



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DE DIETA EXPERIMENTAL COMPOSTA POR FARINHA DE
BIOFLOCO E LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) NO CONTROLE DE
Vibrio spp. DO TRATO GASTROINTESTINAL DE JUVENIS DE *Litopenaeus*
vannamei APÓS DESAFIO POR *Vibrio parahaemolyticus*.**

KARIN BARBOSA DA SILVA

RECIFE - PE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

AVALIAÇÃO DE DIETA EXPERIMENTAL COMPOSTA POR FARINHA DE BIOFLOCO E LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) NO CONTROLE DE *Vibrio* spp. DO TRATO GASTROINTESTINAL DE JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei* APÓS DESAFIO POR *Vibrio parahaemolyticus*.

KARIN BARBOSA DA SILVA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Ricardo Maurano Peixoto

RECIFE - PE

2018

Banca examinadora

AValiação de Dieta Experimental Composta por Farinha de Biofoco e Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) no Controle de *Vibrio* spp. DO TRATO GASTROINTESTINAL DE JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei* APÓS DESAFIO POR *Vibrio parahaemolyticus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade.

Karin Barbosa da Silva / DEPAq-UFRPE (Mestre)

Prof. Dr. Sílvio Ricardo Maurano Peixoto / DEPAq-UFRPE (Orientador)

Profa. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva / DEPAq-UFRPE (Titular)

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho / DB-UFRPE (Titular)

Dra. Juliana Rangel de Aguiar Interaminense (Suplente)

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena / DMFA-UFRPE (Suplente)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que me acompanha e me guia, me fazendo sempre seguir em frente.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT).

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

Aos membros da banca pela disposição e auxílio na melhoria da qualidade deste trabalho com suas sugestões.

Ao Prof. Sílvio Peixoto e Profa. Roberta Soares pelas orientações, pelo recebimento de minha pessoa no LTA e toda ajuda durante o período da graduação e do mestrado.

À Profa. Dionéia Evangelista pelo acolhimento em sua casa, no LEBIOMM e, toda sua ajuda durante o processamento do experimento e dos dados.

À toda equipe do LEBIOMM pela ajuda nas análises durante minha estadia na UFJF.

À toda equipe do LTA: Camila Barros Costa, Camila Mayara dos Santos Brito, Bruna Cáritas Souza do Valle Ferreira, Roberta Maria Cavalcante Nery, Flavio Guilherme Floro Rodrigues, João Victor Albuquerque de Lima, Paloma Luiza de Souza França e Luiz Guilherme Lopes de Lima pelas noites mal dormidas, “correria” durante as análises e toda ajuda durante o mestrado.

Aos grandes amigos que mesmo não estando presentes durante os experimentos, estavam sempre apoiando e torcendo por cada avanço em minha vida.

À minha família pela força e incentivo durante o tempo de academia.

Ao meu namorado Filipe Silva, presente em todos os momentos, dispondo de sua ajuda para finalização deste trabalho.

Sumário

	Página
Agradecimento	03
Lista de figuras	05
Lista de tabelas	06
Resumo	07
Abstract	08
1- Qualificação do problema	09
2.1 Farinha de peixe.	10
2.2 O sistema de cultivo em bioflocos e seu uso como fonte de alimento.	11
2.3 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na dieta de camarões marinhos.	12
2.4 O gênero <i>Vibrio</i> na carcinicultura.	13
2.5 Microrganismos associados ao trato gastrointestinal dos camarões.	14
3- Referências bibliográficas	16
4- Objetivos geral e específicos	22
5- Capítulo I - Avaliação de dieta experimental composta por farinha de biofloco e levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no controle de <i>Vibrio</i> spp. do trato gastrointestinal de juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i> após desafio por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23

Lista de figuras

	Página
Figura 1- Alimentação e tempo de coleta das amostras do trato gastrointestinal (TGI) nos tempos T0, T1, T16, T32 e T48 e também do conteúdo fecal nos tempos T16, T32 e T48 (Círculos grandes), apenas as alimentações nos tempos T8, T24 e T40 (Círculos pequenos). Círculos escuros com padrão representam o momento da inserção de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (VP) na dieta.	32

Lista de tabelas

Página

Tabela 1- Análise proximal, aminoácidos e ácidos graxos dos principais ingredientes (g kg⁻¹). 27

Tabela 2- Composição de aminoácidos e ácidos graxos (g/Kg) das rações experimentais para *L. vannamei* contendo o bioproduto de biofloco e levedura em 29

Tabela 3- Abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. em dietas experimentais para camarões (10⁸ células/g⁻¹), com e sem adição de *Vibrio parahaemolyticus*. Representando rações contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP).

Tabela 4- Sondas oligonucleotídicas de RNAr marcadas, controle negativo (NON), levedura (PF2) e *Vibrio* spp. (VIB572a). Todas as sondas foram marcadas com fluorocromo CY3. 33

Tabela 5- Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no trato digestório de *L. vannamei*, alimentados a cada 16 horas (10⁸ cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, após desafio microbiano por *Vibrio parahaemolyticus* nos tempos T1 a T16. 37

Tabela 6- Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no trato digestório de *L. vannamei*, alimentados a cada 16 horas (10⁸ cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, sem o desafio por *Vibrio parahaemolyticus*. 38

Tabela 7- Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no conteúdo fecal de *L. vannamei*, alimentados a cada 16 horas (10⁸ cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, com indução de desafio microbiano por *Vibrio parahaemolyticus* nos tempos T1 a T16. 40

Tabela 8- Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no conteúdo fecal de *L. vannamei*, alimentados a cada 16 horas (10⁸ cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, com indução de desafio microbiano por *Vibrio parahaemolyticus* nos tempos 1h a 16h. 41

Resumo

A farinha de peixe é um ingrediente de alto custo econômico para a produção das dietas de animais aquáticos. Uma estratégia para diminuir os gastos é a substituição desse ingrediente. Uma alternativa viável é o uso dos bioflocos produzidos pelo sistema de cultivo em bioflocos (BFT) e as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), que podem garantir as necessidades nutricionais, proporcionar diminuição do risco de doenças por atuar como probiótico, além de evitar o despejo dos bioflocos no ambiente e minimizar problemas ecossistêmicos. Os dois ingredientes foram unidos para produção de um bioproduto, elaborado para a substituição da farinha de peixe. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência na diminuição do *Vibrio* spp. no trato gastrointestinal de *Litopenaeus vannamei*, a partir de ração elaborada com bioproduto contendo farinha de bioflocos e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em substituição a farinha de peixe, frente a desafio por *Vibrio parahaemolyticus*. Um ensaio de 21 dias foi realizado com *L. vannamei* ($7,27 \pm 0,14\text{g}$) para exposição a 3 dietas experimentais BP0, BP50 e BP100, com níveis de substituições por bioproduto de 0% (controle), 50% (150 g kg^{-1}) e 100% (300 g kg^{-1} de ração), respectivamente. Logo após o período de exposição, os camarões foram submetidos ao desafio microbiano com duração de 48 horas, através da adição de *V. parahaemolyticus* na alimentação. O trato gastrointestinal (TGI) e as fezes foram coletados no início, a cada 16 horas e logo após fixados em paraformaldeído 2%. As amostras foram submetidas a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para avaliar a abundância total, de levedura e de *Vibrio* spp.. Os resultados mostraram que todas as dietas, incluindo a controle, diminuiram a concentração de *Vibrio* spp. no TGI dos camarões ao final das 48 horas. Indicando que a redução do *Vibrio* spp. pode ter ocorrido naturalmente. Ainda assim, o bioproduto avaliado pode trazer benefícios por ser um ingrediente de baixo custo, possuir as garantias nutricionais para animais aquáticos e ser ambientalmente responsável para substituição da farinha de peixe em dietas de *L. vannamei*.

Palavras-chave: Camarão; farinha de peixe; microrganismos; bactérias; Técnica de FISH.

Abstract

The fishmeal is an economically costly ingredient for the production of aquatic animal diets. One strategy to reduce spending is to replace this ingredient. A viable alternative is the use of bioflocs produced by the biofloc system technology (BFT) and yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*), which can guarantee nutritional needs, reduce disease risk by acting as a probiotic, besides avoiding the dumping of bioflocs in the environment and minimizing ecosystem problems. The two ingredients were united to produce a bioproduct, elaborate for the substitution of fish meal. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficiency in the decrease of *Vibrio* spp. in the gastrointestinal tract of *Litopenaeus vannamei*, as from a processed ration containing biofloc flour and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in replacement of fish meal, on challenge by *Vibrio parahaemolyticus*. A 21-day assay was performed with *L. vannamei* (7.27 ± 0.14 g) for exposure to 3 experimental diets BP0, BP50 and BP100, with substitution levels by bioproduct of 0% (control), 50% (150 g kg⁻¹) and 100% (300 g kg⁻¹ of feed), respectively. Soon after the exposure period, the shrimp were submitted to the microbial challenge with duration of 48 hours, through the addition of *V. parahaemolyticus* in the feeding. The gastrointestinal tract (GIT) and feces were collected at the beginning, every 16 hours and soon after fixed in 2% paraformaldehyde. The samples were submitted to fluorescence in situ hybridization technique (FISH) to evaluate the total abundance of yeast and *Vibrio* spp. The results showed that all diets, including control, decreased the concentration of *Vibrio* spp. in the GIT of the shrimp at the end of 48 hours, indicating that this reduction may have occurred naturally. Nevertheless, the evaluated bioproduct can bring benefits because it is a low cost ingredient, possess the nutritional guarantees for aquatic animals and be environmentally responsible for fish meal substitution in *L. vannamei* diets.

Key words: Shrimp, fish meal, microorganisms, bacterium and FISH technique.

1- Qualificação do problema

A farinha de peixe utilizada na produção de ração para animais marinhos também é a principal fonte de proteína da dieta de camarões, com a presença de aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais, sendo também altamente digerível e palatável (SAMOCHA et al., 2004a). Para obtenção da farinha, o peixe inteiro ou suas partes são moídos e secos (FAO, 2016). Todavia, esse ingrediente possui um alto custo econômico, tornando a dieta responsável por cerca de 40 a 70% dos custos de produção das fazendas (QUINTERO e ROY, 2010).

A alta demanda por farinha de peixe aliada à exploração intensiva dos estoques pesqueiros, estimula estratégias alternativas para sua substituição na produção de rações, com ingredientes de baixo custo e ambientalmente sustentáveis (TACON et al., 2006). Um dos ingredientes utilizados são os agregados microbianos produzidos em sistema de bioflocos, que podem servir como complemento na dieta de organismos, permitindo uma redução na quantidade de proteína bruta utilizada na ração (SAMOCHA et al., 2004b). Os bioflocos também podem atuar no controle de infecções bacterianas, agindo como um simbiótico, através da competição dos microrganismos por alimento e espaço, estimulando um aumento na sobrevivência dos camarões cultivados (CRAB et al., 2010).

Um ingrediente bastante estudado para a produção de rações são as leveduras, elas podem atuar como suplemento nas dietas proporcionando aumento na imunidade celular de camarões e peixes, evitando riscos de infecções (HISANO et al., 2007; SHEIKHZADEH et al., 2015; SHARAWY et al., 2016). A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais estudada, e possui na composição da sua parede celular vários compostos, tais como b-glucano, ácidos nucleicos, mananoligossacarídeos e quitina (ABDEL-TAWWAB et al., 2008; SHEIKHZADEH et al., 2015). Esses compostos podem atuar como probiótico na defesa dos crustáceos, contra infecções bacterianas e também virais, através da detecção da presença do patógeno no organismo animal, aumentando a atividade da fagocitose e produção de lisozima que destroem o microrganismo invasor (THITAMADEE et al., 2014; CERENIUS et al., 2008).

As infecções bacterianas em camarões têm como principal causador o gênero *Vibrio*, que por sua vez são encontrados naturalmente nos ecossistemas aquáticos, bem como em camarões cultivados ou de vida livre (TRAN et al., 2013; TZUC et al., 2014; VANDENBERGHE et al., 1999). Doenças associadas as cepas de *Vibrio* spp., como a

síndrome de mortalidade precoce (EMS), conhecida também como "Hepatopancreatite necrosante aguda" (AHPND), tem sido a doença bacteriana que mais afeta os camarões cultivados, causando grandes perdas econômicas (CHUMPOL et al., 2017).

Estudos que utilizam tanto o biofloco, quanto a levedura na alimentação de camarões pode trazer benefícios ao cultivo de camarões, estimulando um aumento na sobrevivência e diminuindo o risco de infecções associadas a microrganismos. Além disso, a substituição parcial da farinha de peixe por farinha de bioflocos e levedura, pode implicar em melhor viabilidade econômica na produção de ração. Desta forma, foi realizada a avaliação da dieta formulada com um bioproduto (Biofloco e levedura), em substituição da farinha de peixe, durante o desafio por *Vibrio parahaemolyticus*.

2- Revisão bibliográfica

2.1 Farinha de peixe

A produção na aquicultura marinha mundial tem crescido constantemente nos últimos anos, em 2009 foram produzidos 21,4 milhões de toneladas de pescado, já em 2014 foi atingido um valor de 26,7 milhões de toneladas (FAO, 2016). No Brasil, o principal representante da aquicultura marinha é o camarão branco *Litopenaeus vannamei*. O cultivo desta espécie ocorre principalmente na região nordeste e engloba mais de 99% da produção nacional, produzindo 52,12 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2016). Para subsidiar essa atividade, existe uma alta demanda de ração, que podem chegar a aproximadamente 70% dos gastos com o cultivo (QUINTERO e ROY, 2010).

A farinha de peixe é o ingrediente de maior custo das dietas para animais aquáticos, e a farinha bruta é obtida após moagem e secagem de peixe inteiro ou partes dele (FAO, 2016). Este componente é a principal fonte de proteína utilizada na produção de rações para camarão, pois fornece aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais, e outros nutrientes, além de ser altamente digerível e palatável (SAMOCHA et al., 2004a). No entanto, as preocupações sobre os impactos negativos da produção global de sobrepesca vem sendo abordadas, pois é esperado que com a expansão da aquicultura, a procura por esse ingrediente exceda a oferta mundial de farinha de peixe até 2050 (HALWEIL, 2008). Portanto, a substituição desse ingrediente em dietas para camarão tem sido uma alternativa para suprir as demandas da carcinicultura (ACHUPALLAS et al., 2016).

A substituição da farinha de peixe nas dietas é uma alternativa potencial para diminuir os custos na produção de ração. Alguns estudos avaliam os níveis desta substituição por ingredientes alternativos, como: uso de concentrado proteico de soja (BAUER, 2012; CHEN et al., 2017), hidrolisado proteico de peixe (QUINTO et al., 2017), farelo de soja extrusado (YANG et al., 2015), e resíduos de peixe e de bioflocos (DANTAS et al., 2014; VALLE et al., 2015). No entanto, podem ser encontradas algumas dificuldades em relação aos ingredientes substitutos, como a carência de fatores nutricionais, a deficiência de alguns aminoácidos essenciais (lisina e metionina) e a baixa palatabilidade, os quais podem limitar ou inviabilizar seu uso (DAVIS e ARNOLD, 2000).

2.2 O sistema de cultivo em bioflocos e seu uso como fonte de alimento

O sistema de cultivo em bioflocos ou “Biofloc Technology” (BFT) permite reduzir ou não realizar troca de água, minimizando a entrada de microrganismos potencialmente patogênicos através da água captada, e como consequência pode diminuir os riscos de surtos de doenças (AVNIMELECH, 2012). Ele é resultante das criações super-intensivas de camarões e contém uma microbiota natural que é considerada um importante ingrediente na alimentação de animais aquáticos (KUHN, 2009).

O sistema é formado por bioflocos que são agregados de algas, bactérias, protozoários e outros tipos de matéria orgânica em partículas, como fezes e restos de alimentos não consumidos. Cada biofoco é mantido unido em uma matriz solta de muco que é secretada por bactérias, ligadas por microrganismos filamentosos ou mantidas por atração eletrostática (HARGREAVES, 2013).

A formação dos agregados microbianos nos bioflocos podem servir como complemento na dieta dos organismos aquáticos, permitindo uma redução na quantidade de proteína bruta utilizada na ração (SAMOCHA et al., 2004b). A diversidade de organismos que compõe os bioflocos não é estável, como consequência seu conteúdo nutricional também poderá variar, sendo relatados pela literatura teores proteicos entre 12 e 49% (SOARES et al., 2004). Além de ser um nutriente eficaz, podem atuar no controle de infecções bacterianas, agindo como um simbiótico, aumentando a sobrevivência e inibindo a proliferação de patógenos pela exclusão competitiva por alimento e espaço (CRAB et al., 2010).

O excesso dos bioflocos deve ser removido com periodicidade, pois seu acúmulo no sistema pode prejudicar a qualidade de água, aumentando os compostos nitrogenados (AVNIMELECH, 2009) e após sua retirada normalmente ele é descartado. No entanto, esses resíduos podem fornecer um ingrediente alternativo para substituir a farinha de peixe nas dietas para animais aquáticos (BAUER et al., 2012). Segundo Dantas et al. (2014), a substituição da farinha de peixe por farinha de bioflocos, em dietas para pós-larva de *L. vannamei*, resultaram em sobrevivências superiores a 91,1%, com níveis ideais de substituição de até 30% sem comprometimento da produtividade.

2.3 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de camarões marinhos

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são fungos unicelulares e apresentam-se na forma de células alongadas ou ovaladas (PIRES, 2012). Sua parede celular é composta por glucano (1,3- β e 1,6- β glucano), quitina e mananoproteína (MORENO et al., 2008). A principal espécie do gênero, *Saccharomyces cerevisiae* íntegra ou autolisada, apresenta características importantes para a nutrição do camarão, além de conter pronutrientes com ação simbiótica para organismos aquáticos (PARDO-GAMBOA et al., 2011; GATESOUBE, 2007).

O fragmento manose das mananoproteínas, presentes na parede celular das leveduras, pode atuar no bloqueio da ligação das bactérias gram-negativas ao tecido do hospedeiro. Este mecanismo foi avaliado por Spring et al. (2000), através de teste de *in vitro* por aglutinação. Considerando que o início da infecção bacteriana é a adesão no intestino do hospedeiro, e que suas glicoproteínas (ricas em manose) são reconhecidas pelas fimbrias do patógeno, conseqüentemente a presença das leveduras pode causar um bloqueio por competição de sítios de ligação no organismo (MORAN, 2004).

O b-glucano é um constituinte das paredes das leveduras que auxilia na indução da cascata da profenoloxidase (proPO), um mecanismo bastante importante para crustáceos e outros artrópodes, pois atua na defesa contra infecções bacterianas e virais, através do reconhecimento dos lipopolissacarídeo (LPS) e b-glucano, presentes na parede celular microbiana (THITAMADEE, 2014; CERENIUS, 2008). De acordo com Chang et al. (2003), quando o camarão *Penaeus monodon* foi alimentado com dieta contendo β -1,3-glucano e desafiados com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), foi observada um aumento da defesa no sistema imunológico e incremento da taxa de sobrevivência.

Efeitos positivos na sobrevivência e melhoramento de parâmetros imunológicos dos camarões, através da adição dos β -glucanos na alimentação, já foram comprovados em estudos com *L. vannamei*, após desafios experimentais contra *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*. (JUELIANG, 2013; CHANG et al., 2011). Resultados promissores também foram observados por Biswas et al. (2012), ao utilizar extrato de levedura (*S. cerevisiae*) na alimentação do camarão *Marsupenaeus japonicus*, os autores observaram que um aumento significativo na sobrevivência pós-infecção (66,6%) contra *Vibrio nigripulchritudo* em relação ao grupo controle (8,3%).

A *S. cerevisiae* pode ter efeitos probióticos, que por sua vez, tem como definição a premissa de serem microrganismos vivos que conferem benefício à saúde do hospedeiro, melhorando o equilíbrio intestinal, produzindo substâncias químicas que inibem ou desaceleram o crescimento de possíveis patógenos ou competindo contra patógenos por recursos (VARGAS-ALBORES, 2017). Essa levedura também possui em sua composição altos teores de proteína bruta e minerais (PARDO-GAMBOA et al., 2011). Além de possuir o glutamato, nucleotídeos e peptídeos que proporcionam melhor efeito sobre a palatabilidade, desempenho e resistência de peixes (PEREIRA-DASILVA e PEZATO, 2000).

As leveduras apresentam importantes propriedades funcionais, que as tornam excelentes fontes alternativas de nutrientes para animais aquáticos (HISANO et al., 2004). Valle et al. (2018) (Artigo não publicado), em trabalho prévio avaliou a substituição da farinha de peixe pelo bioproduto utilizado no presente trabalho, e observou resultados aceitáveis nos coeficientes de digestibilidade, que foram equivalentes a ração comercial. O termo “bioproduto” ainda não tem um consenso quanto a sua definição, porém a Agriculture and Agri-Food Canada (2017), relata que podem ser classificadas como produtos desenvolvidos a partir de organismos vivos e/ou partes constituintes destes, que podem substituir ou elevar a produção de produtos de fontes não renováveis.

2.4 O gênero *Vibrio* na carcinicultura

As espécies do gênero *Vibrio* são microrganismos anaeróbios facultativos, gram-negativos, bastonetes em forma de vírgula encontrados em ecossistemas marinhos e de água doce. Habitam naturalmente o ambiente do camarão, muitas vezes como parte da

microbiota natural que habita a superfície de suas cutículas, intestino e hepatopâncreas. (BROCK & LIGHTNER, 1990).

O gênero *Vibrio* entra em destaque quando relacionado a doenças bacterianas na carcinicultura, pois são os principais causadores de enfermidades em camarões de vida livre ou cultivados (LIGHTNER, 1988; VANDENBERGHE et al., 1999). Geralmente as infecções bacterianas mais sérias encontradas nos cultivos, são causadas particularmente pelas espécies *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* (CHATTERJEE, 2012).

Doenças associadas ao *Vibrio*, como a síndrome de mortalidade precoce (EMS), conhecida também como "doença da necrose hepatopancreática aguda" (AHPND), tem sido considerada atualmente a doença de camarão mais preocupante desde sua primeira aparição na Ásia em 2009 (CHUMPOL et al., 2017). Segundo Tran et al. (2013), camarões infectados experimentalmente pela AHPND reproduziram as mesmas características da doença em questão, permitindo identificar que as cepas responsáveis pela enfermidade pertencem a espécie *V. parahaemolyticus*.

Alguns dos sinais associados a infecções causadas por *Vibrio* em camarões se apresentam de duas maneiras: localizada e sistêmica (ROQUE et al., 2001). Nas infecções localizadas estão associadas lesões orais, cuticulares e infecções entéricas, podendo levar a septicemias que causam opacidade da musculatura abdominal e expansão de cromatóforos, aumentando a mortalidade no cultivo e diminuindo a produtividade (SAULNIER et al., 2000). Na infecção sistêmica, podem ocorrer alguns sinais para camarões na fase de engorda, como: natação lenta, opacidade muscular, coloração avermelhada dos apêndices, melanização das brânquias, anorexia e apatia (MENDES et al., 2005).

2.5 Microrganismos associados ao trato gastrointestinal dos camarões

O processo de colonização do trato gastrointestinal de camarões começa no final do estágio náupliar, quando em seus primeiros movimentos o poro anal inicia seu contato com o meio externo, que ocorre antes do aparecimento da cavidade oral (SIMOES et al., 2002). A microbiota interna de animais aquáticos é determinada pelo contato com o ambiente circundante e influenciada pela ingestão alimentar, secreção hormonal, absorção de nutrientes e estrutura de proteínas e enzimas digestivas (CAHILL, 1990). Nestes indivíduos, o intestino é considerado uma via de transmissão

principal de patógenos (DE SCHRYVER et al., 2008). Por isso, a microbiota intestinal desempenha papéis importantes na saúde do hospedeiro, mantendo o equilíbrio e resiliência contra os patógenos (RUNGRASSAMEE et al., 2016).

Estudos sobre a composição da microbiota gastrointestinal de camarões são realizados para a compreensão da relação e interação da microbiota entre o hospedeiro, meio ambiente, alimentação e estágios de vida (HOSTINS et al., 2017; CORNEJO-GRANADOS et al., 2017; ZENG et al., 2017; CARDONA et al., 2016). Hostins et al. (2017), avaliaram a concentração de *Vibrio* no intestino de *L. vannamei* após adição de uma mistura probiótica comercial a água de cultivo e observaram a diminuição na abundância de *Vibrio* spp. e o aumento da concentração do probiótico no trato intestinal, comprovando a eficácia do probiótico.

O presente estudo se refere à utilização de um bioproduto (farinha de biofloco e levedura) substituto a farinha de peixe, proposto por Do Valle et al. (2018) (não publicado), de acordo com a patente de invenção depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial INPI, (BR 1020170227944) para estudos de nutrição de peixes e camarões. Espera-se que pesquisas utilizando tanto a levedura, quanto o biofloco na alimentação de camarões possam trazer benefícios ao cultivo de camarões, aumentando seu crescimento, ganho de peso, sobrevivência e diminuindo o risco de infecções associadas a microrganismos. Desta forma, este trabalho tem o objetivo de avaliar o bioproduto gerado pela patente BR 1020170227944, após o desafio por *V. parahaemolyticus* (INCQS 00081) em juvenis do camarão marinho *L. vannamei*.

3- Referências bibliográficas

- ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, M.A.; NAHLA-ISMAEL, E.M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 185-189, 2008.
- ACHUPALLAS, J.M.; ZHOU, Y.; DAVIS, D.A. Use of grain distillers dried yeast in practical diets for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 47, n. 2, p. 220-229, 2016.
- AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADA. Industrial bioproducts. 2017. Disponível em: <<http://www5.agr.gc.ca/eng/industry-markets-and-trade/canadian->

- agri-food-sector-intelligence/industrial-bioproducts/?id=1361906627801> Acesso em: 03.06.18.
- AVNIMELECH, Y. Biofloc Technology (2nd edn). World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp.48, 189. 2012.
- AVNIMELECH, Y. Biofloc technology. A practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, v. 182, 2009.
- BAUER, W.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; TESSER, M. B.; WASIELESKY JR, W.; POERSCH, L. H. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 342, p. 112-116, 2012.
- BISWAS, G.; KORENAGA, H.; NAGAMINE, R.; KONO, T.; SHIMOKAWA, H.; ITAMI, T.; SAKAI, M. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 366, p. 40-45, 2012.
- BROCK, J. A. Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. **Diseases of marine animals**, p. 245-349, 1990.
- CAHILL, M. M. Bacterial flora of fishes: a review. **Microbial ecology**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 1990.
- CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; LORGEUX, B.; PIQUEMAL, D.; PIERRAT, F.; SAULNIER, D. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 157, 2016.
- CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.
- CHANG, C. F.; SU, M. S.; CHEN, H. Y.; LIAO, I. C. Dietary β -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish & shellfish immunology**, v. 15, n. 4, p. 297-310, 2003.
- CHANG, J.; ZHANG, W.; MAI, K.; MA, H.; LIUFU, Z.; WANG, X.; XU, W. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 8, p. 1101-1109, 2011.

- CHATTERJEE, S.; HALDAR, S. Vibrio related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. **Journal of Marine Science Research and Development S**, v. 1, 2012.
- CHEN, J.; LI, X.; XU, H.; SUN, W.; LENG, X. Substitute of soy protein concentrate for fish meal in diets of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone). **Aquaculture International**, v. 25, n. 3, p. 1303-1315, 2017.
- CHUMPOL, S.; KANTACHOTE, D.; RATTANACHUAY, P.; VUDDHAKUL, V.; NITODA, T.; KANZAKI, H. In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3182-3197, 2017.
- CORNEJO-GRANADOS, F.; LOPEZ-ZAVALA, A. A.; GALLARDO-BECERRA, L.; MENDOZA-VARGAS, A.; SÁNCHEZ, F.; VICHIDO, R.; OCHOA-LEYVA, A. Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11783, 2017.
- CRAB, R.; LAMBERT, A.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1643-1649, 2010.
- DANTAS, E. M.; VALLE, B. C. S.; BRITO, C. M. S.; CALAZANS, N. K. F.; PEIXOTO, S. R. M.; SOARES, R. B., Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture nutrition**, v. 22, n. 2, p. 335-342, 2016.
- DAVIS, D.A.; ARNOLD, C.R. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 185, n. 3-4, p. 291-298, 2000.
- DE SCHRYVER, P.; CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 125-137, 2008.
- FAO. (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

- GATESOUBE, F.J. Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. **Aquaculture**, v. 267, n. 1-4, p. 20-30, 2007.
- HALWEIL, B.; MASTNY, L. Farming fish for the future. **Worldwatch Report**, Washington, DC (USA), 176, 17–21. 2008.
- HARGREAVES, J. A. Biofloc production systems for aquaculture. 2013.
- HISANO, H.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FREIRE, E.S.; GONÇALVES, G.S.; FERRARI, J.E.C. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 171-179, 2004.
- HOSTINS, B.; LARA, G.; DECAMP, O.; CESAR, D. E.; WASIELESKY JR, W. Efficacy and variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture. **Aquaculture**, v. 480, p. 58-64, 2017.
- JUELIANG, P.; CHUCHIRD, N.; LIMSUWAN, C. The effects of probiotic, β -1, 3-glucan and organic acid on Pacific white shrimp's (*Litopenaeus vanamei*) immune system and survival upon challenge with *Vibrio harveyi*. **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 25-37, 2013.
- KUHN D. D.; BOARDMAN, G. D.; LAWRENCE, A. L; MARSH, L.; FLICK, G. J. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, n. 1-2, p. 51-57, 2009.
- LIGHTNER, D. V. *Vibrio* disease of penaeid shrimp. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture, 1988.
- MENDES, E. S.; MENDES, P. P.; GOES, L. M. N. B.; BEZERRA, S. S.; VIEIRA, K. P. B. A. Os víbrios na carcinicultura. **Panor Aquic**, p. 26-29, 2005.
- MORAN, C. A. Functional components of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*: applications for yeast glucan and mannan. In: **ALLTECH'S 20th ANNUAL SYMPOSIUM**. 2004. p. 283-296.
- MORENO, I.; TUTRONE, N.; SENTANDREU, R.; VALENTÍN, E. *Saccharomyces cerevisiae* Rds2 transcription factor involvement in cell wall composition and architecture. **International Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 57, 2008.
- PARDO-GAMBOA, B. S.; QUINTERO-PINTO, L. G.; PEZZATO, L. E.; SILVA, F. A.; QUINTERO-PARDO, A. M. C. Nutrientes digestíveis da Levedura

- (*Saccharomyces cerevisiae*) Íntegra e Autolisada para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **vet. zootec**, v. 5, n. 1, p. 26-38, 2011.
- PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; PEZZATO, L. E. Respostas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à atratividade e palatabilidade de ingredientes utilizados na alimentação de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1273-1280, 2000.
- PIRES, L. C. B. Utilização de leveduras na alimentação de ruminantes. Cadernos de Pós-Graduação da FAZU, v. 2, 2012.
- QUINTERO, H. E.; ROY, L. A. Feed selection. **The shrimp book**, p. 443-454, 2010.
- QUINTO, B. P. T.; ALBUQUERQUE, J. V.; BEZERRA, R. S.; PEIXOTO, S.; SOARES, R. Replacement of fishmeal by two types of fish protein hydrolysate in feed for postlarval shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 768-776, 2018.
- ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJIA, C.; GOMEZ-GIL, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 5, p. 383-387, 2001.
- RUNGRASSAMEE, W.; KLANCHUI, A.; MAIBUNKAEW, S.; KAROONUTHAISIRI, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of invertebrate pathology**, v. 133, p. 12-19, 2016.
- SAMOCHA, T.M.; DAVIS, D.A.; SAOUD, I. P.; DEBAULT, K. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 231, n. 1-4, p. 197-203, 2004a.
- SAMOCHA, T.M.; AL LAWRENCE, CA COLLINS, FL CASTILLE, WA BRAY, CJ DAVIES, PG LEE & GF WOOD. Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 15, n. 3-4, p. 1-19, 2004b.
- SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 133-144, 2000.
- SHARAWY, Z.; GODA, A. M. S.; HASSAAN, M. S. Partial or total replacement of fish meal by solid state fermented soybean meal with *Saccharomyces cerevisiae* in

- diets for Indian prawn shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, Postlarvae. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 90-99, 2016.
- SHEIKHZADEH, N.; MAKHLOUGHI, A. R.; NOFOUZI, K.; TUKMECHI, A. Influence of diets enriched with two different *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth performance, innate immune system and disease resistance in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 8, p. 2691-2695, 2016.
- SIMÕES, N.; JONES, D.; SOTO-RODRÍGUEZ, S.; ROQUE, A.; GÓMEZ-GIL, B. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones peneidos: efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. **Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Cancún, Quintana Roo, Mexico**, 2002.
- SOARES, R.; JACKSON, C.; COMAN, F.; PRESTON, N. Nutritional composition of flocculated material in experimental zero-exchange system for *Penaeus monodon*. **Proceedings of Australian Aquaculture**, p. 89, 2004.
- SPRING, P.; C. WENK, K. A. DAWSON, AND K. E. NEWMAN. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry science**, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.
- TACON, A.G.J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, n. 1-4, p. 146-158, 2008.
- THITAMADEE, S.; SRISALA, J.; TAENGCHAIYAPHUM, S.; SRITUNYALUCKSANA, K. Double-dose β -glucan treatment in WSSV-challenged shrimp reduces viral replication but causes mortality possibly due to excessive Ros production. **Fish & shellfish immunology**, v. 40, n. 2, p. 478-484, 2014.
- TRAN, L.; NUNAN, L.; REDMAN, R. M.; MOHNEY, L. L.; PANTOJA, C. R.; FITZSIMMONS, K.; LIGHTNER, D. V. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of aquatic organisms**, v. 105, n. 1, p. 45-55, 2013.
- TZUC, J. T.; ESCALANTE, D. R.; HERRERA, R. R.; CORTÉS, G. G.; ORTIZ, M. L. A. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of

- Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 280, 2014.
- VALLE, B.C.S.F.; BRITO, M.S.B.; NERY, R.M.C.; COSTA, C.B.; BARBOSA, K.; SILVA, J.F.; PEIXOTO, S.R.M.; SOARES, R.B. Digestibilidade aparente de rações produzidas com um bioproduto composto por biofloc e levedura para juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. 2018, a ser publicado em **Aquaculture nutrition**.
- VALLE, B. C. S.; DANTAS, E. M.; SILVA, J. F. X.; BEZERRA, R. S.; CORREIA, E. S.; PEIXOTO, S. R. M.; SOARES, R. B. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 105-112, 2015.
- VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-ARZARENA, R.; RIVERA, G.; BOLLAND, A.; BALLADARES, M.; SWINGS, J. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2592-2597, 1999.
- VARGAS-ALBORES, F.; PORCHAS-CORNEJO, M. A.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; VILLALPANDO-CANCHOLA, E.; GOLLAS-GALVÁN, T.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. **Helgoland Marine Research**, V. 71, n. 1, p. 5, 2017.
- YANG, Q.; TAN, B.; DONG, X.; CHI, S.; LIU, H. Effect of replacing fish meal with extruded soybean meal on growth, feed utilization and apparent nutrient digestibility of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Ocean University of China**, v. 14, n. 5, p. 865-872, 2015.
- ZENG, S.; HUANG, Z.; HOU, D.; LIU, J.; WENG, S.; HE, J. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. **PeerJ**, v. 5, p. e3986, 2017.

4 Objetivo geral

Avaliar a eficiência do bioproduto contendo farinha de bioflocos e levedura (*S. cerevisiae*) na substituição da farinha de peixe em ração para o camarão *L. vannamei*, e seus efeitos contra o patógeno *V. parahaemolyticus*.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração de *Vibrio* spp. e levedura no trato gastrointestinal e no conteúdo fecal de camarões juvenis;
- Determinar a substituição ideal da farinha de peixe na dieta, relacionada à diminuição de *Vibrio* spp. no trato gastrointestinal do camarão.

Capítulo I

Avaliação de dieta experimental composta por farinha de biofloco e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) no controle de *Vibrio* spp. do trato gastrointestinal de juvenis de *Litopenaeus vannamei* após desafio por *Vibrio parahaemolyticus*.

Artigo a ser submetido à revista *Aquaculture*
(ISSN:004-8486)

Efeito do bioproduto composto por biofloco e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em juvenis de *Litopenaeus vannamei* após estresse por *Vibrio parahaemolyticus*

Abstract

The fishmeal is an economically costly ingredient for the production of aquatic animal diets. One strategy to reduce spending is to replace this ingredient. A viable alternative is the use of bioflocs produced by the BFT system and yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*), which can guarantee nutritional needs, reduce disease risk by acting as a probiotic, besides avoiding the dumping of bioflocos in the environment and minimizing ecosystem problems. The two ingredients were united to produce a bioproduct, elaborate for the substitution of fish meal. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficiency in the decrease of *Vibrio* spp. in the gastrointestinal tract of *Litopenaeus vannamei*, as from a processed ration containing biofloc flour and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in replacement of fish meal, on challenge by *Vibrio parahaemolyticus*. A 21-day assay was performed with *L. vannamei* (7.27 ± 0.14 g) for exposure to 3 experimental diets BP0, BP50 and BP100, with substitution levels by bioproduct of 0% (control), 50% (150 g kg⁻¹) and 100% (300 g kg⁻¹ of feed), respectively. Soon after the exposure period, the shrimp were submitted to the microbial challenge with duration of 48 hours, through the addition of *V. parahaemolyticus* in the feeding. The gastrointestinal tract (GIT) and feces were collected at the beginning, every 16 hours and soon after fixed in 2% paraformaldehyde. The samples were submitted to fluorescence in situ hybridization technique (FISH) to evaluate the total abundance of yeast and *Vibrio* spp. and the probes used were NON (negative), PF2 (yeast) and VIB572a (*Vibrio* spp.). The results showed that all diets, including control, decreased the concentration of *Vibrio* spp. in the TGI of the shrimp at the end of 48 hours. Indicating that the reduction of *Vibrio* spp. may have occurred naturally. Nevertheless, the evaluated bioproduct can bring benefits because it is a low cost ingredient, possess the nutritional guarantees for aquatic animals and be environmentally responsible for fish meal substitution in *L. vannamei* diets.

Key words: Shrimp, fish meal, microorganisms, bacterium and FISH technique.

1. Introdução

A farinha de peixe é um ingrediente de alto custo econômico para a produção das dietas, sendo responsável por cerca de 40 a 70% dos custos das fazendas de aquicultura (Quintero e Roy, 2010). Para diminuir os gastos na elaboração das rações, a substituição deste ingrediente pode ser uma estratégia alternativa para suprir as necessidades proteicas dos camarões, podendo-se para isso, utilizar ingredientes produzidos a partir de agregados microbianos formados no sistema de cultivo em bioflocos (BFT) (Dantas et al., 2014; Valle et al., 2015).

No sistema BFT, os bioflocos se constituem de uma comunidade bacteriana estabelecida que mantém a qualidade da água e melhora as taxas de crescimento e sobrevivência de peneídeos (McIntosh et al., 2001, Wasielesky et al., 2006, Avnimelech, 2007). Os bioflocos também podem servir como complemento na dieta de organismos aquáticos, permitindo a utilização de rações com uma menor quantidade de proteína bruta (Samocha et al., 2004). Além disso, podem auxiliar no controle de infecções bacterianas, agindo como um simbiótico, e quando associado a probióticos comerciais inoculados a água, seu efeito sinérgico pode contribuir para a homeostase microbiana nos hospedeiros (Crab et al., 2010; Aguilera-Rivera et al, 2014).

Assim como os bioflocos, as leveduras também apresentam importantes propriedades funcionais, que as tornam excelentes fontes alternativas de nutrientes para animais aquáticos (Hisano et al., 2004). As leveduras possuem na composição de sua parede celular vários compostos, tais como β -glucano, ácidos nucleicos, mananoligossacarídeos e quitina (Abdel-Tawwab et al., 2008; Sheikhzadeh et al., 2015). Esses compostos podem atuar como simbióticos na defesa dos crustáceos, contra infecções bacterianas e também virais, através da detecção da presença do patógeno no

25 organismo animal, aumentando a atividade da fagocitose e produção de lisozima que
26 destroem o microrganismo invasor (Thitamadee et al., 2014; Cerenius et al., 2008).

27 As infecções bacterianas em camarões têm como principal agente causador o
28 gênero *Vibrio*, que por sua vez são encontrados naturalmente nos ecossistemas
29 aquáticos, bem como em camarões cultivados ou de vida livre (Vandenberghe et al.,
30 1999; Hai, 2015). Doenças associadas a esse gênero, como a Síndrome da Mortalidade
31 Precoce (EMS), conhecida também como "hepatopancreatite necrosante aguda"
32 (AHPND), foi a doença bacteriana em camarão que causou as maiores perdas
33 econômicas desde 2009, em todo o sudeste asiático (Chumpol et al., 2016).

34 Testes de desafio microbiano e análises histológicas do trato gastrointestinal de
35 camarões doentes identificaram o *Vibrio parahaemolyticus* portador de plasmídeo que
36 possui os genes PirA e PirB, que codificam as toxinas responsáveis pela doença
37 AHPND (Tran et al., 2013). Esta associação do *Vibrio* causador da EMS com alterações
38 histológicas no trato gastrointestinal, indicam que a principal via de infecção é o trato
39 gastrointestinal dos camarões, e isto pode ocorrer devido a exposição do intestino ao
40 meio ambiente, que representa uma importante porta de entrada de patógenos, os quais
41 podem colonizar e evoluir para uma enfermidade (Soonthornchai et al., 2015).

42 Para a diminuição dos surtos de infecções, estudos que utilizam as leveduras
43 (Sajeevan et al., 2009) e farinha de bioflocos (Dantas et al., 2014; Valle et al., 2015)
44 adicionadas à dieta de camarões mostram que o uso destes ingredientes pode trazer
45 benefícios imunológicos e no desempenho zootécnico dos camarões. Valle et al. (2018)
46 (Artigo não publicado), em trabalho prévio avaliou o efeito do bioproduto composto por
47 farinha de bioflocos e levedura utilizado no presente trabalho, e observou resultados
48 aceitáveis nos coeficientes de digestibilidade do *L. vannamei*, porém o mesmo não foi
49 testado em relação a diminuição de patógenos no trato gastrointestinal de camarões.

50 Contudo, neste trabalho foi avaliado o bioproduto proposto pela patente de invenção
51 depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial INPI, (BR 1020170227944)
52 na diminuição do *Vibrio* spp. no trato gastrointestinal dos camarões, através de desafio
53 por *V. parahaemolyticus*.

54 2. Material e métodos

55 2.1 Bioproduto composto de farinha de bioflocos e levedura

56 As cepas da levedura *S. cerevisiae* (ATCC 9763) foram cedidas pela Fundação
57 Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Após ativação em caldo Yeast Peptone Dextrose -YPD (1%
58 de extrato de levedura, 1% de peptona e 2% de dextrose), as leveduras foram submetidas
59 ao processo de liofilização (Alpha 2-4 LSC, Christ).

60 Os bioflocos foram coletados quando atingido um volume de 20 mL/L em
61 tanques de cultivo de *L. vannamei* produzidos no sistema BFT em fazenda de produção
62 comercial no litoral sul de Pernambuco, Brasil. O processamento para produção da
63 farinha de biofloco foi realizado após decantação dos mesmos, com posterior filtragem
64 em malhas com diferentes porosidades (250, 50 e 10 μ m) e secos em estufa de
65 recirculação de ar forçado a 50°C, de acordo com Valle et al. (2015). A composição
66 nutricional do bioproduto e da farinha de peixe utilizados na produção das rações
67 experimentais estão mostrados na Tabela 1.

68 Tabela 1. Análise proximal, aminoácidos e ácidos graxos dos principais ingredientes (g
69 kg⁻¹)

<i>Aminoácidos essenciais</i>	Tratamentos		
	BP0	BP50	BP100
Arginina	25,9	24,1	22,3
Fenilalanina	14,8	14,7	15,4
Histidina	10,5	10,4	9,2
Isoleucina	16,3	14,3	14,4
Leucina	27,7	25,7	24,6
Lisina	27,2	24,6	20,2

Metionina	8,9	7,1	5,3
Treonina	15,8	15,2	13,9
Valina	18,4	16,8	16
<i>Aminoácidos não essenciais</i>			
Ácido aspártico	36,6	31,8	19,4
Ácido glutâmico	57,9	53,2	41,7
Alanina	24,3	22,8	22,3
Cistina	5,3	4,6	4,3
Glicina	36,1	32,2	28,6
Prolina	24,8	22,7	21,2
Serina	19	18	15,8
Tirosina	12,7	11,5	10,9
<i>Ácidos graxos</i>			
Gorduras saturadas	14,4	12,3	15,4
Gorduras insaturadas	66,7	48,1	46,3
Gord.monoinsaturadas	20,8	15,8	17,6
Gorduras polinsaturadas	45,9	32,3	28,7
Ácido linoleico (18:2n-6)	22,8	18,4	20,6
Ácido linolênico (18:3n-3)	4,9	3,2	2,3
ARA (20:4n-6)	1,4	1,2	1,4
EPA (20:5n-3)	5,2	3	1,3
DHA (22:6n-3)	9,6	5,4	2,3

70 2.2 Dietas formuladas com bioproduto em substituição a farinha de peixe.

71 As rações foram elaboradas para serem isoproteicas e isocalóricas apresentando
72 em sua composição 35% de proteína bruta de acordo com o recomendado para *L.*
73 *vannamei* (Smith et al., 1985; Li et al., 2017). Na formulação do bioproduto para cada
74 50g da farinha do biofloco foram acrescentados 5g de levedura liofilizada (9:1). Os níveis
75 de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto na dieta experimental foram de
76 acordo com as seguintes porcentagens: 0%, 50% (150 g kg⁻¹) e 100% (300 g kg⁻¹ de
77 ração). A partir desses níveis de substituição foram elaboradas 3 dietas padrão BP0, BP50

78 e BP100, respectivamente. Estas dietas padrão foram ofertadas durante todo o
 79 experimento, no entanto, para as parcelas experimentais que foram desafiadas foi
 80 adicionada o patógeno *V. parahaemolyticus* (VP). As rações experimentais e suas
 81 respectivas composições proximais estão descritas na tabela 2.

82 Tabela 2. Composição de aminoácidos e ácidos graxos (g/Kg) das rações experimentais
 83 para *L. vannamei* contendo o bioproduto de biofloco e levedura em substituição a farinha
 84 de peixe.

INGREDIENTES (%)	Tratamentos		
	BP0	BP50	BP100
Farinha de peixe	400	200	0
Bioproduto	0	200	400
Farinha de vísceras	70	100	150
Farinha de camarão	40	50	60
Farelo de soja	90	170	215
Farelo de trigo	120	110	60
Farinha de trigo	200	100	60
Goma de mandioca	50	30	0
Gelatina	10	20	35
Óleo de peixe	10	10	10
Mix de vit. e minerais	10	10	10
Análise proximal			
Proteína bruta	412,7	403,4	395,8
Extrato etéreo	81,1	60,4	61,7
Cinzas	81,6	136,7	190,1
Umidade	63,3	98	77,7
Carboidratos totais	424,6	399,5	464,8
Energia bruta (MJ/Kg)	14,78	16,42	15,61

85

86 2.3 Ativação da cepa de *Vibrio parahaemolyticus* para adição na dieta

87 As cepas de VP (INCQS 00081) foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz –
88 FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Após reativação em meio líquido Tryptic Soy Broth
89 (TSB - 1% NaCl) a cultura foi submetida a leitura em espectrofotômetro de curva de
90 absorvância de 630 nm de acordo com escala de Mcfarland (1974) e ajustada para uma
91 concentração correspondente a 10^7 UFC/mL. Em seguida, as dietas foram pulverizadas
92 com a cultura microbiológica, com o auxílio de recipiente spray estéril. Logo após, foram
93 incubados a 35 °C/24h e armazenadas em geladeira (4 °C), seguindo o método adaptado
94 por Del’Duca et al. (2013) para gênero *Bacillus* e obtendo as concentrações finais
95 representadas na tabela 3.

96 Tabela 3. Abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. em dietas
97 experimentais para camarões (10^8 células/g⁻¹), com e sem adição de *Vibrio*
98 *parahaemolyticus*. Representando rações contendo diferentes níveis de inclusão de
99 bioproduto (BP).

Ração	Total	Levedura	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.
	(10^8 células/g ⁻¹)			
BP0	10,08	0,47	1,22	0,06
BP50	2,20	2,62	0,12	0,00
BP100	4,19	5,87	0,35	0,00

100 ** BP0, BP50 e BP100 representam a porcentagem (0, 50 e 100%, respectivamente) do bioproduto em
101 substituição à farinha de peixe nas dietas

102 2.4 Delineamento experimental.

103 O tempo de exposição dos camarões às dietas padrão foi de 21 dias, e composto
104 por três grupos com três repetições cada, totalizando nove parcelas experimentais. Os
105 indivíduos foram mantidos em tanques de fibra de vidro com volume útil de 300 litros
106 de água marinha 30 g/L, interligados por um sistema de recirculação de água contendo
107 filtro biológico, mecânico e aeração constante. Foram transferidos para estas parcelas 35

108 animais na fase juvenil com peso médio de $7,27 \pm 0,14$ g. Os tratamentos testados foram:
109 BP0 = 0% (tratamento controle - sem bioproduto), BP50 e BP100, sendo 50% e 100%
110 de substituição pelo bioproduto, respectivamente.

111 Os indivíduos foram alimentados com a dieta padrão considerando 8% da
112 biomassa animal, sendo ajustada semanalmente após as biometrias. A dieta foi fornecida
113 a cada 8 horas, em bandejas de alimentação, de acordo com três alimentações diárias de
114 Peixoto et al. (2018). Os parâmetros de qualidade de água (temperatura, salinidade,
115 oxigênio dissolvido e pH) foram mensurados diariamente utilizando um multiparâmetro
116 (YSI 556), sendo as concentrações de amônia e nitrito mensuradas em espectrofotômetro
117 (ALFAKIT – AT10P), de acordo com o recomendado para a espécie por Wasielesky et
118 al. (2006).

119 *2.5 Desafio através de infecção por Vibrio parahaemolyticus.*

120 Após os 21 dias de dieta experimental, os camarões foram transferidos para
121 tanques de polietileno com volume útil de 50L e estocados com peso médio de $8,01 \pm$
122 $0,23$ g. Estas unidades experimentais foram mantidas com aeração constante e renovação
123 diária de 80% da água. Os animais de cada parcela expostos à dieta padrão, foram
124 distribuídos em 18 unidades experimentais, e divididos em 16 juvenis por parcela, sendo
125 elas, réplicas dos tratamentos a seguir: BP0 CV, BP50 CV, BP100 CV, BP0 SV, BP50
126 SV e BP100 SV, logo BP0, BP50 e BP100 se refere ao nível de substituição pelo
127 bioproduto e as representações CV e SV fazem referência as unidades com e sem *Vibrio*.

128 Os indivíduos foram alimentados com 5% da biomassa total dos camarões e a
129 dieta foi ofertada a cada oito horas (6, 14 e 22 horas), com duração total de 48 horas. Para
130 o início do desafio, os camarões das unidades experimentais que foram desafiados
131 receberam a dieta com adição de VP durante três alimentações, em seguida esses animais
132 voltaram a receber a dieta padrão (Figura 1). As parcelas que não foram submetidas a

133 infecção, receberam a alimentação padrão sem alterações, de acordo com seus
134 tratamentos.

135 2.6 Coletas de amostras para análise de FISH

136 Dois camarões de cada tanque foram coletados aleatoriamente duas horas depois
137 de cada alimentação, e tiveram seus tratos gastrointestinais (TGI) removidos
138 assepticamente. Os indivíduos foram coletados durante os tempos T0, T1, T16, T32 e
139 T48, que estão relacionados aos tempos: antes, início, 16, 32 e 48 horas de infecção
140 (Figura 1).

141 As coletas do conteúdo fecal foram realizadas durante o tempo T16, T32 e T48
142 (Figura 1). A primeira amostragem do conteúdo fecal foi realizada 16 horas após o início
143 do desafio, e as coletas ocorreram duas horas após as alimentações, para o manejo foi
144 utilizado pipeta Pasteur e recipiente limpos e desinfetados. Após a coleta, todas as
145 amostras de conteúdo fecal e TGI foram pesados em balança analítica (0,0001g) e fixadas
146 em paraformaldeído 2%.

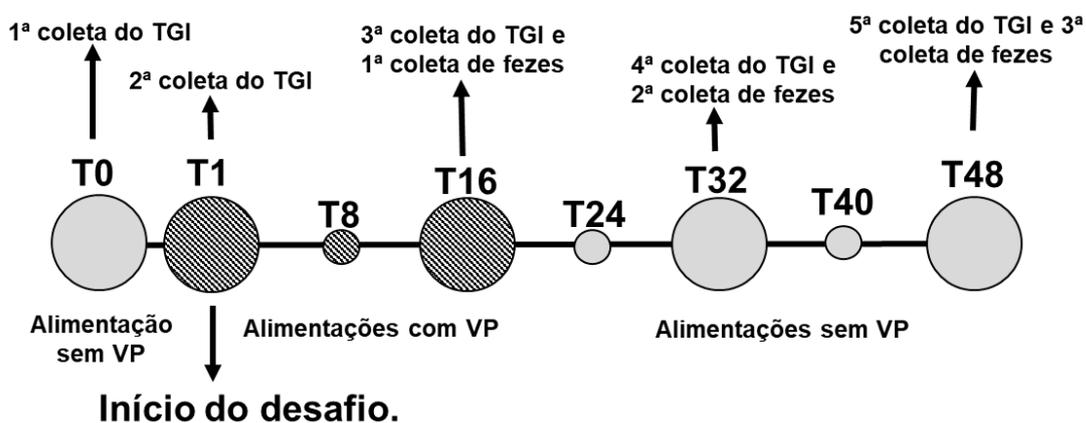


Figura 1. Alimentação e tempo de coleta das amostras do trato gastrointestinal (TGI) nos tempos T0, T1, T16, T32 e T48 e também do conteúdo fecal nos tempos T16, T32 e T48 (Círculos grandes), apenas as alimentações nos tempos T8, T24 e T40 (Círculos pequenos). Círculos escuros com padrão representam o momento da inserção de *Vibrio parahaemolyticus* (VP) na dieta.

147

148 2.7 Hibridização Fluorescente in situ (FISH)

149 2.7.1 Processamento e montagem das lâminas

150 Os tratos gastrointestinais (TGI) e o conteúdo fecal foram maceradas e
151 acrescentadas 5 mL de água destilada ultrapura em cada amostra, as quais foram
152 ultrassonicadas três vezes com duração e intervalos de 60 segundos cada (variação de
153 110,7 μm), utilizando processador ultrassônico (Vibra Cell VCX 130PB, Sonics &
154 Materials®, USA). Logo após, as amostras foram centrifugadas a 500G durante cinco
155 minutos e o sobrenadante foi coletado e o conteúdo remanescente lavado duas vezes
156 com 5 mL de água ultrapura para obtenção dos microrganismos remanescentes do fundo
157 do decantado. Em seguida, as três frações dos sobrenadantes foram misturadas, agitadas
158 vigorosamente e armazenadas em tubos de 5 mL.

159 Os sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1/10, em seguida uma alíquota
160 (30 μL) de cada amostra foi colocada sobre a superfície de uma lâmina de vidro para
161 microscopia contendo áreas circulares delimitadas por tinta hidrofóbica e o conteúdo foi
162 seco e fixado em estufa de secagem a 15min/48 °C.

163 2.7.2 Sondas de oligonucleotídios de RNAr.

164 As sondas utilizadas para as amostras de trato gastrointestinal e conteúdo fecal
165 foram: NON (Controle) sonda não específica, para avaliar a eficiência da hibridização;
166 PF2, que tem como alvo uma região do RNAr 18S de microrganismos pertencentes ao
167 Subfilo Saccharomycotina e VIB519a, complementar a região 16S do RNAr e específica
168 para o gênero *Vibrio*. As sondas foram marcadas na extremidade 5' com o fluorocromo
169 Cy3 (Alpha DNA, Montreal, Canadá), e para uma concentração final de 2,5 ng μL^{-1} em
170 solução de hibridização (Tabela 4).

171 Tabela 4. Sondas oligonucleotídicas de RNAr marcadas, controle negativo (NON),
172 levedura (PF2) e *Vibrio* spp. (VIB572a). Todas as sondas foram marcadas com
173 fluorocromo CY3.

Sonda	Especificidade	Sequência 5'-3'	%FA*	Referência
-------	----------------	-----------------	------	------------

NON	Controle negativo	TAGTGACGCCGTCGA	30	Yokokawa e Nagata, 2005
PF2	Levedura	CTCTGGCTTCACCCTATT	30	Kempf et al., 2000
Vib572a	<i>Vibrio</i> spp.	ACCACCTGCATGCGCTT	40	Huggett et al., 2008

174 * Porcentagem de formamida (FA) em tampão de hibridização *in situ*.

175 2.7.3 Condições de hibridização.

176 A hibridização foi realizada segundo o protocolo FISH (Cottrell e Kirchman,
177 2003) com modificações. As amostras que estavam dispostas sobre a lâmina receberam
178 18 µL da solução de hibridização (0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 5 mM
179 EDTA, 0,01% SDS e formamida) com 2 µL da sonda (25 ng µL⁻¹), perfazendo assim
180 uma concentração final da sonda de 2,5 ng µL⁻¹. Em seguida, as lâminas foram
181 incubadas em câmara de hibridização com a solução de hibridização e concentração de
182 formamida específica para cada grupo de microrganismos a 42 °C/24h.

183 Após a hibridização, as lâminas foram retiradas da câmara de hibridização e
184 seguiram para estufa de secagem a 48 °C/1hora, logo após a secagem foi adicionada a
185 solução de lavagem (NaCl de acordo com a sonda, 20 mM de Tris-HCl (ph 7.2), 10 mM
186 de EDTA, 0,01% SDS e formamida) e as lâminas seguiram novamente para a secagem
187 em estufa a 48 °C/15 min. Em seguida, foram coradas com 2 µL de solução DAPI (4',6'-
188 diamino-2-fenil-indol), secas a 48 °C/15min, adicionados glicerol + Phosphate Buffered
189 Saline (PBS) (7:4) e lamínula, para auxiliar na visualização ao microscópio.

190 2.7.4 Observação microscópica.

191 A visualização das imagens foi realizada em microscópio de epifluorescência
192 BX60 (Olympus, Japan) equipado com filtro para visualização do DAPI (U-2 A) e do
193 fluorocromo CY3 (C-FL CY3 HYQ). O microscópio utilizado foi equipado com câmera
194 digital para captura das imagens, que foi realizada em três campos aleatórios com

195 aumento de 1000×. A contagem dos microrganismos foi realizada com o auxílio do
196 software Image Tool 3.0.

197 2.8 Análise estatística.

198 Os números de microrganismos total, *Vibrio* spp. e levedura presentes no trato
199 digestivo e conteúdo fecal, foram submetidos uma análise de variância (ANOVA - one
200 way). Após serem analisadas as premissas através do teste Kolmogorov-Smirnov e de
201 Bartlett, foi aplicado testes não-paramétricos para análise das medianas de acordo com
202 os testes de Fisher. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

203

204 3. Resultados

205 Ao final dos 21 dias de experimento não foram observadas diferenças
206 significativas na sobrevivência dos camarões, que apresentou um valor médio de (\pm DP)
207 de $97,14 \pm 1,94\%$ para os tratamentos. Durante o período de desafio microbiano não
208 houve mortalidade dos camarões.

209 A abundância microbiana total no trato gastrointestinal (TGI) de *L. vannamei* que
210 foram desafiados durante as 48 horas, variou de um número mínimo de $7,29 \times 10^8$
211 células/g⁻¹ a um número máximo de $102,37 \times 10^8$ células/g⁻¹. Foi observado para todos
212 os tratamentos uma diminuição do número de microrganismos ao longo do tempo
213 (Tabela 5).

214 O número de levedura no TGI do *L. vannamei* desafiados com VP, mostrou que
215 ao longo do tempo, todos os tratamentos possuem valores superiores no tempo T0. Bem
216 como, foi observado um valor significativamente superior de leveduras no tratamento
217 BP100 CV nos tempos T1 e T48 (Tabela 5).

218 As médias da concentração de *Vibrio* spp. no TGI dos camarões desafiados,
219 mostraram uma diminuição da concentração ao longo do tempo para todas as dietas.

220 Porém, nos tempos T0, T16 e T32 foi observado valores significativamente superiores
221 de *Vibrio* spp. para o tratamento BP100 CV em relação as demais dietas. O tratamento
222 BP50 CV mostrou valores inferiores relacionados as outras dietas no tempo T48 (Tabela
223 5).

224 A abundância microbiana total no TGI dos camarões que não receberam a dieta
225 contendo VP, variou de um número mínimo de $1,48 \times 10^8$ células/g⁻¹ a um número
226 máximo de $73,33 \times 10^8$ células/g⁻¹. Foi observada uma diminuição na concentração de
227 microrganismos para todos os tratamentos (Tabela 6).

228 Foi observado nos tratamentos não desafiados BP50 SV e BP100 SV, ao longo
229 do tempo, uma diminuição no número de leveduras encontradas no TGI dos camarões
230 que não foram infectados. Entre os tratamentos nos tempos T16 e T48 os valores da
231 levedura no TGI foram significativamente superiores na dieta BP0 SV, diferentemente
232 do tempo T32 que mostrou valor significativamente superior para a dieta BP100 SV
233 (Tabela 6).

234 O número de *Vibrio* spp. no TGI dos *L. vannamei* que não foram infectados,
235 mostrou que ao longo do tempo, os valores de todos os tratamentos foram
236 significativamente superiores no tempo T0. Entre os tratamentos, foi observado que a
237 dieta BP100 SV nos tempos T0, T32 e T48 mostrou valores significativamente
238 superiores de *Vibrio* spp. em relação aos demais tratamentos (Tabela 6).

239

240 Tabela 5. Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no trato digestório de *L. vannamei*, alimentados a cada
 241 16 horas (10^8 cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, após desafio
 242 microbiano por *Vibrio parahaemolyticus* nos tempos T1 a T16.
 243

Dietas	Antes da adição de <i>Vibrio</i>	Durante a adição de <i>Vibrio</i>		Depois da adição de <i>Vibrio</i>	
Total	T0	T1	T16	T32	T48
BP0 CV	58,18 ± 21,42 ^{Aab}	66,31 ± 18,70 ^{Aa}	34,79 ± 1,73 ^{Ab}	7,29 ± 4,27 ^{Ac}	15,77 ± 3,48 ^{ABbc}
BP50 CV	43,90 ± 33,04 ^{Aab}	102,87 ± 97,32 ^{Aa}	15,19 ± 3,53 ^{Bab}	10,24 ± 0,54 ^{Ab}	11,98 ± 3,40 ^{Bb}
BP100 CV	48,85 ± 18,21 ^{Aa}	34,66 ± 11,72 ^{Aab}	17,19 ± 0,18 ^{Bbc}	8,76 ± 2,83 ^{Ac}	22,48 ± 5,61 ^{Ab}
Levedura	T0	T1	T16	T32	T48
BP0 CV	2,01 ± 1,05 ^{Aa}	0,17 ± 0,09 ^{Bb}	0,42 ± 0,38 ^{Ab}	0,22 ± 0,12 ^{Ab}	0,42 ± 0,22 ^{Bb}
BP50 CV	5,56 ± 4,34 ^{Aa}	0,29 ± 11 ^{Bb}	0,43 ± 0,25 ^{Ab}	0,47 ± 0,07 ^{Ab}	0,24 ± 0,17 ^{Bb}
BP100 CV	4,32 ± 0,41 ^{Aa}	1,15 ± 0,40 ^{Ab}	1,51 ± 0,88 ^{Ab}	0,45 ± 0,20 ^{Ab}	1,17 ± 0,16 ^{Ab}
Víbrio	T0	T1	T16	T32	T48
BP0 CV	1,97 ± 0,48 ^{Aab}	3,21 ± 1,38 ^{Aa}	1,57 ± 0,76 ^{Bb}	0,00 ^{Bc}	0,10 ± 0,02 ^{Ac}
BP50 CV	4,47 ± 0,81 ^{Ba}	1,36 ± 0,83 ^{ABb}	1,21 ± 0,22 ^{Bb}	0,31 ± 0,16 ^{Bc}	0,00 ^{Bd}
BP100 CV	6,37 ± 0,34 ^{Ca}	0,68 ± 0,45 ^{Bcd}	4,14 ± 1,39 ^{Ab}	1,85 ± 1,04 ^{Ac}	0,12 ± 0,05 ^{Ad}

244 * Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre as dietas no mesmo tempo para abundância total, de levedura e *Vibrio* spp.,
 245 enquanto que letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para uma mesma dieta ao longo do tempo (P<0,05).
 246 ** BP0, BP50 e BP100 representam a porcentagem (0, 50 e 100%, respectivamente) do bioproduto em substituição à farinha de peixe nas dietas.
 247 *** CV representa as parcelas com adição de *Vibrio*.

248 Tabela 6. Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no trato digestório de *L. vannamei*, alimentados a cada
 249 16 horas (10^8 cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, sem o desafio
 250 por *Vibrio parahaemolyticus*.
 251

Dietas	Sem desafio por <i>Vibrio</i>				
Total	T0	T1	T16	T32	T48
BP0 SV	58,18 ± 21,42 ^{Aa}	12,56 ± 3,60 ^{Abc}	35,05 ± 1,06 ^{Bab}	17,59 ± 0,66 ^{Ab}	4,06 ± 3,64 ^{Abc}
BP50 SV	43,90 ± 33,04 ^{Aab}	19,88 ± 7,72 ^{Abc}	63,94 ± 5,93 ^{Aa}	21,73 ± 10,65 ^{Ab}	4,66 ± 1,12 ^{Ac}
BP100 SV	48,85 ± 18,21 ^{Aa}	22,20 ± 18,36 ^{Aab}	23,72 ± 2,39 ^{Bab}	21,22 ± 9,21 ^{Ab}	8,99 ± 2,44 ^{Ab}
Levedura	T0	T1	T16	T32	T48
BP0 SV	2,01 ± 1,05 ^{Aab}	1,53 ± 0,71 ^{Ab}	4,21 ± 1,32 ^{Aa}	0,04 ± 0,00 ^{Bb}	2,40 ± 1,91 ^{Aab}
BP50 SV	5,56 ± 4,34 ^{Aa}	1,09 ± 0,70 ^{Ab}	1,52 ± 0,80 ^{Bb}	0,00 ^{Cb}	0,00 ^{Bb}
BP100 SV	4,32 ± 0,41 ^{Aa}	0,28 ± 0,08 ^{Ac}	1,68 ± 0,88 ^{Bb}	0,45 ± 0,02 ^{Ac}	0,00 ^{Bc}
Víbrio	T0	T1	T16	T32	T48
BP0 SV	1,97 ± 0,48 ^{Ca}	0,43 ± 0,27 ^{Ab}	0,27 ± 0,04 ^{Ab}	0,43 ± 0,00 ^{Bb}	0,46 ± 0,12 ^{Bb}
BP50 SV	4,47 ± 0,81 ^{Ba}	0,53 ± 0,20 ^{Ab}	0,11 ± 0,03 ^{Ab}	0,18 ± 0,09 ^{Bb}	0,60 ± 0,05 ^{Bb}
BP100 SV	6,37 ± 0,34 ^{Aa}	0,50 ± 0,25 ^{Ac}	0,26 ± 0,00 ^{Ac}	2,22 ± 0,25 ^{Ab}	1,03 ± 0,27 ^{Ac}

252 * Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre as dietas no mesmo tempo para abundância total, de levedura e *Vibrio* spp.,
 253 enquanto que letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para uma mesma dieta ao longo do tempo (P<0,05).

254 ** BP0, BP50 e BP100 representam a porcentagem (0, 50 e 100%, respectivamente) do bioproduto em substituição à farinha de peixe nas dietas.

255 *** SV representa as parcelas sem adição de *Vibrio*

256 A abundância microbiana total no conteúdo fecal do *L. vannamei* desafiados por
257 VP, variou de um número mínimo de $151,61 \times 10^8$ células/g⁻¹ a um número máximo de
258 $2696,67 \times 10^8$ células/g⁻¹. O tratamento BP50 CV não diferiu estatisticamente ao longo
259 do tempo e o BP0 CV e BP100 CV mostraram uma diminuição no tempo T48 (Tabela
260 7).

261 Foi observado uma diminuição do número de leveduras no conteúdo fecal do *L.*
262 *vannamei* ao longo do tempo para os tratamentos BP0 CV e BP100 CV. O BP50 CV
263 não diferiu estatisticamente (Tabela 7).

264 Os valores estimados de *Vibrio* spp. nas fezes dos camarões submetidos a
265 infecção por VP, não diferiram estatisticamente ao longo do tempo para as diferentes
266 dietas experimentais, exceto para o tratamento BP50 CV, que mostrou valor
267 significativamente inferior no tempo T48. No entanto, entre os tratamentos, não foram
268 observadas diferenças significativas nos diferentes tempos (Tabela 7).

269 A abundância microbiana total no conteúdo fecal do *L. vannamei* que não foi
270 infectado por VP, variou de um número mínimo de $113,66 \times 10^8$ células/g⁻¹ a um
271 número máximo de $3575,56 \times 10^8$ células/g⁻¹. Foi observado uma diminuição do número
272 de microrganismos total, ao longo do tempo, para o tratamento BP50 CV. Os BP0 CV e
273 BP100 CV não mostraram diferenças estatísticas (Tabela 8).

274 O número de leveduras presentes nas fezes do camarão não diferiu
275 estatisticamente nos tratamentos, exceto para BP0 SV no tempo T48, que mostrou valor
276 significativamente inferior (Tabela 8).

277 Os valores estimados de *Vibrio* spp. no conteúdo fecal do *L. vannamei* não
278 diferiram estatisticamente ao longo do tempo para o tratamento BP0 SV, porém os
279 BP50 SV e BP100 SV mostraram uma diminuição significativa no tempo T48 (Tabela
280 8).

281 Tabela 7. Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no conteúdo fecal de *L. vannamei*, alimentados a cada 16
 282 horas (10^8 cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, com indução de
 283 desafio microbiano por *Vibrio parahaemolyticus* nos tempos T1 a T16.

Dietas	Durante a adição de <i>Vibrio</i>		Depois da adição de <i>Vibrio</i>	
Total	T1	T16	T32	T48
BP0 CV	NC	530,20 ± 337,16 ^{Aa}	2696,67 ± 2390,02 ^{Aab}	151,61 ± 39,94 ^{Bb}
BP50 CV	NC	951,09 ± 755,78 ^{Aa}	1600,56 ± 565,71 ^{Aa}	253,23 ± 56,04 ^{Aa}
BP100 CV	NC	364,26 ± 250,41 ^{Aab}	1158,33 ± 747,68 ^{Aa}	178,24 ± 20,75 ^{ABb}
Levedura	T1	T16	T32	T48
BP0 CV	NC	163,02 ± 67,95 ^{Aa}	120,66 ± 100,82 ^{Aab}	30,83 ± 22,93 ^{Ab}
BP50 CV	NC	120,66 ± 100,82 ^{Aa}	435,00 ± 375,13 ^{Aa}	10,99 ± 5,25 ^{Aa}
BP100 CV	NC	145,55 ± 77,88 ^{Aab}	198,33 ± 115,49 ^{Aa}	17,87 ± 4,25 ^{Ab}
Víbrio	T1	T16	T32	T48
BP0 CV	NC	373,33 ± 246,94 ^{Aa}	144,77 ± 25,60 ^{Aa}	33,67 ± 6,33 ^{Aa}
BP50 CV	NC	237018 ± 28,28 ^{Aa}	260,00 ± 28,28 ^{Aa}	23,39 ± 18,77 ^{Ab}
BP100 CV	NC	180,89 ± 89,88 ^{Aa}	204,17 ± 128,46 ^{Aa}	21,50 ± 12,03 ^{Aa}

284 * Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre as dietas no mesmo tempo para abundância total, de levedura e *Vibrio* spp.,
 285 enquanto que letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para uma mesma dieta ao longo do tempo (P<0,05).

286 ** NC = não coletado no tempo 2h.

287 *** BP0, BP50 e BP100 representam a porcentagem (0, 50 e 100%, respectivamente) do bioproduto em substituição à farinha de peixe nas dietas.

288 **** CV representa as parcelas com adição de *Vibrio*.

289 Tabela 8. Médias (+DP) da abundância de microrganismos total, levedura e *Vibrio* spp. no conteúdo fecal de *L. vannamei*, alimentados a cada 16
 290 horas (10^8 cél/g) com dietas experimentais contendo diferentes níveis de inclusão de bioproduto (BP), ao longo de 48 horas, com indução de
 291 desafio microbiano por *Vibrio parahaemolyticus* nos tempos 1h a 16h.

Dietas		Sem desafio		Sem desafio	
Total	2 h	18 h	34 h	50 h	
BP0 SV	NC	911,43 ± 144,12 ^{Ba}	3105,00 ± 2331,10 ^{Aa}	352,70 ± 256,52 ^{Aa}	
BP50 SV	NC	3575,56 ± 34,37 ^{Aa}	1473,49 ± 604,04 ^{Ab}	299,89 ± 119,18 ^{Ac}	
BP100 SV	NC	113,66 ± 29,89 ^{Ba}	560,08 ± 422,14 ^{Aa}	313,96 ± 109,55 ^{Aa}	
Levedura	2 h	18 h	34 h	50 h	
BP0 SV	NC	107,68 ± 45,70 ^{Bab}	402,22 ± 230,03 ^{Aa}	68,97 ± 39,69 ^{Ab}	
BP50 SV	NC	203,33 ± 9,43 ^{Aa}	106,96 ± 43,79 ^{Aa}	113,94 ± 46,08 ^{Aa}	
BP100 SV	NC	17,23 ± 12,00 ^{Ba}	34,36 ± 32,22 ^{Aa}	81,50 ± 37,55 ^{Aa}	
Víbrio	2 h	18 h	34 h	50 h	
BP0 SV	NC	229,83 ± 84,61 ^{Aa}	420,00 ± 367,70 ^{Aa}	49,31 ± 32,91 ^{Aa}	
BP50 SV	NC	201,67 ± 2,36 ^{ABab}	515,24 ± 268,41 ^{Aa}	33,60 ± 22,62 ^{Ab}	
BP100 SV	NC	92,08 ± 25,69 ^{Ba}	73,16 ± 0,00 ^{Aab}	18,21 ± 7,48 ^{Ab}	

292 * Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas entre as dietas no mesmo tempo para abundância total, de levedura e *Vibrio* spp.,
 293 enquanto que letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para uma mesma dieta ao longo do tempo (P<0,05).
 294 ** NC = não coletado no tempo 2h.
 295 *** BP0, BP50 e BP100 representam a porcentagem (0, 50 e 100%, respectivamente) do bioproduto em substituição à farinha de peixe nas dietas.
 296 **** SV representa as parcelas sem adição de *Vibrio*.

297 4. Discussão

298 A infecção bacteriana via oral é a melhor maneira de simular rotas naturais de
299 infecção e investigar as interações entre hospedeiro/bactéria que ocorrem no trato
300 digestivo, podendo conduzir a novas estratégias para a prevenção ou controle de
301 infecções em camarões peneídeos (Soonthornchai et al., 2015). Neste estudo, foi
302 utilizada a infecção oral como estratégia para induzir os camarões ao desafio, uma vez
303 que, o desequilíbrio da diversidade microbiana, pode resultar no aumento do número de
304 grupos microbianos funcionalmente específicos (Atlas et al., 1991; Sung et al., 2001).

305 O método de FISH, utilizado no trabalho atual possui base na biologia molecular
306 e vem sendo utilizado para detecção de diversos microrganismos em camarões, pois é
307 considerado mais preciso e confiável do que técnicas convencionais de contagem em
308 placas (Garcia e Olmos, 2007; Hostins et al., 2017).

309 A abundância de microrganismos total encontrada no TGI dos indivíduos
310 infectados ($7,29$ a $102,87 \times 10^8$ células/g⁻¹) e não infectados ($4,06$ a $63,94 \times 10^8$
311 células/g⁻¹), foram superiores aos estudos reportados por autores que avaliaram o *L.*
312 *vannamei*. Em estudos de análise em placa, valores de abundância observada no
313 intestino ($0,7$ a 6320×10^5 UFC/g⁻¹) e hepatopâncreas ($0,5$ a 870×10^5 UFC/g⁻¹) de
314 juvenis de *L. vannamei*, submetidos a uma dieta controle, uma com adição do *Bacillus*
315 *subtilis* e outra com *Shewanella algae*, evidenciaram resultados inferiores aos
316 apresentados neste estudo (Interaminense et al., 2018). Trabalhos que utilizam técnicas
317 baseadas em biologia molecular, como a FISH, podem detectar microrganismos viáveis
318 e não viáveis, no entanto a contagem em placas só determina o número de células
319 viáveis. Diante do exposto, os valores superiores do trabalho atual podem refletir na
320 detecção de células não viáveis, que não são identificadas em contagens em placas.

321 Hostins et al. (2017), determinou que a abundância microbiana em pós-larvas
322 cultivadas em água clara e alimentados por 45 dias com dieta comercial controle e com
323 adição de probiótico comercial (*Bacillus subtilis*-complex e *Bacillus licheniformes*), foi
324 estimada em $1,53 \times 10^8$ células/g⁻¹, utilizando a mesma metodologia deste estudo. Já
325 Garcia e Olmos (2007), ao analisar os estágios de náuplios, zoea, mysis e pós-larvas
326 desta mesma espécie, utilizando a mesma técnica, observou que os valores aumentam de
327 acordo com a maturidade dos indivíduos e suas médias foram de um valor mínimo de
328 $4,3 \times 10^7$ e máximo de $1,0 \times 10^8$ células/ml (Garcia e Olmos, 2007). Xiong et al. (2017),
329 relatam que ao longo das fases de vida ocorrem variações na diversidade da microbiota
330 intestinal do *L. vannamei* e indica uma imaturidade da microbiota em indivíduos jovens,
331 fato que pode explicar os valores mais elevados de abundância no presente estudo com
332 juvenis da espécie.

333 A abundância microbiana total das fezes de juvenis de *L. vannamei*, apresentou
334 entre 0,6 e $6,6 \times 10^{10}$ células/g⁻¹ através da técnica de FISH para animais cultivados em
335 sistema de recirculação de água empregada por Beardsley et al. (2011). No presente
336 estudo, a média de abundância microbiana total das fezes para as três dietas nos tempos
337 T48 ($322,19 \times 10^8$ células/g⁻¹) corrobora com os valores indicados acima. Mesmo com o
338 conteúdo microbiano adicional na dieta do trabalho atual, não houve diferença aumento
339 no conteúdo microbiano fecal, comparado com o estudo mencionado acima. A maioria
340 das publicações utiliza contagem em placa, que torna difícil as comparações diretas.

341 O uso de leveduras em dietas experimentais de camarões peneídeos, como a *S.*
342 *cerevisiae* pode promover resistência a infecções causadas por *Vibrio* spp. Esta
343 afirmação foi comprovada em testes de desafio, avaliados por sobrevivência final
344 (Burgents et al., 2004; Flores-Miranda et al., 2011; Subramanian et al., 2014), análise da
345 hemolinfa por contagem em placa (Scholz et al., 1999) e teste *in vitro* (Pinoargote e

346 Ravishankar, 2018). Componentes das leveduras, como β -glucanos e
347 Mananoligossacarídeos, também podem atuar isoladamente contra infecções por *Vibrio*
348 spp. em peneídeos (Chang et al., 2011; Rungrassamee et al., 2014; Sarita, 2000).

349 O uso da levedura íntegra em dietas para camarões tem resultado em melhor
350 resistência a infecções do que quando usados seus componentes isolados. De acordo
351 com Sajeevan et al. (2009), a levedura íntegra adicionada a alimentação de juvenis de
352 *Fenneropenaeus indicus*, frente a 10 dias de infecção pelo Vírus da Mancha Branca
353 (WSSV), apontou resultados mais satisfatórios de sobrevivência ($64 \pm 5,3\%$) do que os
354 glucanos aplicados isoladamente ($36 \pm 4\%$). Já Scholz et al. (1999), ao avaliar dietas
355 para juvenis de *L. vannamei* contendo *S. cerevisiae* íntegra e glucano, observou que
356 após 55 dias de cultivo e também após 27 horas de desafio via injeção por *V. harveyi*, a
357 maior sobrevivência foram relacionadas aos camarões alimentados com levedura
358 íntegra. A levedura íntegra utilizada neste estudo, não influenciou na sobrevivência dos
359 camarões, isto pode estar associado ao tempo de exposição dos animais ao patógeno,
360 bem como ao método menos invasivo de infecção utilizado no experimento atual.

361 Neste estudo, todos os tratamentos BP0, BP50 e BP100 com e sem adição de VP
362 mostraram diminuição natural na abundância de *Vibrio* spp. ao longo do tempo no TGI.
363 Diante do exposto, as dietas formuladas com o bioproduto não interviram diretamente na
364 diminuição de *Vibrio* spp. da microbiota dos animais, porém, os tratamentos
365 experimentais também não influenciaram negativamente no conteúdo de Vibrionaceae
366 do TGI dos camarões. Os níveis indicados pelo estudo de digestibilidade de Valle et al
367 (2018) é de até 50% de substituição, ainda indicando que o uso do bioproduto nos níveis
368 adequados pode beneficiar nutricionalmente o hospedeiro, sem perdas no equilíbrio
369 microbiano dos indivíduos.

370 As espécies de *Vibrio* spp. podem sobreviver e reproduzir dentro do trato
371 digestivo de crustáceos (Hoffman e Decho, 2000). No TGI do *L. vannamei*, as
372 abundâncias de *Vibrio* spp. ($1,97$ a $6,37 \times 10^8$ células/g⁻¹) observadas neste trabalho
373 antes do desafio, mostram valores médios de conteúdo microbiano um pouco maiores
374 que o determinado por Hostins et al. (2017), $0,27 \pm 0,04 \times 10^8$ células/g⁻¹, que analisou
375 o conteúdo intestinal pós-larvas utilizando a técnica de FISH. Porém, as variações
376 ocorreram naturalmente ao longo das 48 horas do estudo, com resultados mais próximos
377 e mais baixos que o estabelecido pelo estudo anterior.

378 Os *Vibrio* spp. pertencentes a classe Gammaproteobacteria, possuem dominância
379 sobre outros microrganismos da mesma classe, estudos que utilizam técnicas de biologia
380 molecular demonstram a predominância desse gênero no TGI de camarões adultos
381 (Cornejo-Granados et al., 2017; Liu et al., 2011; Mongkol et al., 2018) e no conteúdo
382 fecal de juvenis (Beardsley et al., 2011). A maturidade microbiana do intestino de
383 camarões é estabelecida de acordo com a idade e estado de saúde do indivíduo, uma vez
384 que variações observadas em juvenis podem ser consideradas naturais do seu estágio de
385 vida.

386 Os resultados encontrados no estudo atual em animais alimentados com o
387 patógeno ou não, mostraram que a infecção não afetou a sobrevivência ou aumentou a
388 concentração de *Vibrio* spp. no TGI durante as 48 horas, indicando que a saúde dos
389 animais não foi comprometida, mesmo diante do desafio por VP. Segundo estudo de
390 Soonthornchai et al. (2015), uma cepa de *V. parahaemolyticus*, isolada de *P. monodon*
391 doente, aderiu e replicou no estômago e intestino de camarões da mesma espécie após 6
392 horas de infecção, em seguida causou sérias lesões teciduais ao fim de 24 horas de
393 colonização. Porém a cepa utilizada neste estudo não causou mortalidade aos animais.

394

395 **5. Conclusão**

396 Os resultados deste estudo indicam que os percentuais de substituição da farinha
397 de peixe pelo bioproduto, apesar de demonstrar bons níveis de digestibilidade em outros
398 estudos abordados neste trabalho, não apresentaram diferenças da dieta controle. Todos
399 os tratamentos experimentais diminuíram gradativamente a concentração de *Vibrio* spp.
400 no TGI dos juvenis de *L. vannamei*, durante as 48 horas de infecção.

401 Com base no que foi apresentado, mesmo não atuando na diminuição do *Vibrio*
402 spp., o bioproduto é um ingrediente de baixo custo para a produção, nutricionalmente
403 adequado para o *L. vannamei* e ambientalmente responsável, no entanto são necessários
404 mais estudos no âmbito imunológico e com proporções diferentes do bioproduto para
405 melhor entendimento dos seus efeitos nos camarões.

406

407 **6. Referências bibliográficas**

- 408 Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, M.A., Nahla-Ismael, E.M., 2008. Evaluation of
409 commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity
410 promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with
411 *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. 280, 185-189.
- 412 Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Escalante, K., Chávez, C., Cuzon, G., Gaxiola,
413 G., 2014. Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white shrimp
414 *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 424, 215-219
- 415 Atlas, R. M., Horowitz, A., Krichevsky, M., Bej, A. K., 1991. Response of microbial
416 populations to environmental disturbance. Micro Ecol. 22, 249-256.
- 417 Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-
418 flocs technology ponds. Aquaculture. 264, 140-147.

419 Beardsley, C., Moss, S., Malfatti, F., Azam, F., 2011. Quantitative role of shrimp fecal
420 bacteria in organic matter fluxes in a recirculating shrimp aquaculture
421 system. *FEMS Microbiol Ecol.* 77, 134-145.

422 Burgents, J. E., Burnett, K. G., Burnett, L. E., 2004. Disease resistance of Pacific white
423 shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast
424 culture food supplement. *Aquaculture*, 231, 1-8.

425 Cerenius, L., Lee, B. L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its
426 role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263-271.

427 Chang, J., Zhang, W., Mai, K., Ma, H., Liufu, Z., Wang, X., Al., Q., Xu, W., (2011)
428 Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease
429 resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio*
430 *alginolyticus*. *Aquac Res.* 42, 1101-1109.

431 Chumpol, S., Kantachote, D., Rattanachuy, P., Vuddhakul, V., Nitoda, T., Kanzaki, H.,
432 2017. In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an
433 ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing
434 *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios. *Aquac Res.* 48, 3182-3197.

435 Committee of Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, 2011. Digestive physiology of
436 fish and shrimp. In National Research Council, Division on Earth and Life Studies,
437 Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on the Nutrient
438 Requirements of Fish and Shrimp (Ed.), Nutrient requirements of fish and shrimp.
439 National Research Council. Washington, DC: National Academies Press.

440 Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A.,
441 Sánchez, F., Vichido, R., Ochoa-Leyva, A., 2017. Microbiome of Pacific Whiteleg
442 shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild,

443 Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. Sci Rep Hokkaido Fish Exp
444 Stn. 7, 11783.

445 Cottrell, M. T., David, K. L., 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial
446 biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware
447 estuary. Limnol Oceanogr. 48, 168-178.

448 Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2010. The application of
449 bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic
450 *Vibrio harveyi*. J Appl Microbiol. 109, 1643-1649.

451 Dantas, E. M., Valle, B. C. S., Brito, C. M. S., Calazans, N. K. F., Peixoto, S. R. M.,
452 Soares, R. B., 2016. Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of
453 postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac Nutr. 22, 335-
454 342.

455 Del'Duca, A., Cesar, D. E., Diniz, C. G., Abreu, P. C., 2013. Evaluation of the presence
456 and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis*
457 *niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. Aquaculture. 388,
458 115-121.

459 Flores-Miranda, M. C., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á. I., González-Ocampo,
460 H. A., Fierro-Coronado, J. A., Partida-Arangure, B. O., 2011. Microbial
461 immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
462 challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. Aquaculture. 320, 51-55.

463 Garcia, A. T., Olmos, J. S., 2007. Quantification by fluorescent in situ hybridization of
464 bacteria associated with *Litopenaeus vannamei* larvae in Mexican shrimp
465 hatchery. Aquaculture. 262, 211-218.

466 Hai, N. V., 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of applied microbiology,
467 119, 917-935.

468 Hisano, H., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Freire, E.S., Gonçalves, G.S., Ferrari, J.E.C.,
469 2004. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de
470 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*. 26, 171-179.

471 Hoffman M., Decho A., 2000. Proteolytic enzymes in the marine bacterium
472 *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of
473 environmental conditions. *Aquat Microb Ecol*. 23, 29–39.

474 Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D. E., Wasielesky JR, W., 2017. Efficacy and
475 variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT
476 system and in clear water supplemented with a commercial probiotic
477 mixture. *Aquaculture*, 480, 58-64.

478 Interaminense, J. A., Vogeley, J. L., Gouveia, C. K., Portela, R. W. S., Oliveira, J. P.,
479 Andrade, H. A., Peixoto, S. M., Soares, R. B., Buarque, D. S., Bezerra, R. S., 2018.
480 *In vitro* and *in vivo* potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella*
481 *algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. *Aquaculture*, 488, 114-122.

482 Li, E., Wang, X., Chen, K., Xu, C., Qin, J. G., Chen, L., 2017. Physiological change and
483 nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low
484 salinity. *Aquaculture*. 9, 57-75.

485 Liu, H., Wang, L., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Ma, S., Li, Q., 2011. The intestinal
486 microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined
487 by PCR–DGGE and clone library analyses. *Aquaculture*. 317, 32-36.

488 McIntosh, D., Samocha, T. M., Jones, E. R., Lawrence, A. L., Horowitz, S., Horowitz,
489 A., 2001. Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 31%)
490 on water and sediment quality, and on the production of *Litopenaeus vannamei* in
491 an outdoor tank system with limited water discharge. *Aquac Eng*. 25, 69-82.

492 Mongkol, P., Bunphimpapha, P., Rungrassamee, W., Arayamethakorn, S., Klinbunga,
493 S., Menasveta, P., Chaiyapechara, S., 2018. Bacterial community composition and
494 distribution in different segments of the gastrointestinal tract of wild-caught adult
495 *Penaeus monodon*. *Aquac. Res*, 49, 378-392.

496 Peixoto, S., Silva, E., Costa, C. B., Nery, R. C., Rodrigues, F., Silva, J. F., Soares, R.,
497 2018. Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus*
498 *vannamei* during nursery phase in biofloc system. *Aquac Nutr*. 24, 579-585.

499 Pinoargote, G., Ravishankar, S., 2018. Evaluation of the Efficacy of Probiotics in vitro
500 Against *Vibrio parahaemolyticus*, Causative Agent of Acute Hepatopancreatic
501 Necrosis Disease in Shrimp. *Journal of Probiotics & Health*. 6, 193.

502 Quintero, H.E., Roy, L.A., 2010. Practical feed management in semi-intensive systems
503 for shrimp culture. In: Alday-Sanz, V. (Eds), *The shrimp book*. Nottingham
504 University Press, Nottingham, UK. pp. 443–454.

505 Rungrassamee, W., Kingcha, Y., Srimarut, Y., Maibunkaew, S., Karoonuthaisiri, N.,
506 Visessanguan, W., 2014. Mannooligosaccharides from copra meal improves
507 survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to
508 *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 434, 403-410.

509 Sajeevan, T. P., Lowman, D. W., Williams, D. L., Selven, S., Anas, A., Rosamma, P.,
510 2009. Marine yeast diet confers better protection than its cell wall component
511 (1-3)- β -d-glucan as an immunostimulant in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquac*
512 *Res*. 40, 1723-1730.

513 Samocha, T.M., Davis, D.A., Saoud, I. P., Debault, K., 2004. Substitution of fish meal
514 by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific
515 white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 231, 197–203.

516 Sarita, G. B., 2000. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect
517 the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. Fish Shellfish Immunol.
518 10, 559-563.

519 Scholz, U., Diaz, G. G., Ricque, D., Suarez, L. C., Albores, F. V., Latchford, J., 1999.
520 Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by
521 supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture. 176, 271-283.

522 Sheikhzadeh, N., Makhlooghi, A. R., Nofouzi, K., Tukmechi, A., 2016. Influence of
523 diets enriched with two different *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth
524 performance, innate immune system and disease resistance in rainbow trout
525 (*Onchorhynchus mykiss*). Aquac Res. 47, 2691-2695.

526 Smith, L.L., Lee, G., Lawrence, L., Strawn, K., 1985. Growth and digestibility by three
527 sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein
528 source. Aquaculture. 46, 85-96.

529 Soonthornchai, W., Chaiyapechara, S., Jarayabhand, P., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal,
530 P., 2015. Interaction of *Vibrio* spp. with the inner surface of the digestive tract of
531 *Penaeus monodon*. PloS one, 10, e0135783.

532 Subramanian, M., Alikunhi, N. M., Kandasamy, K., 2014. Immunostimulatory effect of
533 mangrove-derived marine yeasts in *Penaeus monodon*. Aquac Res. 45, 389-396.

534 Sung, H. H., Hsu, S. F., Chen, C. K., Ting, Y. Y., Chao, W. L., 2001. Relationships
535 between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the
536 composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas
537 during cultivation. Aquaculture. 192, 101-110.

538 Thitamadee, S., Srisala, J., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., 2014. Double-
539 dose β -glucan treatment in WSSV-challenged shrimp reduces viral replication but

540 causes mortality possibly due to excessive Ros production. Fish Shellfish
541 Immunol. 40, 478-484.

542 Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K.,
543 Lightner, D. V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute
544 hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 105,
545 45-55.

546 Valle, B. C. S., Dantas, E. M., Silva, J. F. X., Bezerra, R. S., Correia, E. S., Peixoto, S.
547 R. M., Soares, R. B., 2015. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and
548 biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquac Nut. 21, 105-112.

549 Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A.,
550 Balladares, M., Swings, J., 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei*
551 larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. Appl Environ Microbiol. 65,
552 2592-2597.

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

556 Xiong, J., Zhu, J., Dai, W., Dong, C., Qiu, Q., Li, C., 2017. Integrating gut microbiota
557 immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity
558 of shrimp disease. Environmental microbiology. 19, 1490-1501.