de soja	32,3
Fubá de milho	29,2
Premix vitamínico e mineral ⁽¹⁾	1,0
Sal comum	1,0
COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	
Umidade	16,05
Proteína Bruta	39,66
Lipídeos	14,58
Carboidratos	23,91
Cinzas	5,79

(1) - Premix vitamínico mineral para camarões - Níveis de Garantia: ÁCIDO FÓLICO (MÍN.) 500 mg/kg; ÁCIDO PANTOTÊNICO (MÍN.) 6.500 mg/kg; B.H.T. (MÍN.) 5.000 mg/kg; BIOTINA (MÍN.) 21 mg/kg; COBRE (MÍN.) 1.000 mg/kg; COLINA (MÍN.) 140 g/kg; FERRO (MÍN.) 1.000 mg/kg; IODO (MÍN.) 50 mg/kg; MANGANÊS (MÍN.) 5.000 mg/kg; NIACINA (MÍN.) 10 g/kg; SELÊNIO (MÍN.) 20 mg/kg; ZINCO (MÍN.) 10 g/kg; VITAMINA A (MÍN.) 500.000 UI/kg; VITAMINA B1 (MÍN.) 2.600 mg/kg; VITAMINA B12 (MÍN.) 10.000 mcg/kg; VITAMINA B2 (MÍN.) 2.600 mg/kg; VITAMINA B6 (MÍN.) 2.600 mg/kg; VITAMINA C (MÍN.) 40 g/kg; VITAMINA D3 (MÍN.) 160.000 UI/kg; VITAMINA E (MÍN.) 16.000 UI/kg; VITAMINA K3 (MÍN.) 1.000 mg/kg.

Fonte: NRC, 2011

Para o preparo dos inóculos as cepas foram reativadas três vezes em caldo MRS 2% e cada cultura concentrada na proporção 100:1 após centrifugação a 2560 xg por 15 minutos a

4°C e os peletes ressuspensos em caldo MRS 2% constituindo os inóculos (PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20).

As dietas experimentais foram preparadas e processadas em extrusora de massas alimentícias, no Laboratório de Cereais e Panificação da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). À mistura dos ingredientes foram adicionados individualmente os inóculos PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20 (10^{10} UFC.mL⁻¹) e o meio de cultura puro (Controle) na proporção de 20%. Após a extrusão cada dieta foi incubada a 35°C/24h, seguida de secagem por 24h em estufa com circulação forçada de ar. Estas dietas assim preparadas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, em sacos de polietileno, até o momento da alimentação dos camarões.

A concentração de microrganismo (UFC.g⁻¹) nas dietas experimentais, foi avaliada no início e no final do experimento pela técnica do espalhamento em superfície com alça Drigalsk, com 100µL de inóculo em ágar MRS 2%, após diluição seriada (1:10) utilizando as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .

4.4.2. Avaliação da eficiência e segurança da aplicação no cultivo

Foram realizados dois ensaios experimentais com o objetivo de avaliar o desempenho zootécnico e a sobrevivência de juvenis de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, frente ao patógeno *Vibrio harveyi*, comparando-se diferentes espécies de bactérias candidatas a probiótico na ração. Para isso, pós-larvas (PL₃₀) de camarão foram estocadas em 18 caixas plásticas com capacidade de 30 L cada, com água do mar.

Cada uma das caixas plásticas, com área de fundo de 0,10 m² (26 x 37 cm), foi povoada com 18 PLs (180 PLs/m²), densidade de estocagem considerada muito alta para a criação de camarões (WAINBERG, 2000; MADRID; WURMANN, 2011) e utilizada propositalmente como indutor de estresse, visando explicitar a ação protetora de um eventual probiótico. Os animais foram alimentados com a ração controle por 10 dias, período de adaptação às instalações e à ração.

Para o primeiro ensaio experimental, referente ao estudo de desempenho zootécnico dos animais, foram sorteadas três caixas para cada tratamento (repetições), em delineamento

inteiramente casualizado (DIC), e os camarões passaram a receber as dietas experimentais (quatro dietas-teste e uma dieta controle), perfazendo 15 caixas (5 tratamentos x 3 repetições). Outras três caixas, embora não consideradas nesse ensaio, também foram povoadas da mesma forma e receberam a dieta controle, de forma a possibilitar a criação de ambiente propício para o ensaio seguinte, referente a desafio frente ao patógeno.

As dietas foram oferecidas *ad libitum*, em quatro refeições ao dia, cuidando-se para que houvesse pouca sobra, que era recolhida por sifonamento a cada sete dias seguido de complementação do volume de água retirado.

Durante o período experimental de 30 dias, foram monitoradas diariamente as variáveis indicadoras de qualidade da água: oxigênio dissolvido utilizando oxímetro portátil (OD – 4000, ICEL Manaus) temperatura e pH avaliados com peagâmetro digital (Waterproof, HANNA) e semanalmente foram avaliadas a salinidade utilizando refratômetro portátil (RTS-101ATC, INSTRUTERM) e, tomadas amostras de água para avaliação microbiológica para quantificação da bactérias ácido lácticas, usando contagem em placas por espalhamento superficial em meio ágar MRS 2%, *Vibrios* spp em meio ágar TCBS e contagem total de bactérias heterotróficas em meio ágar Marine. A concentração de amônia e a alcalinidade da água dos aquários foram analisadas no início e ao final do ensaio de crescimento pelos métodos colorimétrico do indofenol e titulométrico de neutralização respectivamente, utilizando kits comerciais da empresa Alfakit.

No início do período experimental e no 30º dia de experimento foi coletada uma amostra de três PLs por caixa para avaliação de peso inicial e peso final, ganho de peso e de biomassa final e três PLs para avaliação microbiológica (VIEIRA, 2010; SOUZA et al., 2010; FLORES-MIRANDA et al., 2011). Para a biometria as PLs foram eutanasiadas por choque térmico em água com gelo e mantidas em solução de formol a 10%. No momento das medidas as PLs eram retiradas da solução de formol, depositadas em papel absorvente sendo em seguida pesadas e medidas individualmente utilizando-se balança de precisão e paquímetro digital (6” ZAAS Precision). Para a avaliação de sobrevivência as PLs foram contadas ao início e final do experimento.

Para as análises microbiológicas os juvenis foram eutanasiados por choque térmico, em água com gelo, imersos em solução salina formalizada 50 mg/L individualmente por cinco minutos para eliminar bactérias externas e enxaguados com solução salina estéril por um minuto, para remoção da formalina (IMMANUEL et al., 2004). Logo após a desinfecção externa, os animais inteiros foram macerados em graal, com pistilo de cerâmica e diluídos seriadamente (1:10) utilizando as diluições entre 10^{-1} e 10^{-4} para contagem bacteriana. Utilizou-se 100 μ L de inóculo para espalhamento superficial com alça Drigalsk nos meios ágar Marine (contagem total de heterotróficos), ágar MRS 2% NaCl + púrpura de bromocresol + CaCO_3 (bactérias lácticas) sendo as placas incubadas a 35°C por 24 e 48h respectivamente e ágar TCBS (contagem de vibrios) com incubação a 30°C por 24h, conforme metodologia adaptada de Boonthai; Vuthiphandchai e Nimrat (2011).

Após 30 dias de cultivo, os animais foram submetidos ao desafio sanitário, com a inclusão de cultura de *Vibrio harveyi*, na concentração de 10^5 UFC.mL⁻¹ na água.

Para isso, foram utilizadas também as três caixas não consideradas anteriormente, que não receberam o inóculo bacteriano, perfazendo seis tratamentos: quatro bactérias candidatas a probiótico, controle positivo (com o inóculo) e negativo (sem o inóculo), com três repetições por tratamento.

Após 48h do desafio foi feita a avaliação microbiológica da água de cultivo e com sete dias do desafio nova avaliação microbiológica dos camarões, utilizando a mesma metodologia descrita acima.

4.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DOS DADOS:

Os dados foram submetidos a análise de variância e a teste de média (Tukey), ou a análise de regressão quando se tratavam de dados contínuos.

Para análise estatística dos dados utilizou-se o pacote estatístico SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), versão 9.1 (SAEG, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE CAMARÃO

A Tabela 1 apresenta o resultado médio das contagens em placas de bactérias, expresso em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, para bactérias heterotróficas em ágar Marine, vibrios em ágar TCBS e bactérias ácido lácticas em ágar MRS2% PUR, isoladas de amostras de intestinos macerados de camarão *Penaeus schimitti*, coletados na fazenda Oruabo, município de Santo Amaro - Baía de Todos os Santos, Bahia.

TABELA 1. Contagem em UFC.mL⁻¹ de bactérias heterotróficas em ágar Marine, vibrios em ágar TCBS e bactérias ácido lácticas em ágar MRS 2% PUR, para amostras de intestino de camarão selvagem (*Penaeus schimitti*)

Meio	UFC.mL ⁻¹
Ágar Marine	1,2 x 10 ⁶
Ágar TCBS	1,5 x 10 ⁴
Ágar MRS 2% PUR	1,6 x 10 ⁵

Os resultados obtidos na caracterização da microbiota intestinal dos camarões selvagens (*Penaeus schimitti*) revelaram a presença de bactérias heterotróficas em concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹, vibrios (10⁴) e bactérias lácticas (10⁵), demonstrando que, assim como em outros animais e humanos, existe uma população microbiana dominante, representado por bactérias heterotróficas, seguida por uma população sub-dominante, onde são encontradas as bactérias lácticas e por fim uma população residual, composta de uma grande variedade de microrganismos, incluindo vibrios, que pertencem à flora autóctone do meio ambiente marinho.

Vieira et al., 2010 encontraram em trato intestinal de camarão *Litopenaeus vannamei*, alimentados com dieta suplementada com probiótico e dieta controle, para o dia zero do experimento, concentração de cerca de 10⁶ UFC.g⁻¹ para contagem de bactérias heterotróficas totais e de 10⁵ UFC.g⁻¹ para contagem de *Vibrio* spp, não sendo encontradas bactérias ácido lácticas neste tempo, o que difere dos resultados encontrados neste trabalho. Esta diferença

pode ser devido ao fato de que neste estudo foram utilizadas bactérias ácido lácticas do gênero enterococcus, naturalmente encontradas em material intestinal, sendo que Vieira avaliou o gênero lactobacillus.

Estes resultados são condizentes com apresentados por Mendes et al., 2009, que encontraram em amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* até 10^5 UFC.mL⁻¹ para *Vibrios* spp e em amostras de água dos viveiros de cultivo no estado de Pernambuco, tanto na estiagem como no período chuvoso, até 10^3 UFC.mL⁻¹.

Como o objetivo do trabalho é a identificação de bactérias candidatas a probiótico, optou-se por trabalhar com as bactérias ácido lácticas.

5.2. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

O Quadro 2 apresenta a caracterização morfológica das 18 colônias isoladas em ágar MRS 2% + púrpura de bromocresol e CaCO₃ quanto ao tamanho e elevação da colônia, teste de catalase e morfologia celular, após 48h de incubação a 35°C.

QUADRO 2. Características morfológicas e fisiológicas das bactérias isoladas de amostras de intestino de camarão selvagem (*Penaeus schimitti*) e cultivadas em ágar MRS 2% PUR

Isolado	Tamanho da colônia*	Elevação da colônia	Teste de catalase	Morfologia celular
PURS 1	Média	Convexa	pos	Coco
PURS 2	Média	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 3	Média	Convexa	pos	Cocobacilo
PURS 5	Puntiforme	Convexa	pos	Cocobacilo
PURS 6	Média	Rasa	pos	Cocobacilo
PURS 7	Média	Rasa	pos	Cocobacilo
PURS 8	Grande	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 9	Média	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 10	Média	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 11	Grande	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 12	Pequena	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 13	Média	Convexa	neg	Coco
PURS 15	Média	Rasa	neg	Coco
PURS 16	Pequena	Convexa	neg	Coco
PURS 17	Pequena	Convexa	neg	Coco
PURS 19	Média	Convexa	neg	Coco
PURS 20	Média	Convexa	neg	Cocobacilo
PURS 21	Média	Convexa	neg	Cocobacilo

*Tamanho das colônias: Grande \geq 5 mm; Média 2 a 5 mm; Pequena \leq 2 mm; Puntiforme = ponto; pos= Teste positivo; neg = Teste negativo

Foi observado como característica comum a todas as colônias, a forma circular, a borda e estrutura lisas, a presença de brilho, coloração de Gram positiva, homofermentativas além da cor amarela das colônias e ou ao seu redor, indicativa da produção de ácido, alterando a coloração do indicador ácido básico (púrpura de bromocresol) presente no meio.

Dos isolados que apresentaram coloração de Gram positiva, teste de catalase negativo e morfologia celular de coco ou cocobacilo, características de bactérias ácido lácticas, e que se mantiveram estáveis e viáveis ao cultivo em condições de cultura laboratorial, foram

selecionados para dar continuidade aos trabalhos, e, portanto, preservados a -20°C . Cinco culturas (PURS1, PURS3, PURS5, PURS6 e PURS7) foram eliminadas nesta etapa por serem catalase positivo, não se caracterizando como bactérias ácido lácticas. As culturas PURS10 e PURS12 perderam a viabilidade celular deixando de ser utilizadas, continuando o trabalho com 11 isolados para os experimentos seguintes.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS COMO POTENCIAIS PROBIÓTICOS

5.3.1. Teste de inibição frente ao *Vibrio harveyi*

Os isolados (PURS2, PURS8, PURS9, PURS11, PURS13, PURS15, PURS16, PURS17, PURS19, PURS20 e PURS21) foram submetidos ao teste de antagonismo frente ao *Vibrio harveyi*, utilizando a metodologia do bloco de gelose.

Os inóculos utilizados para plaqueamento das culturas lácticas em ágar MRS 2% apresentaram cerca de 10^9 UFC.mL⁻¹ e a concentração do inóculo de *Vibrio harveyi* V.715, plaqueado em ágar TSA/Mar, foi em torno de 10^7 UFC.mL⁻¹.

Todas as culturas apresentaram halos de inibição em relação ao controle (diâmetros maiores que 6 mm), o que revela a ação inibidora dos isolados sobre o *Vibrio harveyi*, uma vez que a simples presença de um halo de inibição, independentemente do diâmetro, é indicativo de antagonismo (GUEDES NETO et al., 2005).

Toro, 2005, testando o poder de inibição das bactérias lácticas selecionadas de ambiente marinho frente a patógenos comuns, causadores de doenças na carcinicultura encontrou que a maioria das cepas selecionadas apresentou características inibitórias frente a patógenos marinhos, produzindo halos de inibição entre 2 e 9 mm, principalmente contra *Vibrio cholerae*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*.

Substâncias antagonicas são metabólitos liberados por bactérias lácticas, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de

aminoácidos e bacteriocinas, todos capazes de inibir a proliferação de outras bactérias (Piard; Desmazeud, 1992).

Vieira, 2010, testando diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* encontrou halos de inibição do crescimento contra cepas Gram negativas de *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e também para bactérias Gram positivas como *Micrococcus lutueus*, *Enterococcus durans* e *Yersinia enterocolitica*.

Inibição de patógenos *in vitro* tem sido relatada por diversos autores para outras bactérias, potenciais probióticos, isolados de organismos aquáticos tais como *Lactobacillus sp.* (BALCAZAR et al., 2008), *Bacillus pumilus* (ALY et al., 2008), *Micrococcus lutueus* e *Pseudomonas sp.* (Abd El-RHMAN; KHATTAB; SHALABY, 2009), *Lactobacillus plantarum* (JATOBÁ et al., 2008) e *Bacillus sp.* (GULLIAN; THOMPSON; RODRIGUEZ, 2004)

Estes trabalhos corroboram os resultados encontrados neste experimento que podem comprovar a ação inibitória *in vitro* exercida pelas bactérias lácticas selecionadas sobre a bactéria patogêna Gram negativa *Vibrio harveyi*.

5.3.2. Resistência a baixos níveis de pH

A Tabela 2 apresenta os valores da concentração celular em log de UFC.ml⁻¹ dos isolados selecionados e submetidos a diferentes níveis de pH (3,5; 4,0 e 4,5), no tempo inicial e após três horas de exposição aos tratamentos. Nela pode-se observar que apenas os isolados PURS15 e PURS21 apresentaram diferença significativa (P<0,05) entre tratamentos, sendo ambos afetados em seu crescimento pela condição de elevação da acidez do meio (pH 3,5).

TABELA 2. Concentração celular em Log de UFC.mL⁻¹, dos isolados submetidos a diferentes pH (4,5; 4,0 e 3,5), no tempo zero (T0) e após três horas (T3) de exposição aos pH testados e variação ocorrida entre as médias (CV)

Isolados	pH	log UFC.mL ⁻¹ em T0	CV(%)	log UFC.mL ⁻¹ em T3	CV(%)
PURS2	4,5	7,9 ^a	10,3	8,0 ^a	5,4
PURS8		7,9 ^a	8,7	8,0 ^a	10,0
PURS9		7,3 ^a	32,2	7,3 ^a	33,6
PURS11		7,1 ^a	11,8	7,1 ^a	29,4
PURS13		8,2 ^a	10,8	8,0 ^a	49,6
PURS15		8,2 ^a	12,9	8,1 ^a	19,7
PURS16		8,2 ^a	5,4	8,2 ^a	17,4
PURS17		8,0 ^a	73,5	7,8 ^a	35,1
PURS19		8,2 ^a	12,7	8,3 ^a	20,8
PURS20		8,0 ^a	18,4	8,0 ^a	14,3
PURS21		8,2 ^a	5,4	8,3 ^a	9,1
PURS2	4	8,0 ^a	29,4	8,0 ^a	6,6
PURS8		7,9 ^a	6,0	7,9 ^a	20,4
PURS9		7,4 ^a	19,9	7,4 ^a	34,5
PURS11		7,3 ^a	41,4	7,0 ^a	23,5
PURS13		8,1 ^a	10,1	8,1 ^a	0,0
PURS15		8,2 ^a	0,0	8,1 ^a	16,6
PURS16		8,1 ^a	27,3	8,1 ^a	6,3
PURS17		7,7 ^a	24,1	7,7 ^a	24,1
PURS19		8,1 ^a	29,1	8,2 ^a	10,7
PURS20		8,0 ^a	12,9	8,1 ^a	14,6
PURS21		8,3 ^a	7,9	8,3 ^a	20,8
PURS2	3,5	8,0 ^a	16,0	8,0 ^a	16,2
PURS8		8,0 ^a	11,4	8,0 ^a	21,4
PURS9		7,4 ^a	7,2	7,4 ^a	29,5
PURS11		7,1 ^a	25,4	7,2 ^a	41,3
PURS13		8,2 ^a	13,1	8,1 ^a	16,6
PURS15		8,2 ^a	2,7	8,1b*	3,5
PURS16		8,1 ^a	20,7	8,2 ^a	3,0
PURS17		7,5 ^a	50,7	7,8 ^a	29,5
PURS19		8,0 ^a	36,1	8,2 ^a	19,6
PURS20		7,9 ^a	11,7	8,0 ^a	16,6
PURS21		8,3 ^a	10,3	8,2b*	8,0

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre número de UFC (P<0,05).

CV= Coeficiente de Variação

As secreções ácidas do estômago, além de serem indispensáveis para o processo digestório, constituem-se nos primeiros mecanismos de defesa do organismo frente aos microrganismos invasores. Portanto, para que um microrganismo possa ser considerado um probiótico, deve ser capaz de sobreviver ao pH estomacal (MARTEAU et al., 1993).

Alguns testes *in vitro* podem ser usados para determinar a tolerância ao ácido estomacal, porém, é importante ressaltar que os níveis de tolerância a diversos pH variam consideravelmente entre as bactérias probióticas (KLAENHAMMER; KULLEN, 1999).

Para humanos, segundo Gupta; Mital; Garg (1996), Gomez-Gil et al. (1998) e Park et al., (2006), para que uma bactéria possa ser considerada probiótica, ela deve sobreviver entre os pH 2,0 e 3,0, durante 3 horas, e, na avaliação de Bernardeau; Vernoux; Gueguem (2001), esse tempo é de 90 minutos em pH 3,0.

De acordo com Gibson (1979) o pH do suco gástrico dos crustáceos decápodos varia do ácido à neutralidade (4,7 a 7,0), entretanto, Toro (2005) avaliou o pH do hepatopâncreas de camarões *Litopenaeus vannamei*, submetidos a cultivo experimental, encontrando nestas condições pH variando entre 3,5 e 3,8.

Pelos resultados apresentados as cepas PURS15 e PURS21 não resistiriam ao pH do hepatopâncreas, pois apresentaram diferença significativa no desenvolvimento de UFC.ml⁻¹ entre os tempos 0 e 3h, quando submetidas ao pH 3,5. Os outros nove isolados avaliados nesta experimentação apresentaram características desejáveis de resistência à acidez, que caracteriza a possibilidade de sobrevivência no trato intestinal de camarões *L. vannamei*, de acordo com os valores encontrados por Toro, 2005, indicando que quanto ao requisito resistência ao suco gástrico estas cepas selecionadas (PURS2, PURS8, PURS9, PURS11, PURS13, PURS16, PURS17, PURS19 e PURS20) apresentam potencial probiótico.

5.3.3. Resistência a sais biliares

A resistência aos sais biliares é outro importante mecanismo para que um microorganismo seja considerado um potencial probiótico (REDONDO, 2008).

Para a comparação dos dados de resistência aos sais biliares, foram calculadas as velocidades de crescimento específico das culturas nos meios com e sem sais biliares e os dados foram submetidos ao teste t de Student, em nível de 5%. Os resultados da análise estatística estão apresentados na Figura 1, onde se observa que as culturas PURS11, PURS15,

PURS19 e PURS21 apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) na velocidade de crescimento específico, em relação aos seus respectivos controles, sendo os valores menores para o meio com os sais biliares, o que implicou em eliminação desses isolados das próximas etapas de seleção.

A cultura PURS9, que apresentou crescimento menor que 50% com sais biliares, em relação ao controle, embora não tenha mostrado diferença significativa à análise estatística, também foi desprezada.

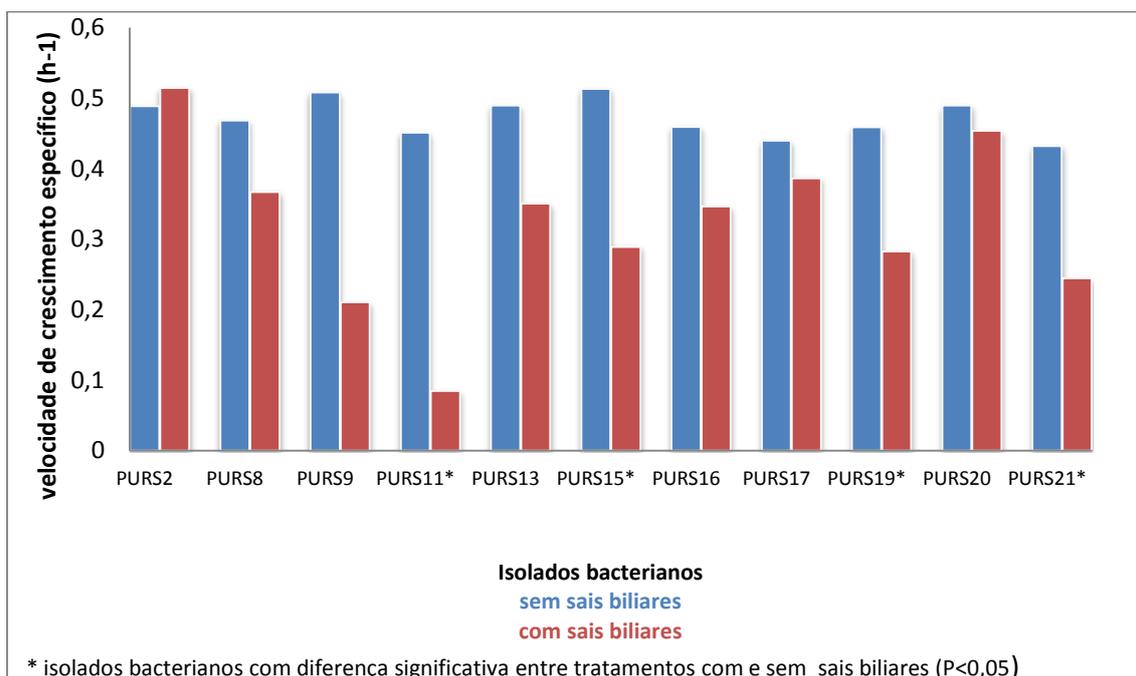


FIGURA 1. Velocidade de crescimento específico (h^{-1}) dos isolados bacterianos em caldo MRS 2% com 0,3% e sem sais biliares.

Gilliland; Nelson; Maxwell (1985), comparando diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus* quanto a tolerância a bile verificaram uma variação considerável no crescimento das bactérias em função da concentração de bile.

Para verificar, a resistência a sais biliares de cepas de *Lactobacillus acidophilus* isolados de produtos probióticos comerciais, Rodrigues (2002), testando dois níveis 0,3 e 0,6% de sais biliares não encontrou diferença significativa entre os resultados obtidos para os

dois tratamentos, considerando, portanto que 0,3% de sais biliares é suficiente para caracterizar a suscetibilidade das cepas aos sais biliares.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as cepas PURS2, PURS8, PURS13, PURS16, PURS17 e PURS20 submetidas a 0,3% de sais biliares não apresentaram alteração significativa ($P > 0,5\%$) na velocidade de crescimento em relação ao controle (0% de bile) indicando que estas cepas foram mais resistentes a presença dos sais biliares e que, considerando este parâmetro, esta resistência lhes confere uma característica favorável para serem consideradas cepas com potencial probiótico. As cepas PURS11, PURS15, PURS19 e PURS21 apresentaram crescimento inferior no meio contendo sais biliares, indicando menor resistência a presença desses sais, portanto às condições do trato intestinal, e, que por isto, não atenderiam a este requisito.

5.4. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA (CLÁSSICA E MOLECULAR) DOS ISOLADOS PURS2, PURS8, PURS17 E PURS20

Os resultados do sequenciamento do DNA genômico dos isolados PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20 e as informações das sequências obtidas após terem sido submetidas ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) indicaram a espécie *Enterococcus gallinarum* para PURS2, PURS8 e PURS20 com 99% de identidade e *Enterococcus faecium* para PURS17 também com 99% de identidade.

Estes resultados foram confirmados pela análise do perfil de fermentação de carboidratos pelo kit API CH 50, onde destacam-se os açúcares indicadores do gênero *Enterococcus* uma vez que, conforme Mundit (1994), todas as cepas utilizam amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glucose, glicerol, lactose, manitol, ribose, salicilina, sacarose; sendo que o *E. faecium* pode apresentar resultados variáveis em meio com arabinose, sorbitol e sacarose (Quadro 3). Estes resultados estão de acordo com o encontrado por Chen et al. (2000), que avaliando teste rápido de fermentação de D-Xilose e Metil- α -D-Glucopiranosídeo 1%, para diferenciação entre *E. gallinarum* e *E. faecium*, encontraram 98% de sensibilidade, confirmando que *E. gallinarum* é xilose positivo e *E. faecium* é xilose negativo.

O Quadro 3 apresenta os resultados da fermentação de carboidratos com o uso do Kit API CH50, após 72h de incubação a 37°C. Neste quadro a notação seguiu os seguintes critérios: + reação positiva para aquelas que com 24h de incubação apresentaram mudança de cor, – negativa para as que se mantiveram com a cor roxa até 72h de incubação, (+) fracamente positivas para as reações que apresentaram mudança de cor somente com 48h de incubação e +s lentamente positivas para as reações que apresentaram mudança de cor apenas com 72h de incubação.

Enterococos são bactérias ácido lácticas (LAB) utilizadas como probióticos em humanos e animais de abate. No entanto, são também importantes patógenos nosocomiais que causam bacteremia, endocardite, ou infecções do trato urinário, e levantam questões sobre a sua segurança para uso em alimentos ou como probióticos (FRANZ et al., 2011).

Mundit (1994) caracteriza o *Enterococcus faecium* como uma bactéria residente no trato intestinal de humanos e da maioria dos animais, sendo as suas principais fontes fezes de humanos, de animais homeotérmicos, pecilotérmicos, insetos e plantas, sendo encontrado em vários alimentos usualmente não relacionados com contaminação fecal.

Diversos estudos são desenvolvidos sobre a utilização de diferentes cepas de *E. faecium* como potencial probiótico em dietas para animais (MARCÍŇÁKOVÁ; SIMONOVÁ LAUKOVÁ, 2004; VAHJEN; MANNER, 2003; POLLMAN et al. 2005, TARAS et al. 2006; SAMLI et al. 2007; SUN et al. 2012). No entanto, a utilização de *Enterococcus* como probióticos é questionada devido à presença de cepas que apresentam resistência a antibióticos e sua crescente associação com doenças em humanos. Estas questões baseiam-se no fato de genes de resistência ou que codificam fatores de virulência podem ser transferidos de uma bactéria para outra no trato gastrointestinal. Estudos sobre a incidência de traços de virulência entre as cepas de *Enterococcus* isolados de alimentos revelaram que em geral, *Enterococcus faecalis* abriga mais traços de virulência do que *Enterococcus faecium* (CARLOS, 2008).

O gênero *Enterococcus* compreende mais de 26 espécies diferentes e existe uma diversidade fenotípica considerável entre estas espécies e métodos de identificação de genótipos, como sondas de gene alvo para os fragmentos 16S e 23S rRNA que são capazes de diferenciar estas espécies. Mas, mesmo assim, com todos os testes amplamente utilizados, os sistemas de identificação podem deixar de identificar com precisão as espécies raras. Assim, embora se tenha evoluído nos métodos de identificação genotípicas de bactérias, ainda não se pode dispensar os métodos convencionais disponíveis, com protocolos de identificação fenotípica para determinação simples e rápida de espécies de enterococos em alimentos ou no trato gastrointestinal (KLEIN, 2003).

Algumas cepas de enterococos são resistentes a diversos antibióticos e essa resistência engloba tanto a resistência (intrínseca) natural e resistência adquirida (transferível), sendo que os enterococos possuem um amplo espectro de resistências a antibióticos dentro destes dois tipos. Exemplos de resistência intrínseca são a resistência à vancomicina (tipo VANC) em *E. gallinarum* e a resistência a estreptograminas em *E. faecalis*. A resistência à ampicilina (*E. faecium*), tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprima/sulfametoxazol e quinolonas (*E. faecium* e espécies relacionadas) é adquirida (KLARE et al., 2003).

Carlos (2008) relata que cerca de 80% das infecções provocadas por enterococos devem-se à espécie *Enterococcus faecalis*, vindo em segundo lugar a espécie *E. faecium*, seguida de outras como *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. raffinosus*.

Algumas cepas de *E. faecium* têm uma longa história de utilização aparentemente segura em aplicações industriais e agrícolas; no entanto outras espécies, tais como *E. durans* e *E. hirae*, têm sido associadas com infecções em frangos (ABE et al., 2006; CHADFIELD et al., 2005).

Basanta et al. (2008) avaliaram a segurança potencial de *E. faecium* L50 por PCR na detecção de genes que codificam fatores de virulência potenciais, na análise de hemolisina e produção de gelatinase, e em testes de suscetibilidade aos antibióticos. Nesse estudo, a cepa *E. faecium* L50 amplificou um fragmento de 735 pb que codifica adesina (efaAfm) para a parede celular, e um fragmento 543 pb do gene CCF, além, de apresentar-se hemolisina e gelatinase negativa. Na avaliação dos padrões de suscetibilidade antimicrobiana, a cepa de *E. faecium* L50 foi resistente a clindamicina, ácido nalidíxico e estreptomicina, mostrou suscetibilidade moderada a eritromicina e canamicina, e sensibilidade à ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido fusídico, gentamicina (10 e 120 ug), nitrofurantoína, norfloxacina, penicilina G, rifampicina, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina. Os autores concluíram que *E. faecium* L50 pode ser considerada como uma cepa avirulenta mostrando suscetibilidade aos antibióticos mais clinicamente relevantes.

Os fatores de virulência de enterococos que desempenham um papel na patogenicidade de algumas cepas estão associados com a colonização e invasão de tecidos do hospedeiro, bem como resistência para os mecanismos de defesa específicos e não-específicos dos hospedeiros (FRANZ et al., 2011). Fator de virulência é uma molécula efetora que aumenta a capacidade de um microrganismo para causar doença (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000). Exemplos típicos são substâncias de agregação, gelatinase, superóxido extracelular e proteína de superfície extracelular (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

Em cepas isoladas de alimentos, a ocorrência de determinantes de virulência parece ser maior em estirpes de *E. faecalis* que em estirpes de *E. faecium*. No entanto, algumas cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* são utilizadas como probióticos para humanos e são ingeridos em número elevado, geralmente na forma de preparações farmacêuticas. Geralmente esses probióticos são usados para tratar diarreias associadas ao uso de antibióticos ou síndrome do intestino irritável, para baixar os níveis de colesterol ou para melhorar a imunidade do hospedeiro. Em animais, os enterococos probióticos são utilizados para tratar ou prevenir a diarreia, para estimulação imunológica ou para incrementar o desempenho zootécnico (FRANZ et al., 2011).

Um número limitado de espécies de enterococos é de importância para a ecologia do trato gastrointestinal, incluindo *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans/hirae*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Desses, no trato digestivo humano, *E. faecium* é a espécie mais comum ao passo que na maioria das espécies de animais *E. faecalis* é, pelo menos, presente na mesma quantidade (KLEIN, 2003).

Bactérias produtoras de ácido lático, que são prevalentes no intestino de mamíferos e aves (*Bifidobacterium* em humanos, *Lactobacillus* em suínos, roedores e aves e *Enterococcus* em carnívoros), são geralmente sub-dominantes em peixes e representados essencialmente pelo gênero *Carnobacterium*.

Embora enterococcus sejam considerados como subdominantes em peixes (RINGO; VADSTEIN, 1998) e crustáceos, o ambiente em que estes animais se encontram são importantes para a formação da microbiota presente no intestino desses animais. Toro (2005)

afirmou que cepas selecionadas e isoladas de trato digestivo de camarões capturados na Bahia de Buenaventura (Colômbia) possam ser oriundas de trato digestivo de animais superiores e humanos, ou até de origem vegetal, devido ao lançamento de efluentes provenientes de rios e da cidade de Buenaventura com carga biológica elevada naquele local. Da mesma forma, o isolamento de cepas de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus faecium* presentes nas amostras de camarão *Litopenaeus schimitti* pode ser justificada pelo ponto de coleta das amostras (Fazenda Oruabo, Santo Amaro da Purificação) que se localiza dentro da Bahia de Todos os Santos, região conhecida pelo alto grau de poluição das águas, que recebem descargas domésticas e industriais instaladas em seu entorno.

5.5. ENSAIO *IN VIVO*

5.5.1 Viabilidade celular das dietas experimentais

Os inóculos bacterianos após concentração (100:1) apresentaram contagens celulares elevadas, sendo que para cada isolado as concentrações em UFC.mL⁻¹ foram: PURS2 4,4 x 10¹⁰; PURS8 5,2 x 10¹⁰; PURS17 4,2 x 10¹⁰ e PURS20 3,5 x 10¹⁰. As dietas probióticas preparadas com 20% de biomassa celular, apresentaram viabilidade celular em torno de 10⁸ UFC.g⁻¹), ao início dos ensaios de crescimento e de desafio, mantendo-se estáveis até o final destes ensaios. A Tabela 3 apresenta os valores de viabilidade celular (UFC.g⁻¹) dos isolados bacterianos (PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20) concentrados e inoculados nas dietas, avaliados no início e no final do período experimental de 44 dias (ensaios de crescimento e desafio).

TABELA 3. Viabilidade celular (UFC.g⁻¹) dos isolados bacterianos (PURS2, PURS8, PURS17 e PURS20) concentrados e inoculados nas dietas, avaliados no início e no final do período experimental de 44 dias

Dieta	Avaliação Inicial (UFC.g ⁻¹)	Avaliação final (UFC.g ⁻¹)
PURS2	1,2 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸
PURS8	1,8 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸
PURS17	3,3 x 10 ⁹	>5,5 x 10 ⁹
PURS20	2,7 x 10 ⁸	>5,5 x 10 ⁹

As dietas experimentais mantidas em temperatura de refrigeração apresentaram-se estáveis quanto a viabilidade celular durante o período experimental (44 dias), em semelhança aos resultados encontrados por Vieira et al. (2008) e Souza et al. (2010). Dessa forma, durante todo o ensaio experimental a concentração celular manteve-se em níveis adequados e dentro do recomendado por diversos autores (SIMON; JADAMUS; VAHJEM, 2001; SIMON, 2005; SUN et al., 2012; SHARIFUZZAMAN, 2010).

Simon (2005) relata que a maioria dos probióticos para suínos selecionam cepas de *Enterococcus faecium* e que a concentração mínima recomendada para a maioria dos probióticos é de aproximadamente 10^9 UFC/kg de alimento, ou seja, 10^6 /g de ração. O autor relata ainda que as células vegetativas assim como as células desidratadas de *E. faecium* são mais sensíveis ao tratamento pelo calor e que a inativação durante 8 semanas de armazenamento é de aproximadamente 50%, razão pela qual a concentração de probiótico é necessária ser mais alta durante o processo produtivo de modo que o aditivo possa ser incorporado na ração final num intervalo praticável e realista.

As concentrações iniciais e finais dos isolados nas dietas probióticas estão de acordo com as utilizadas por Sun et al. (2012), que avaliando crescimento, resposta imune e enzimas digestivas em juvenis de *Epinephelus coioides* (garoupa) alimentados com dietas suplementadas com bactérias lácticas, utilizaram *Lactococcus lactis* na concentração de 10^8 UFC.g⁻¹ e *Enterococcus faecium* na concentração de 10^8 UFC.g⁻¹, assim como no trabalho de Sharifuzzaman (2010), que utilizou nas dietas probióticas para juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) as bactérias *Kocuria* e *Rhodococcus* nas concentrações de 10^7 a 10^8 UFC g⁻¹, para proteção contra infecção por víbrios.

Timmerman et al. (2006) salientaram a importância da forma e do tempo na administração como principais fatores que afetam a eficácia das preparações probióticas. Também a dose do probiótico, a duração da administração e a idade dos animais podem afetar a eficácia dos mesmos (SIGGERS et al., 2007).

Em probióticos comerciais, alguns estudos indicam que os organismos citados nos rótulos não estão realmente contidos no produto e muitas vezes os produtos contêm espécies

que não estão informadas no rótulo (MATTARELLI et al., 2002; HUFF; EMPTOR, 2004; WANNAPRASAT et al., 2009), revelando possíveis erros de identificação (GAGGIA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). Muitas vezes foi detectado que o número de bactérias probióticas em alguns produtos estavam abaixo do valor declarado ou estavam ausentes (WANNAPRASAT et al., 2009).

5.5.2. Ensaio de crescimento

5.5.2.1. Qualidade físico-química e microbiológica da água de cultivo

Durante todo o período do ensaio de crescimento dos camarões (30 dias), os valores de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e salinidade da água dos aquários mantiveram-se estáveis na faixa de conforto para a espécie *Litopenaeus vannamei*, com pequenas variações não significativas, em valores compatíveis com o bem-estar dos animais (BOYD, 2000, 2002; VINATEA, 1997; HERNANDEZ; NUNES, 2001; COSTA et al., 2010), como podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4. Salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água de cultivo de camarões *L. vannamei* alimentados com dietas com diferentes bactérias candidatas a probiótico ao final de 30 dias de experimento.

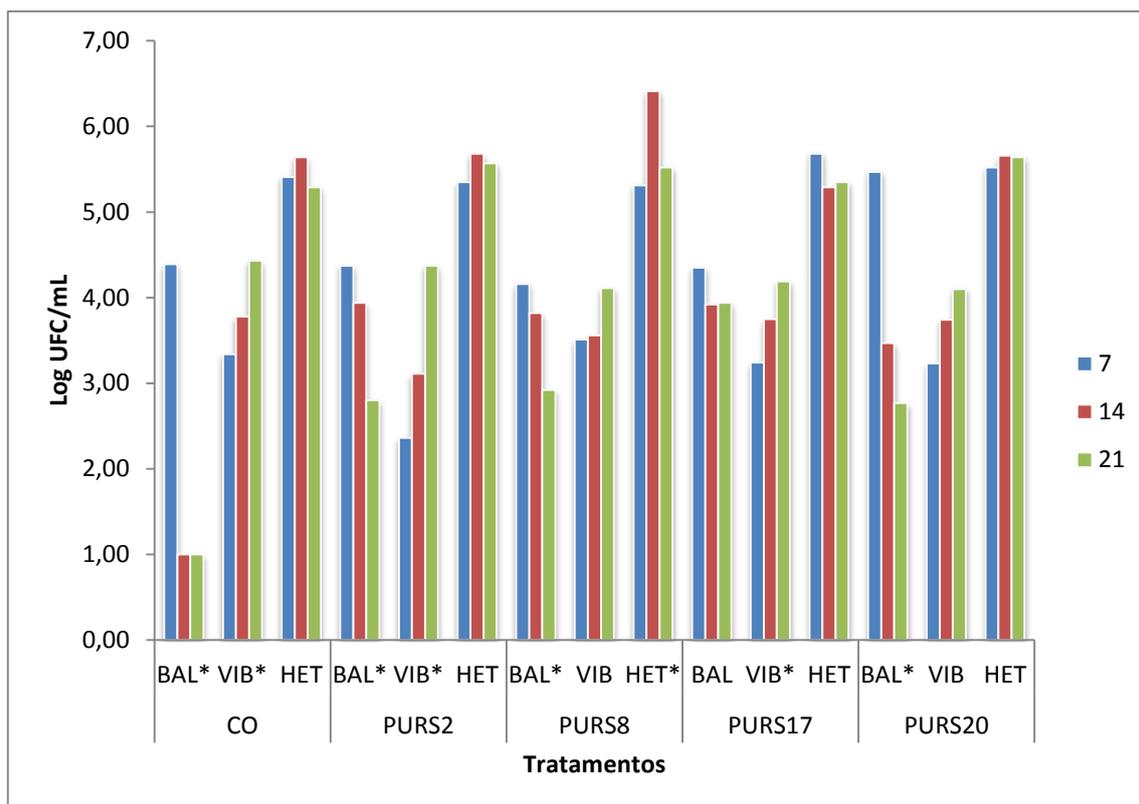
Tratamento	Salinidade (g.L ⁻¹)		Temperatura (°C)		pH		Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	
	Min	Max	Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
Controle	27,0	28,0	24,2	26,7	6,98	7,33	6,65	7,90
PURS2	27,0	28,0	24,3	26,8	7,16	7,33	6,00	8,00
PURS8	27,0	28,0	24,3	27,0	7,16	7,32	5,90	7,92
PURS17	27,0	28,0	24,4	26,7	7,18	7,33	6,30	8,20
PURS20	27,0	28,0	24,4	26,8	7,16	7,32	6,40	8,01

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos para as variáveis estudadas.

Os valores médios iniciais e finais de amônia (mg.L⁻¹) e de alcalinidade (mg.L⁻¹ de CaCO₃) nos aquários contendo os camarões tratados durante 30 dias com as dietas contendo os diferentes isolados bacterianos candidatos a probiótico também estiveram na faixa de tolerância da espécie (GIROTTO, 2010; ALVES; MELLO, 2007) até o fim do período experimental e não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos, apresentando valores máximos de 0,41 mg.L⁻¹ e 175,3 mg de CaCO₂ por litro, para amônia e alcalinidade, respectivamente.

A alcalinidade total, medida como sendo a concentração de bases na água, expressa em miligramas por litro do equivalente de carbonato de cálcio, é normalmente elevada em águas marinhas, sendo recomendável valores acima de 120 mg.L⁻¹ de CaCO₃ para o bom crescimento de *L. vannamei* (ALVES; MELLO, 2007).

No presente estudo, ao início do experimento (dia zero) foi realizada a análise microbiológica da água de abastecimento dos tanques, sendo encontrada uma concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹ para contagem total de heterotróficas, de 10³ UFC.mL⁻¹ para bactérias lácticas e ausência de víbrios. Nas análises microbiológicas para a presença de bactérias ácido lácticas, víbrios e contagem total de heterotróficos na água do cultivo durante o ensaio de crescimento foram detectadas diferenças significativas ($P<0,05$) nas contagens bacterianas no tempo, nos diferentes tratamentos, o que segue apresentado na Figura 3.



Legenda: BAL = bactérias lácticas; VIB = víbrios; HET = Heterotróficas; CO = controle

FIGURA 2. Avaliação microbiológica da água dos diferentes tratamentos durante o período de ensaio de crescimento

Observa-se na Figura 2 a presença das bactérias na água, mesmo para a dieta controle em função da presença de uma microbiota natural existente na água do mar coletada para os ensaios, que foi filtrada, mas não esterilizada.

Para todos os tratamentos a contagem de bactérias lácticas na água de cultivo reduziu no tempo, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) para CO, PURS2, PURS8 e PURS20. A cultura PURS17 (*E. faecium*) manteve-se estável durante o ensaio.

A contagem de víbrios aumentou no tempo, variando entre 10^2 e 10^4 UFC.mL⁻¹, sendo que todos os tratamentos aos 21 dias mantiveram-se na faixa de 10^4 UFC.mL⁻¹, com diferenças significativas ($P < 0,05$) para CO, PURS2 e PURS17. Nos tratamentos com PURS8 e PURS20 a contagem de víbrios manteve-se estável.

Costa (2006), pesquisando presença de víbrios em cultivo de *Litopenaeus vannamei* encontrou maior concentração em amostras de água do viveiro quando comparadas às amostras de água de captação. Um maior aporte de matéria orgânica no viveiro, devido à

oferta de rações e fertilizantes, leva ao aumento de detritos, plâncton e microbiota, que aliado a uma densidade alta de organismos e condições ambientais favoráveis contribui para a proliferação e manutenção de espécies de v́brios (MORIATY, 1997; ALAM et al., 2001; RIQUELME; AVENDAÑO-HERRERA, 2003)

A contagem total de bact́rias heterotŕficas manteve-se elevada em todos os tratamentos, na faixa de 10^5 UFC.ml⁻¹, exceto para PURS8 que apresentou aumento de uma casa decimal no 14º dia, retornando ao padr̃o dos demais tratamentos no 21º dia.

A reduç̃o da contagem de bact́rias ĺcticas pode estar diretamente relacionada com o aumento relativo da contagem de v́brios e de bact́rias heterotŕficas que com o aumento da concentraç̃o de mat́ria orgânica tiveram melhores condiç̃es para o desenvolvimento, tornando o ambiente desfavorável para o grupo das bact́rias ácidos ĺcticas. Com relaç̃o a reduç̃o na contagem total de bact́rias heterotŕficas, a variaç̃o apresentada no tratamento PURS8 pode ser atribuída a diferenç̃as intrínsecas de cada unidade experimental, já que cada caixa pode ser considerada um ecossistema sujeito a variaç̃es pŕprias.

No peŕodo do ensaio de crescimento a remoç̃o da mat́ria orgânica e reposiç̃o do volume de água dos aquários foram realizadas a cada sete dias, o que pode justificar os valores encontrados na avaliaç̃o microbiológica, tendo em vista o ambiente favorável ao desenvolvimento microbiano, o que está de acordo com os achados de Moriaty, 1997; Alam et al., 2001; Riquelme; Avendaño-Herrera, 2003; Costa 2006.

Embora na Resoluç̃o CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005) não estejam estabelecidos limites para v́brios em águas salinas, de acordo com Guimarães et al. (2004), para a aquicultura é aceito um máximo de 10^3 UFC/100 mL para bact́rias e 10^2 UFC/100 mL para v́brios, assim, Costa (2006) alerta para que elevados índices de v́brio em águas destinadas a cultura de organismos marinhos podem representar risco de contaminaç̃o para a fauna aquática.

5.5.2.2. Desempenho zootécnico

Muitos estudos revelaram aspectos positivos na utilização de microrganismos probióticos, incluindo, por exemplo: redução do número de patógenos e melhora na qualidade da água (ALFONSO et al., 1997), melhora do apetite e/ou desempenho das espécies cultivadas (DECAMP e MORIARTY, 2005, VIEIRA et al., 2007), redução de mortalidade (MORIARTY, 1998; RENGPIPAT et al., 1998; VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003, RAVI et al., 2007, VIEIRA et al., 2007), diminuição da microbiota patogênica intestinal (GULLIAN; THOMPSON; RODRIGUEZ, 2004, TORO, 2005), e maior resistência às doenças (PATRA; MOHAMED, 2003; SOTOMAYOR; BALCÁZAR, 2003; ABRAHAM, 2004).

No presente trabalho, quanto aos parâmetros zootécnicos, embora tenham sido detectados valores nominais diferentes nas variáveis zootécnicas de sobrevivência, peso final, ganho de peso e biomassa final entre diferentes tratamentos, não houve diferença estatística entre estes, o que pode ser explicado pela grande variação individual entre os animais, refletida nos valores elevados dos coeficientes de variação (Tabela 5).

TABELA 5. Sobrevivência, peso final, ganho de peso, biomassa final de camarões alimentados com dietas com diferentes bactérias candidatas a probiótico.

Tratamento	Sobrevivência (%)		Peso final (g)		Ganho de peso (g)		Biomassa final (g)	
	Média	CV%	Média	CV%	Média	CV%	Média	CV%
Controle	61,11	62,98	0,29	38,47	0,27	41,36	3,20	82,40
PURS2	42,59	66,93	0,23	40,90	0,22	44,64	1,88	74,62
PURS8	64,81	38,65	0,18	33,01	0,16	37,25	2,14	52,45
PURS17	61,11	41,66	0,30	14,07	0,28	15,07	3,19	33,95
PURS20	66,66	30,05	0,17	8,00	0,15	9,08	2,00	30,45

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos para as variáveis estudadas.

Diferentemente do resultado encontrado no presente trabalho, Jintasataporn et al. (2010) investigaram o efeito da AquaStar® engorda (BIOMIN GmbH, Áustria), que é uma mistura de cepas probióticas contendo *E. faecium*, em *Litopenaeus vannamei* sobre os

parâmetros de produtividade e observaram que a produção de camarão por metro quadrado aumentou em 9,4% no grupo submetido a dieta com o probiótico em comparação com o controle. Os autores relataram que o aumento no desempenho pode ser devido a otimização das condições de pH do sistema digestivo, pela produção do ácido láctico, favorecendo a digestão e absorção de nutrientes.

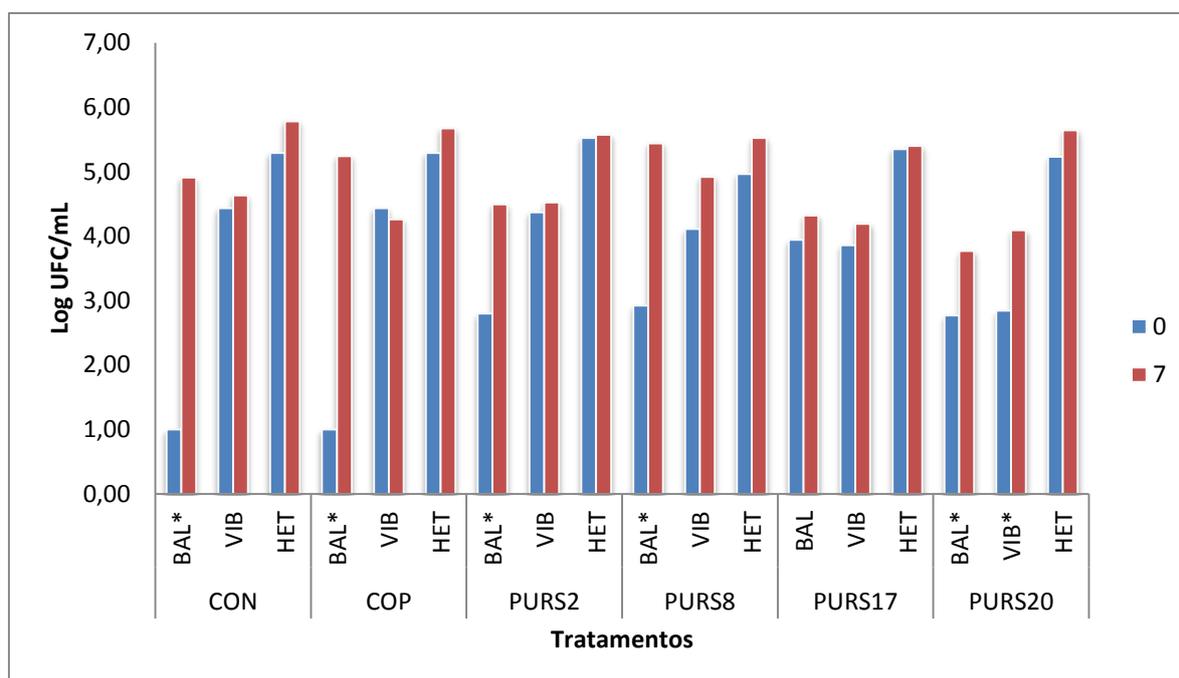
Krummenauer et al. (2009) investigaram o efeito da aplicação de probiótico comercial multicepas contendo *Enterococcus* (AquaStar® Growout) associado a um probiótico contendo apenas *Bacillus* sp, em cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos contaminado com *V. parahaemolyticus*. Os autores observaram que a sobrevivência, a taxa de crescimento, a biomassa final e a produtividade do sistema foram significativamente maiores nos grupos que receberam os probióticos. O aumento dos parâmetros de produtividade pode ser devido, segundo os autores ao controle efetivo do *V. parahaemolyticus* no sistema de cultivo.

Supamattaya et al. (2005) demonstraram em uma serie de estudos in vivo que *E. faecium* também é capaz de colonizar o intestino do camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) e induzir um impacto positivo na ecologia bacteriana do intestino, inibindo *Vibrio* spp. através de exclusão competitiva.

Em estudos *in vitro* Roskopf, (2010) demonstrou que *Enterococcus faecium* tem propriedades de inibição contra vários agentes patogênicos aquáticos, como *Yersinia ruckeri*, *Vibrio harveyi*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas veronii*. Da mesma forma, Swain; Singh; Arul (2009) demonstraram a ação inibitória de *E. faecium* frente a *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*. Mayer (2011) destaca o grande potencial de *Enterococcus* no controle das vibrioses patogênicas em cultivo de camarão.

5.5.3 Ensaio de desafio com *Vibrio harveyi*

No ensaio de desafio frente ao *Vibrio harveyi*, as análises da presença de bactérias ácido lácticas, víbrios e bactérias heterotróficas da água dos tanques dos tratamentos (Figura 3) e dos camarões (Figura 4) nos dias zero (pré-desafio) e sete (pós-desafio) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos para algumas das bactérias avaliadas, para a maioria dos tratamentos.



Legenda: BAL = bactérias lácticas; VIB = víbrios; HET = Heterotróficas; COP = controle positivo; CON= controle negativo

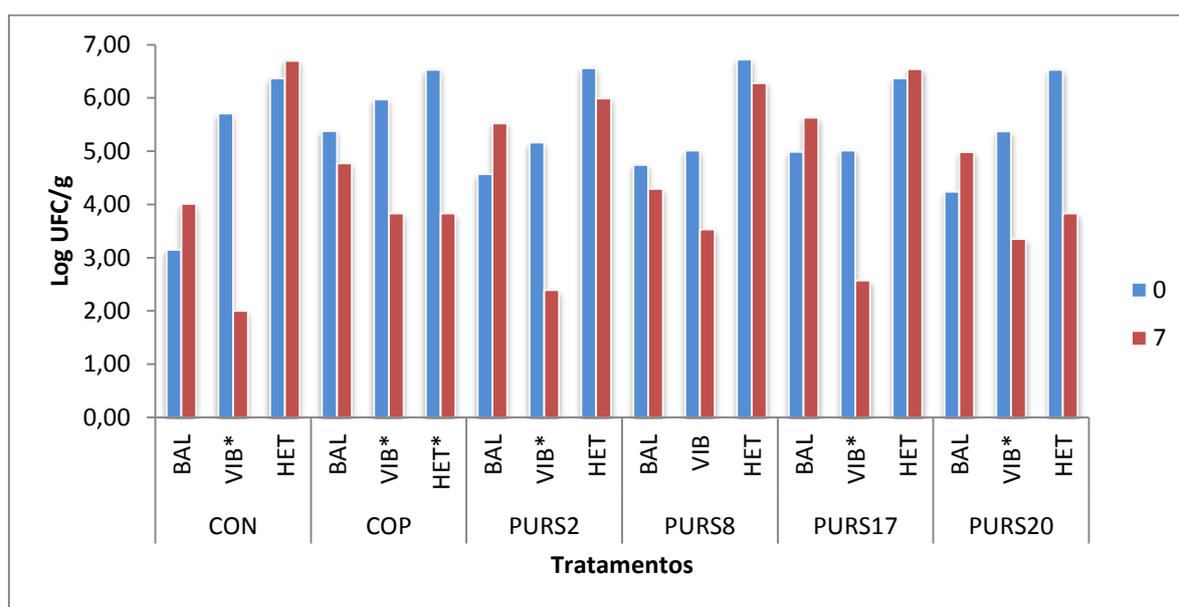
FIGURA 3. Contagem microbiana das bactérias ácido lácticas, víbrios e bactérias heterotróficas na água dos diferentes tratamentos antes e após o desafio com *Vibrio harveyi*

Na água de cultivo para todos os tratamentos a contagem de bactérias heterotróficas nos dias 0 e 7 não apresentou diferença significativa, mantendo-se na faixa de 10^5 UFC.mL⁻¹ (Figura 3). Na contagem de víbrios houve um aumento significativo ($p < 0,05$) apenas no tratamento PURS20. As bactérias ácido lácticas apresentaram um aumento na concentração entre os dias 0 e 7 para todos os tratamentos, com exceção de PURS17 (*E. faecium*).

A presença de bactérias ácido lácticas na água de todos os tratamentos, certamente se deveu ao fato de as espécies fornecidas com a dieta suplementada (*E. gallinarum* e *E. faecium*) serem bactérias comuns ao trato digestivo de animais e estarem associadas as fezes,

além de contarem com resíduos de alimento fornecido diariamente, tendo encontrado um ambiente favorável para a colonização da água. Esse resultado difere do observado por Vieira et al. (2010), que trabalhando com dietas suplementadas com *L. plantarum* para alimentação de *L. vannamei*, em condições de laboratório e de viveiro, não encontraram as bactérias ácido lácticas na coluna de água dos ambientes estudados.

Os vibrios mantiveram-se estáveis ($P > 0,05$) na água, em todos os tratamentos, na concentração de 10^4 UFC.mL⁻¹, menos no tratamento com adição de PURS20 (*E. galinarum*), onde aumentaram de 10^3 UFC.mL⁻¹ para 10^4 UFC.mL⁻¹ igualando-se aos demais tratamentos. Na contagem total de heterotróficos, no entanto, não houve diferença significativa na colonização da água no tempo, o que pode estar relacionado a capacidade de suporte do sistema em termos de disponibilidade de nutrientes e de oxigênio.



Legenda: BAL = bactérias lácticas; VIB = vibrios; HET = Heterotróficas; CON = controle negativo; COP = controle positivo

FIGURA 4. Contagem microbiológica de bactérias lácticas, vibrios e bactérias heterotróficas nos camarões dos diferentes tratamentos antes e após o desafio com *Vibrio harveyi*

Nesse estudo, nos camarões cultivados a contagem de bactérias lácticas não apresentou diferença significativa em nenhum tratamento após o desafio com *Vibrio harveyi* (Figura 4).

De maneira geral, no entanto, houve uma redução ($P < 0,05$) na contagem de vibrios em todos os tratamentos, inclusive nos controles negativo e positivo, com exceção do PURS8, que embora não tenha apresentado diferença significativa, mostra claramente uma tendência de redução semelhante aos demais tratamentos. Pode-se atribuir este resultado às condições ambientais favoráveis que possibilitaram resposta imune dos camarões aos vibrios, mascarando a eventual ação dos probióticos.

A contagem de bactérias heterotróficas reduziu significativamente ($p < 0,05$) apenas para o controle positivo, o que reforça a ausência de relação causa-efeito entre uso dos probióticos e redução da microbiota intestinal do camarão.

Vale a pena destacar, que após o desafio a sobrevivência dos camarões alimentados com a dieta suplementada com as bactérias ácido lácticas (*E. gallinarum* e *E. faecium*) e no controle negativo foi superior ($P < 0,05$) em relação ao controle positivo (88,9%). Assim, embora não se tenha detectado efeito significativo dos probióticos na redução da microbiota intestinal dos camarões, a maior taxa de sobrevivência (100%) nos tratamentos suplementados com probiótico possivelmente resultam da colonização do intestino e hepatopâncreas pelas cepas utilizadas, com exclusão competitiva ou ainda por possível ação de bacteriocinas.

Diferentemente do presente estudo, diversos estudos com crustáceos foram realizados infectando camarões com *Vibrio* sp. e testando o efeito protetor de um eventual probiótico (RENGPIPAT et al., 2000; VASEEHARAN; RAMASAMY, 2003; ALAVANDI et al., 2004; GULLIAN; THOMPSON; RODIGUEZ, 2004) com resultados favoráveis aos probióticos. Vaseeharan; Ramasamy (2003) relataram estudo onde a infecção de camarões com *Vibrio harveyi* causou 100% de mortalidade em 17 dias de experimento e quando os animais foram expostos ao *Bacillus subtilis* cepa BT23 por cinco dias antes da infecção experimental, a mortalidade caiu para 32%.

Entre as bactérias ácido lácticas (BAL) cepas probióticas de *E. faecium* podem ser consideradas para o uso em aquicultura (LAUKOVÁ, 2012). Swain; Singh; Arul (2009) encontraram *E. faecium* inibindo bactérias patogênicas para camarão *Penaeus monodon* como

V. harveyi e *V. parahaemolyticus*. Quando *E. faecium* foi adicionado em tanques de pós larvas na concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹ a mortalidade foi de 16% comparada ao controle (40%).

Supamattaya et al. (2005) utilizaram uma mistura probiótica multi-estirpe contendo *E. faecium* (AquaStar ®, BIOMIN GmbH, Áustria) na dieta de camarões durante seis semanas e obtiveram redução do número total de *Vibrio* spp. no intestino e hepatopâncreas dos animais. Os autores observaram que *Enterococcus* pode colonizar o intestino de camarão e reduzir o número de agentes patogênicos através de exclusão competitiva.

Roskopf (2010) demonstrou em estudos *in vitro* que *E. faecium* tem propriedades de inibição contra um largo espectro de agentes patogênicos aquáticos, incluindo *Yersinia ruckeri*, *Vibrio harveyi*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas veronii*.

Usando a técnica da hibridação fluorescente *in situ* (FISH), Supamattaya et al. (2005) demonstraram, em uma série de estudos *in vivo* que *E. faecium* também é capaz de colonizar o intestino de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) e induzir impacto positivo sobre a ecologia bacteriana do intestino, inibindo *Vibrio* spp. através de exclusão competitiva. Observaram também que a aplicação da dieta com *E. faecium* pode aumentar a resposta imune dos camarões (por aumento do nível de hemócitos granular).

Há consenso geral de que as bactérias probióticas originárias de fonte autóctone têm maior chance de colonização no intestino do hospedeiro conferindo benefícios a sua saúde (CARNEVALI et al. 2004; FJELLHEIM et al. 2010; SUN et al. 2010).

Segundo Lauková (2012), *Enterococcus* têm mostrado uma influência positiva na saúde de diversos animais, combinando com sua resiliência eles são excelentes candidatos a probiótico. A preocupação com transferência de resistência a antibióticos deve ser considerada analisando-se cepa por cepa para a escolha de probióticos seguros.

Gaggia; Mattarelli; Biavati (2010) destacam como características esperadas e critérios de segurança de um probiótico os seguintes parâmetros: a) não ser tóxico ou patogênico; b) ter identificação taxonômica precisa; c) ser habitante normal da espécie-alvo; e d) sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal da espécie-alvo. De acordo com os autores, esse último

fator implica em resistência ao suco gástrico e bile, persistência no trato gastrointestinal, adesão ao epitélio ou muco, competição com a microbiota residente, produção de substâncias antimicrobianas, antagonismo para bactérias patogênicas, modulação de respostas imunes, possuir propriedades promotoras da saúde, ter estabilidade genética e manter a estabilidade das características desejadas durante o armazenamento, processamento e entrega, com viabilidade em populações elevadas, além de resistir aos processos tecnológicos quando incluídos em produtos industriais.

Infecções por *Vibrio* spp. são conhecidas na carcinicultura e apresentam sinais clínicos característicos, embora não patognomônicos, tais como: letargia, perda de apetite, hepatopâncreas manchados e necróticos com a presença de agregação de células digestivas, descoloração do corpo, amarelecimento do tecido branquial, manchas brancas no músculo abdominal, melanização, necrose e inflamação de órgãos (brânquias, coração) e algumas vezes luminescência (MAYER, 2011). No presente trabalho na avaliação clínica por exame macroscópico dos animais após o desafio, não foi observada qualquer alteração comportamental ou lesional que pudesse sugerir a ocorrência de doença infecciosa por víbrio.

6. CONCLUSÕES

Espécies de *Enterococcus gallinarum* e *E. faecium* isoladas de trato gastrointestinal de camarões *Penaeus schimitti* apresentam potencial *in vitro* para uso como probiótico, por serem resistentes a baixos níveis de pH (3,5) e a presença de sais biliares (0,3%) e apresentarem antagonismo frente ao *Vibrio harveyi*.

O emprego de dietas suplementadas com espécies de *Enterococcus* (*E. faecium* e *E. gallinarum*) isoladas de trato gastrointestinal de camarões *Penaeus schimitti*, embora apresente resultados inconsistentes em relação ao desempenho zootécnico dos animais, e em relação a redução da microbiota intestinal a suplementação da dieta com *E. faecium* ou *E. gallinarum* influencia positivamente a sobrevivência dos animais quando desafiados com *Vibrio harveyi*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora as cepas de *Enterococcus* isoladas de intestino de camarão *Penaeus schimitti* e administradas na alimentação de camarão *Litopenaeus vannamei* tenham mostrado capacidade para colonizar os animais e reduzir a contagem de *Vibrios* spp., quando submetidos ao desafio *in vivo* com o *Vibrio harveyi*, é prudente que se façam mais avaliações quanto a segurança dessas cepas para uso comercial, tendo em vista, o risco que podem apresentar, sabendo-se que algumas espécies e cepas do gênero podem apresentar plasmídios, que podem codificar e transferir genes de resistência a antibióticos.

REFERÊNCIAS

ABCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. **Programa de Biossegurança para Fazendas de Camarão Marinho**. 1. ed./ ABCC: Recife, 2005.

Disponível em:

http://www.abccam.com.br/abcc/images/stories/publicacoes/manual_de%20biossegurana.pdf.

Acesso em: 27 jan. 2012.

ABCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. **Balança comercial de pescado 2011** disponível em:

<http://abccam.com.br/abcc/images/stories/balana%20comercial%20-%20ano%202011>,

Acesso em: 27 jan. 2012.

Abd El-RHMAN, A.M.; KHATTAB, Y.A.; SHALABY, A.M., *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 27, p. 175-180, 2009.

ABE, Y.; NAKAMURA, K.; YAMADA, M.; YAMAMOTO, Y. Encephalomalacia with *Enterococcus durans* infection in the brain stem and cerebral hemisphere in chicks in Japan. **Avian Diseases**, v. 50, p. 139-141, 2006.

ABRAHAM, T. J. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. **World Fish Center, Quarterly**, v. 27, n. 3&4, jul-dec, 2004. Disponível em: <<http://www.worldfishcenter.org/Naga/naga27-3n4/pdf/article05.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2009.

ALAM, M. J.; TOMOCHIKA, K.; MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Analysis of seawaters for the recovery of culturable *Vibrio parahaemolyticus* and some other Vibrios. **Microbiol. Immunol.**, v. 45, n. 5, p. 393-397, 2001.

ALAVANDI, S. V.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T.; POORNIMA, C. M.; JITHENDRAN, K. P.; ALI, S.A.; RAJAN, J. J. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio* !uvialis PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.**, v.17, n.2, p.115-20, 2004.

ALFONSO, E.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E.; QUARESMA J. Manejo del agua en larvicultura intensiva del camarón blanco *Penaeus schmitti*. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 18, n. 1, p. 70-74, 1997.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

ALVES, C.S.; MELLO, G.L. **Manual para o Monitoramento Hidrobiológico em Fazendas de Cultivo de Camarão**. FAEPE/COMCARCI/SEBRAE/PE, Recife, 2007. 58p.

- ALY, S.M.; Abd-El-RAHMAN, A.M.; JOHN, G.; MOHAMED, M.F. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. **Aquaculture**, v. 277, n. 1-2, p. 1 – 6, 2008.
- AUSTIN, B.; STUCKEY, L.; ROBERTSON, P.; EFFENDI, I.; GRIFFITH, D. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. **J. Fish Dis.** v. 18, p.93-96. 1995.
- BALCAZAR, J.L.; **Evaluation of probiotic bacterial strain in *Litopenaeus vannamei***. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador. 2003.
- BALCAZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CINNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. Microbial.** v. 114, p. 173-186, 2006.
- BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J.L.; GIRONES, O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish **Aquaculture**, v. 10., p. 188–191, 2008.
- BARBIERI JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 370p.
- BASANTA, A.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ-SALA, B.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P.E.; CINTAS, L.M. Antimicrobial activity of Enterococcus faecium L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 293–307, 2008.
- BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two Lactobacillus strains in vitro. **Milchwissenschaft.** v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.
- BLY, J.E.; QUINIOU, S.M-A.; LAWSON, L.A.; CLEM, L.W. Inhibition of Saprolegnia pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Fish Diseases**, n. 20, p. 35-40, 1997.
- BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V; NIMRAT, S. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture nutrition**, v.17, n.6, p.634-644, 2011.
- BOYD, C. E. **Manejo da qualidade de água na aquicultura e no cultivo do camarão marinho**. 1. ed. Recife: ABCC, 2000.
- BOYD, C. E. Parâmetros da qualidade de água: oxigênio dissolvido. **Revista da ABCC**, Recife, v. 4, n. 1, p. 66-69, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa MA nº 42**, de 20 de dezembro de 1999 - Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de

Origem Animal - PNCR, e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 1999. Seção 1.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, CONAMA, Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. 23p. In: conselho nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resoluções do CONAMA: resoluções vigentes, publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012**/Ministério do Meio Ambiente, Brasília: MMA, 2012. 1126p.

BUNTIN, N.; CHANTHACHUM, S.; HONGPATTARAKERE, T. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiótico. Songklanakarin **Journal of Science and Technology**, v. 30 (Suppl.1), p. 141-148, 2008.

BURLAND, T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 71-91, 2000.

CAMPOS, A.A. B.; MAIA, E.P.; COSTA, W.M.; BRITO, L.O.; GALVEZ, A.O. Qualidade da água em fazenda de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* com sistema de recirculação parcial. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 819-826, out./dez. 2008.

CARLOS, A. R. **Análise da expressão gênica em estirpes de *Enterococcus* como resposta a diferentes condições ambientais** Universidade de Lisboa, Mestrado em Biologia Molecular e Genética. Lisboa, Portugal, 2008, 45p. (Dissertação)

CARNEVALI, O.; ZAMPONI, M.C.; SULPIZIO, R.; ROLLO, A.; NARDI, M.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; CAGGIONO, M.; POLZONETTI, A.M.; CRESCI, A. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. **Aquaculture Int.**, v. 2, p. 377-386, 2004.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CARVALHO, F.C.T.; BARRETO, N.S.E.; REIS, C.M.F.; HORFER, E.; VIEIRA, R.H.S.F. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no estado do Ceará. **Rev. Cienc. Agron.**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p. 549-556, 2009.

CARVALHO, R.; PÉREZ, A.C.A.; JARDIM, F. **Medidas de Prevenção Sanitária em Aquicultura**: Guia prático da sanidade dos animais aquáticos, Belo Horizonte, Conselho Regional de Medicina Veterinária, 16 p., s/d).

CHADFIELD, M.S., CHRISTENSEN, J.P., JUHL-HANSEN, J., CHRISTENSEN, H., BISGAARD, M. Characterization of *Enterococcus hirae* outbreaks in broiler flocks demonstrating increased mortality because of septicemia and endocarditis and/or altered production parameters. **Avian Diseases**, v. 49, 2005. p.16–23.

CHANG, C.I.; LIU, W.Y. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla L.* **Journal of Fish Diseases**, n. 25, p. 311-315, 2002.

CHEN, D. K.; PEARCE, L.; McGEER, A.; LOW, D. E.; WILLEY, B. M. Evaluation of D-Xylose and 1% Methyl- α -D-Glucopyranoside fermentation tests for distinguishing *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium* **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n. 10, p. 3652-3655, 2000.

COSTA, R.A. **Pesquisa de Vibrio no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará.** UFC/LABOMAR, Curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, Ceará, 2006. 102p. (Dissertação).

COSTA, S.W.; VICENTE, L.R.M.; SOUZA, T.M.; ANDREATTA, E.R.; MARQUES, M.R.F. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.12, p.1521-1530, dez. 2010.

CRUZ-LACIERDA, E.R.; DE LA PEÑNA, L.; LUMANLAN-MAYO, S. The use of chemicals in aquaculture in the Philippines. In: ARTHUR, J.R.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). **Use of chemicals in aquaculture in Asia.** Iloilo: Southeast Asian Fisheries Development Center, 2000. p.155-184.

DALMIN, G.; KATHIRESAN, K.; PURUSHOTHAMAN, A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indian J. Exp. Biol.** V. 39, p. 939-942, 2001.

DECAMP, O. Probiotics in aquaculture: a commentary based on some recent observations. **Aqua Feeds: formulation & beyond**, v. 1, p. 4, 2004.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. Probióticos como alternativa anti-microbiana: limitações e potencial. **Revista da ABCC**, n. 4, p. 58-59, 2005.

DE MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E.. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Applied Bact.**, v. 23, p. 130-135, 1960.

DEVARAJA, T. N.; YUSOFF, F. M.; SHARIFF, M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. **Aquaculture**, v. 206, p. 245-256, 2002.

DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedures for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** v. 19, p. 11-15, 1987.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. **O estado mundial da pesca e da aquicultura.** Roma, 2012. 250p.

FJELLHEIM, A.J.; KLINKENBERG, G.; SKJERMO, J.; AASEN, I.M.; VADSTEIN, O. Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Vet. Microbiol.**, 29, 153-159, 2010.

FOULQUIÉ MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; De VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1–24, 2006.

FLORES-MIRANDA, M.C.; LUNA-GONZALEZ, A.; CAMPA-CÓRDOVA, A.J.; GONZALEZ-OCAMPO, H.A.; FIERRO-CORONADO, J.A.; PARTIDA-ARANGURE, B.O. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. **Aquaculture**, v.320, p.51-55, 2011.

FRANCO, I. **Isolamento, identificação e caracterização molecular de bactérias candidatas a probióticos em organismos aquáticos**. Salvador, 2009. Programa de Pós-graduação Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, 2009. 67p. (Dissertação).

FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, n.151, p.125–140, 2011.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol**, n. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R. _Ed., Probiotics: the Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, 1992. p. 1–8.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 515-528, 2010.

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

GIBSON, R. The decapod hepatopancreas **Oceanograf. Mar. Biol. Ann. Rev.**, v. 17, p. 285-346, 1979.

GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 377-381, 1985.

GIROTTO, M.V.F. **Efeitos da amônia sobre juvenis de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) e *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD, 1936): Excreção e toxicidade**. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. 84p. (Dissertação).

GOMEZ-GIL, B.; HERRERA-VEGA, M.; ABREU-GROBOIS, F.; ROQUE, A. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). **App. Environ. Microbiol.** v. 64, p. 2318-2322, 1998.

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.

GRAM, L.; MELCHIORSE, J.; SPANGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 969-973, 1999.

GRAM, L.; LOVOLD, T.; NIELSEN, J.; MELCHIOSEN, J.; SPANGGAARD, B. *In Vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. **Aquaculture**, v. 199, n. 1, p. 1-11, 2001.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, supl.2, p. 245-250, 2005.

GUIMARÃES, J. I.; CUNHA, P. E. V.; SILVA, E. A. J.; ALMEIDA, M. A. M.; REGO, F. L.; A. JÚNIOR, L. B.; SILVA, M.; OLIVEIRA, A. R. S. B.; ALBUQUERQUE, L. F. C. **Caracterização biofísicoquímica dos efluentes e afluentes das fazendas de cultivo de camarões do Rio Grande do Norte**, 2004. Disponível em: <http://www.idema.rn.gov.br/arquivos%5C7%5CProduto%20Final%5Csum%5C%3%A1rioRelat%5C%3%B3rio.doc>. Acesso em: 05/08/2012.

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

GUPTA, P.K.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International J. Food Microbiol.**, v. 29, p. 105-109, 1996.

HERNÁNDEZ, J. Z.; NUNES, A. J. P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. **Revista da ABCC**, Recife, v. 3, n. 2, p. 55-59, 2001.

HUFF, B.A.; EMPTOR, C. "Probiotics" might not be what they seem. **Canadian Family Physician**, v. 50, p. 583-587, 2004.

IMMANUEL, G.; VINCYBAI, V.C.; SIVARAM, V.; PALAVESAM, A.; MARIAN, M.P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture**, 336, p. 53-65, 2004.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Disease**, n. 25, p. 633-642, 2002.

JOBORN, A.; OLSSON, J.C.; HESTERDAHL, A.; CONWAY, P.L.; JELLEBERG, S. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. Strain K1. **Journal of Fish Disease**, n. 20, p. 383-392, 1997.

KAUTSKY, N.; RONNBAC, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 145-161, 2000.

KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **Int.J.Food Microbiol.**, v.50, p.45-57, 1999.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; BADSTUBNER, D.; WERNER, G.; WITTE, W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 269-290, 2003.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 123- 131, 2003.

KRUMMENAUER D, ABREU PC, LARA G, POERSCH L, ENCARNACAO P, WASIELESKY JR W. The Effect of Probiotic in *Litopenaeus vannamei* Biofloc Technology Culture System contaminated with *Vibrio parahaemolyticus*. **Abstract World Aquaculture Conference**, Mexico, 2009.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA M.A. ; GUZMAN-MENDEZ, B. E. ; LOPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, p. 193-201, 2003.

LATEGAN, M.J.; TORPY, F.R.; GIBSON, L.F. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. **Aquaculture**, v. 240, p. 19-27, 2004.

LAUKOVÁ, A. **Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing *Enterococcus* and their bacteriocins** In: LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V. Lactic Acid Bacteria – Microbiological and functional aspects. 4 ed, Boca Raton, Londres: RC, 2012. p.39-61.

LAVORANTE, B. R. B. O; SANTOS P. N.; MENDES, P. T. S.; MENDES, E. S. Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n .7, p. 738-745, 2009.

LYLE-FRITCH, L.P.; ROMERO-BELTRÁN, E.; PAÉZ-OSUNA, F. A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico), **Aquacultural Engineering**, n. 35, p. 135-146, 2006.

MADRID, Raul Malvino; WURMANN, Carlos G. O futuro da carcinicultura marinha brasileira. **Revista ABCC**, p. 42-47, 2011.

MANGONI, J.; POZZA, M.S. dos S.; SABEDOT, M.A.; POZZA, P.C.; ALMEIDA, S.; HEINZEN, E.L. Potencial probiótico de Lactobacilos de origem suína. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v. 33, n. 3, p. 267-272, 2011.

MARCIŇÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. **Acta Vet.** v. 73, p. 513-519, 2004.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNİK, Y.; RAMBAUD, J.C. The fate and effects of transiting, nonpathogenic micro-organisms in the human intestine. In: SIMOPOULOS, A.P.; CORRİNG, T.; RÉRAT, A, (Ed). Intestinal flora, immunity, nutrition and health. **World Rev. Nutr. Diet**, v. 74, p. 1-21, 1993.

MATTARELLI, P., BRANDI, G., MODESTO, M., BIAVATI, B. Discrepancy between declared and recovered bifidobacteria in a human probiotic. **Annals of Microbiology** 52, 2002. p. 283–286.

MAYER, E. Evaluation of *Vibrio* control with a multi-species probiotic in shrimp aquaculture. **International Aquafeed**, v. 14, n. 6, 2011. Disponível em: <http://www.biomin.net/en/knowledge-center/articles/browse/1/> Consulta em: 02/08/2012

MENDES, E. S.; LIRA, S.; GÓES, M. N. B.; DOURADO, J; MENDES, P. P; BEZERRA, C. A. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.

MOHNEY, L.L.; WILLIAMS, R.R.; BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapod), fed medicated feed for 14 days. **Aquaculture**, v. 149, p. 193-202, 1997.

MORIARTY, D. J.W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 151, p. 333-349, 1997.

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

MORIARTY, D.J.W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL, 8, 1999. Canada. **INTERNATIONAL SYMPOSIUM**. Canada, 1999.

MPA – Ministério da Pesca e da Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, fevereiro de 2012. 129p.

MUNDIT, T. L. J. O. Enterococci. In: HOLT, G.H.; KREIG, N. R. SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLANS, S. T **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 1063-1065.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 513-522, 2000.

NATORI, M.M.; SUSSEL, F.R.; SANTOS, E.C.B.; PREVIERO, T.C.; VIEGAS, E.M.M.; GAMEIRO, A.H. Desenvolvimento da Carcinicultura Marinha no Brasil e no Mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, SP, v. 41, n. 2, 2011.

NEWMANN, E.; FERREIRA, C.L.L.F. *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjunct: “in vitro” susceptibility to gastric juice, bile salts, lysozyme and chemotherapeutic agents. *Revista de Microbiologia*, v. 26, p. 59-65, 1995

NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, v. 198, p. 229-236, 2001.

NOGUEIRA-LIMA, A.C.; GESTEIRA, T.C.V.; MAFEZOLI, J. Oxytetracycline residues in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) submitted to antibiotic treatment. *Aquaculture*, v. 254, p. 748-757, 2006.

NRC - NACIONAL RESEARCH COUNCIL- Nutrient Requeriments of Fish and Shrimp, Washington, D.C., 2011, 363p.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. *Panorama da Aquicultura*, p. 12-16. julho/agosto, 2002.

ONARHEIM, A.M.; WIJK, R.; BURGHARDT, J.; STACKEBRANDT, E. Characterization and identification of two *Vibrio* species indigenous to the intestine of fish in cold sea water; description of *Vibrio iliopiscarius* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* v. 17, p. 370-379, 1994.

PADILHA, P.J.M. **Efeito da utilização de probiótico sobre aspectos microbiológicos e parâmetros de qualidade da água e produtividade em viveiros de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.** Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Florianópolis, 2005. 23f. (Dissertação).

PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, v. 243, p. 241-254, 2005.

PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM², Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.; JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World J.I of Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 35-37, 2006.

PATRA, S.K.; MOHAMED, K.S. Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International*, v. 11, p. 505-514, 2003.

PIARD, J.C.; DESMAZEUD, M. Inibiting factors producet by lact acid bacteria 2. Bacterioces and other antibacterial substances. *Lait*, v.72, p.113-142, 1992.

PILLAY, T. V. R. **Aquaculture: principles and practices.** Oxford: Fishing News Books, 1990.

- PLANAS, M.; PÉREZ-LORENZO, M.; HJELM, M.; GRAM, L.; FIKSDAL, I.U. ; BERGH, PINTADO, J. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 323-333, 2005.
- POLLMANN, M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K.; WIELER, L. H. Effects of a Probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on the Rate of Natural Chlamydia Infection in Swine. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4346-4353, 2005.
- PONTES, C.S.; ARRUDA, M.F. Acesso ao alimento artificial e enchimento do trato digestivo de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone) durante as fases clara e escura do período de 24 horas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1039-1043, 2005.
- PORTELLA, C.G. **Tecnologia pós-despesca dos camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii* e *Macrobrachium amazonicum***. Programa de Pós Graduação em Aqüicultura, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal: CAUNESP, 2009. 81p. (Tese).
- RAVI, A.V.; MUSTHAF, K.S.; JEGATHAMMAL, G.; KATHIRESAN, K.; PANDIAN, S.K. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 219-223, 2007.
- REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, ARARAQUARA, SP, 2008, 109p. (Dissertação).
- RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL S.; MENASVETA, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v. 167, p. 301-313, 1998.
- RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). **Aquaculture**, v. 191, p. 271-288, 2000.
- RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATIRATITIVORAKUL S. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 134-143, 2008.
- RINGO, E.; VADSTEIN, O. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, p. 227-33, 1998.
- RIQUELME, C.; AVENDAÑO-HERRERA, R. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y su potencial uso en acuicultura. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 76, p. 725-736, 2003.

- ROBERTSON, P.A.W.; O'DOWD, C.; BURRELLS, C.; WILLIAMS, P.; AUSTIN, B. Use of *Carnobacterium sp.* as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Aquaculture**, v. 185, p. 235-243, 2000.
- ROCHA, I. P. Panorama da Carcinicultura brasileira em 2007: desempenho, desafios e oportunidades. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 17, n 104. p. 26-31, 2007.
- RODRIGUES, M. A. M. . Resistência a sais biliares de *Lactobacillus acidophilus*. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 98, p. 57-61, 2002.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort (Eds.), **Plant Molecular Biology Manual** (3rd ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, U.S.A., 1994. p. D1–D8.
- ROSSKOPF, S. In vitro evaluation of inhibitory activities of probiotics against aqua-pathogens for their possible use in aquacultures. Bachelorthesis, Biomin Holding GmbH, Tulln. 2010
- SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV – Viçosa/MG, 2007.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trend food Sci Technol.**, v.10, p.107-110,.1999.
- SAMLI, H.E., SENKOYLU, N., KOC, F., KANTER, A.M.A. Effects of Enterococcus faecium and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, p.42–49, 2007.
- SAMPAIO, Y.; COSTA, E.F.; SAMPAIO, E.A. B. R. Impactos socioeconômicos do cultivo de camarão marinho em municípios selecionados do Nordeste brasileiro. **Rev. Econ. Sociol. Rural** [online], v. 46, n. 4, p. 1015-1042, 2008.
- SANCHES, E. G.; PANNUTI, C. V.; SEBASTIANI, E.F., A piscicultura marinha como opção para a carcinicultura brasileira. **Revista Aquicultura & Pesca**, n. 36, p. 12-19, 2008.
- SCHOLZ, U.; GARCIA-DIAZ, G.; RICQUE, D.; CRUZ SUAREZ, L.E.; VARGAS-ALBORES F.; LATCHFORD J. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeasts products. **Aquaculture**, v. 176, p.271-283, 1999.
- SHARIFUZZAMAN, S.M. **Studies on probiotics for the control of vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**, Walbaum) Heriot-Watt University School of Life Sciences, Edinburgh, U.K. 2010, 150p. (Thesis).
- SIGGERS, R.H., THYMANN, T., SIGGERS, J.L., SCHMIDT, M., HANSEN, A.K., SANGILDA, P.T. Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate. **Livestock Science**, v. 109, p. 14-18, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 317

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, W. Probiotic feed additives -Effectiveness and expected modes of action. **J. Anim. Feed Sci.**, v. 10, p. 51-67, 2001.

SIMON, O. Micro-Organisms as Feed Additives – Probiotics. **Advances in Pork Production**, v.16, p. 161, 2005.

SOTOMAYOR, M.A.; BALCÁZAR, L.J. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. **Revista AquaTic**, n. 19, p. 9-15, 2003.

SOUZA, D.M.; SUITA, S.M.; LEITE, F.P.L.; ROMANO, L.A.; WASIELESKY, W.; BALLESTER, E.L.C. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 12, p.1828-18370, 2012.

SOUZA, R.M.; MOURIÑO, J.L.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). **Bol. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 17 – 24, 2010.

SPANGGAARD, R.; HUBER, I.; NIELSEN, J.; SICK, E.; PIPPER, C.; MARTINUSSEM, T.; GRAM, L. The probiotic potencial against vibrioses of the indigenous of rainbow trout. **Environ. Microbiol.**, v. 3, p. 755-765, 2001.

SUN, Y.Z.; YANG, H.L.; MA, R.L.; SONG, K. Survival of lactic acid bacteria isolated from gut of *Epinephelus coioides* in mimic gastrointestinal environments. **J. Fish. Sci. China**, v. 17, p. 128-135, 2010.

SUN, Y.Z.; YANG, H.L.; MA, R.L.; SONG, K.S.; LI, J.S. Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium*, on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 281-289, 2012.

SUPAMATTAYA, K.; VIRIYAPONGSUTEE, B.; RUANGSRI, J.; ENCARNACAO, P.; SCHATZMAYR, G. 2005. Effect of probiotic *Enterococcus faecium* and phycophytic substances on growth performance and health condition of white shrimp (*Penaeus vannamei*). In: Mayer. E. (Ed.), Evaluation of Vibrio control with a multi-species probiotic in shrimp aquaculture.

SUSSEL, F. R. ; VIEGAS, E. M. M. ; PARISI, G. Acquacoltura in Brasile. **Revista Il Pesce**, Modene, n. 2, p. 49-55, Mar./Apr. 2010.

SWAIN, S.M., SINGH, C., ARUL, V. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against Vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 697–703, 2009.

TAGG, J. R. and McGIVEN, A. R. Assay systems for bacteriocins. **App. Microbiol.** V. 21, p.943-945, 1971.

TARAS, D.; VAHJEN, W.; MACHA, M.; SIMON, O. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 608-617, 2006.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probiótico, prebiótico e simbiótico**, Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, 2001. 113p. (Tese).

TIMMERMAN, H.M., VELDMAN, A., VAN DEN ELSEN, E., ROMBOUITS, F.M., BEYNEN, A.C. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. **Poultry Science**, v. 85, p. 1383-1388, 2006.

TORO, C.R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Florianópolis, 2005. 173p. (Tese).

VAHJEN, W., JADAMUS, A.; SIMON, O. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poult. **Archives of Animal Nutrition**., v. 56, n. 6, p. 419-29, 2002.

VAHJEN, W.; MANNER, K. The effect of a probiotic *Enterococcus faecium* product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Clostridium* spp. in faeces. **Arch Tierernahr**, v. 57, n. 3, p. 229-233, 2003.

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

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

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

VIEIRA, N.F.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE NETO, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; BELTRAME, E.; JATOBÁ, A.; MARTINS, M.L.; RAMÍREZ, C.; VINATEA, L.A.A. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harvey*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n. 4, p. 251-255, 2007.

VIEIRA, N.F.; BUGLIONE NETO, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JATOBÁ, A.; RAMÍREZ, C.; MARTINS, M.L.; BARRACO, M.A.A.M.; VINATEA, L.A. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 763-769, jun. 2008.

VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.P.L.; JATOBÁ, A. ; MARTINS, M.L.; SCHLEDER, D.D.; ANDREATTA, E.R.; BARRACO, M.A.; VINATEA, L.A. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harvey*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 3, p. 631-638, 2010.

VIEIRA, F.N **Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha** Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação e Aquicultura, Florianópolis, 2010, 133p. (Tese).

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

VINATEA, L. A. **Princípios químicos da qualidade da água em aqüicultura**: uma revisão para peixes e camarões. 1ed. Florianópolis: UFSC, 1997.

WAINBERG, A. A. O pesadelo dos vírus asiáticos ainda ronda a carcinicultura brasileira. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 61, p. 51-52, 2000.

WANG, Y.; XU, Z.; XIA, M. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fisheries Science**, v. 71, n. 5, p. 1036-1041, 2005.

WANNAPRASAT, W., KOOWATANANUKUL, C., EKKAPOBYOTIN, C., CHUANCHUEN, R. Quality analysis of commercial probiotic products for food animals. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, p. 1103-1112, 2009.

XIMENES, L.J.F.; VIDAL, M.F.; FEITOSA, R.A. Recuperação da carcinicultura nordestina pós-crise. **Informe Rural ETENE**, Banco do Nordeste, v. 5, n. 15, 2011. 15p.