



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB

ROGÉRIO WILLIAM SANTOS PORTELA

PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS
Shewanella algae **ORIUNDAS DE CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO**
Litopenaeus vannamei

Recife
2018

ROGÉRIO WILLIAM SANTOS PORTELA

PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS
Shewanella algae **ORIUNDAS DE CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO**
Litopenaeus vannamei

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientador:

Dr. José de Paula Oliveira

Recife
2018

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Portela, Rogério William Santos

Prospecção, caracterização e identificação de cepas *Shewanella algae* oriundas de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* / Rogério William Santos Portela – 2018.

90 f.: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: José de Paula Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Camarão- criação 2. Alga 3. Bactérias I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.). II. Oliveira, José de Paula (coorient.) III. Título

639.543

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-208

ROGÉRIO WILLIAM SANTOS PORTELA

PROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS
Shewanella algae **ORIUNDAS DE CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO**
Litopenaeus vannamei

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (Examinador externo)
Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE)

Dr. Janilson Felix da Silva (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Thiago Barbosa Cahu (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José de Paula Oliveira (Examinador externo)
Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA)

DEDICATÓRIA

*Toda satisfação a Deus
por minha vida e
saúde. Além de belas
oportunidades para
desfrutar, da melhor
forma, o milagre da
vida...*

*...Toda reverência aos
meus pais e familiares,
responsáveis pela
formação do meu
caráter. A eles devo
meu amor e vida...*

*...Ao meu grande amor,
amigos, orientadores,
colegas de laboratório e
pessoas que transitam
nossas vidas, toda
amizade, respeito e
agradecimento...*

*...A todos que tornam a
vida mais difícil e
muitas vezes dolorida,
que Deus vos
abençoe...*

*...A minha linda
esposa,
companheira e
amiga, ofereço
meu eterno amor.*

AGRADECIMENTOS

A RECARCINA (Rede de Carcinicultura Nacional), FINEP e CAPES por todo o investimento.

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco, por toda infraestrutura necessária ao desenvolvimento do trabalho. Especialmente aos laboratórios Biologia do Solo e Genoma.

A Universidade Federal de Pernambuco especialmente à Pós-Graduação em Ciências Biológicas por todo conhecimento e enriquecimento humano.

Aos orientadores e responsáveis Dr. Ranilson de Souza Bezerra, Dra. Márcia Vanusa, Dr. José de Paula, Dr. Lorinaldo Cavalcante e Dra. Márcia Barreto por todo apoio, compreensão e incentivo ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos Integrantes do laboratório Biologia no IPA e a todos que compõem o LABENZ, especialmente a Lidiane Cristina Pinho Nascimento Portela, Janilson Silva, Diego Buarque e Thiago Cahú.

Também a Carol Kropnisk por toda parceria de longas datas, ao Sr. Josemir Junior por todo o auxílio com materiais do laboratório, a Alessandra, Maria do Carmo e todos os outros pertencentes ao laboratório Biologia do Solo.

Aos integrantes do laboratório Genoma especialmente Dra. Luísa, Dra. Adália, Dra. Cacau e Dr. Amaro por todo apoio no decorrer do trabalho e conselhos sempre pertinentes.

Aos meus pais, minha esposa, familiares, amigos e colegas, sem vocês minha vida não teria sentido.

*“Não existe um caminho para a
felicidade. A felicidade é o Caminho”.*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Shewanella algae é uma bactéria comumente isolada do trato digestivo de crustáceos. Apresenta ação lipolítica, proteolítica, amilolítica e antagonismo a bactérias patogênicas, características de um potencial probiótico para carcinicultura e piscicultura. Diante disto, este trabalho teve como objetivos, isolar e identificar microrganismos, potenciais probióticos, presentes na água de cultivo e no trato digestivo do camarão *L. vannamei*, cultivado em sistema heterotrófico, e caracterizar as cepas selecionadas fenotipicamente e genotipicamente avaliando suas relações filogenéticas e a competência das cepas estudadas como candidatas a probiótico. Inicialmente, foram isoladas 22 cepas bacterianas no meio TCBS, a partir de amostras do cultivo intensivo heterotrófico de *L. vannamei* e os DNAs das cepas foram extraídos, quantificados e identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparação ao *GenBank* – NCBI e RDP - *Seqmath*. Posteriormente, foram agrupadas utilizando os iniciadores REP, ERIC e BOX-PCR. Em seguida, foram selecionadas as cepas IPA-S.111 e IPA-S.252, que apresentaram ótimos índices de atividade amilolítica e proteolítica. Estas cepas foram identificadas através do sequenciamento completo do gene 16S rRNA, alinhadas a 45 espécies do gênero *Shewanella* e avaliadas filogeneticamente utilizando os métodos *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Não obstante, foi realizada uma caracterização fenotípica através de análises bioquímicas, como teste oxidase, catalase, Gram, antibiograma e testes presentes no kit BACTRAY (Laborclin®). Ainda, caracterizou-se morfologicamente as bactérias e colônia. Na primeira etapa, os amplicons apresentaram tamanho específico entre 325 a 438 pb. O agrupamento realizado com o REP, ERIC e BOX-PCR apresentou similaridade de 59 % distribuídos em quatro grupos. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu identificar gêneros, como *Bacillus*, *Vibrio* e *Shewanella*. Ademais, a alta concentração de bactérias vibriônicas apontam condições inadequadas de cultivo, devido ao alto grau de patogenicidade que este grupo apresenta. Em uma segunda etapa, o sequenciamento total do gene 16S rRNA das cepas revelou alta similaridade a espécie *S. algae*, utilizando o *GenBank* e o RDP-seqmath. As cepas estudadas foram sensíveis aos antibióticos Clorafenicol (30µg), Amicacina (30µg), Ampicilina/Sulbactam* (10µg), Ofloxacina (5µg), Azitromicina (15µg) e Tetraciclina (30µg). Por conseguinte, a capacidade de formação de biofilme, adicionada ao alto potencial enzimático e antagonismo a patógenos, característico do gênero *Shewanella*, tornam estas cepas potenciais probióticos para a carcinicultura.

Palavras-chave: carcinicultura; sistema heterotrófico; bactérias probióticas; *Shewanella algae*, 16S rRNA.

ABSTRACT

Shewanella algae is a commonly isolated bacteria from the digestive tract of crustaceans. It presents lipolytic, proteolytic, amylolytic and antagonistic action against pathogenic bacteria, characteristics of a potential probiotic for shrimp farming and pisciculture. In this concern, this work aimed to, first of all, isolate and identify potential probiotic microorganisms present in the water and in the digestive tract of *L. vannamei* shrimp, grown in a heterotrophic system, and characterize the selected strains phenotypically and genotypically, evaluating their phylogenetic relationships and the competence of the strains studied as probiotic candidates. Initially, 22 bacterial strains were isolated in the TCBS medium from samples derived from *L. vannamei*'s intensive heterotrophic culture, and strain DNAs were extracted, quantified and identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene and comparison to GenBank - NCBI and RDP - Seqmath. Subsequently they were grouped using the REP, ERIC and BOX-PCR primers. In a second step, the strains IPA-S.111 and IPA-S.252 were selected, with which they presented excellent amylolytic and proteolytic activity indexes. The selected strains were identified by complete sequencing of the 16S rRNA gene, aligned to 45 species of the genus *Shewanella* and evaluated phylogenetically using the Neighbor-Joining, Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods. Nevertheless, a phenotypic characterization was carried out through biochemical tests such as oxidase, catalase, Gram, antibiogram and tests present in the BACTRAY kit (Laborclin®). Also, the bacteria and colony were morphologically characterized. In the first step, the amplicons presented specific size between 325 and 438 bp. The grouping performed with REP, ERIC and BOX-PCR presented similarity of 59 % distributed in four groups. Partial sequencing of the 16S rRNA gene allowed the identification of genera such as *Bacillus*, *Vibrio* and *Shewanella*. Moreover, the high concentration of vibriaceous bacteria point to inadequate culture conditions, due to the high degree of pathogenicity that this group presents. In a second step, complete sequencing of the 16S rRNA gene from strains revealed high similarity to *S. algae* species, using GenBank and RDP-seqmath. The strains studied were sensitive to the antibiotics Clorafenicol (30µg), Amicacin (30µg), Ampicilin/Sulbactan (10µg), Ofloxacin (5µg), Azitromicin (15µg) and Tetraciclín (30µg). Therefore, the capacity of biofilm formation, added to the high enzymatic potential and antagonism to pathogens, characteristic of the genus *Shewanella*, make these strains potential probiotics for shrimp farming.

Keywords: carciniculture; heterotrophic system; probiotic bacteria; *Shewanella algae*, 16S rRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Crescimento da produção aquícola mundial nas últimas cinco décadas.....	18
Figura 2 - Evolução da Carcinicultura Brasileira: 1997 a 2012.....	19
Figura 3 - Camarão Branco <i>Litopenaeus vannamei</i>	20
Figura 4 - Principais países produtores de <i>Penaeus vannamei</i>	21
Figura 5 - Produção mundial de <i>Litopenaeus vannamei</i> em toneladas nas últimas décadas.....	21
Figura 6 - Cultivo Super-intensivo de Camarões em meio aos Bioflocos (BFT).....	22
Figura 7 - Modo de ação dos Probióticos em camarão.....	27
Figura 8 - Imagem de flocos microbianos obtidos em viveiro de cultivo de camarões em microscópio óptico (detalhe).....	31

ARTIGO 1 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EM SISTEMA DE CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei*

Figura 1 - Dendogram através do programa UPGMA e coeficiente de Jaccard.....	44
--	----

ARTIGO 2 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS *Shewanella algae* ISOLADAS NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei*

Figura 1 - Agrupamento por <i>Neighbor-Joining</i>	62
Figura 2 - Árvore Filogenética Máxima Verossimilhança.....	62
Figura 3 - Árvore Filogenética Construída pelo Método Inferência Bayesiana (KHI-INV).....	64

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1	Características principais dos sistemas de cultivo tradicional (semi-intensivo) com o sistema de flocos microbianos (BFT), em viveiros escavados.....	32
----------	---	----

ARTIGO 1 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EM SISTEMA DE CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei*

Tabela 1 - Resultados das sequências do genbank (NCBI-Blastn).....	44
--	----

ARTIGO 2 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS *Shewanella algae* ISOLADAS NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei*

Tabela 1 - Morfologia das cepas bacterianas analisadas a partir de caracterização morfológica da bactéria e colônia.....	56
Tabela 2 - Caracterização Bioquímica das cepas isoladas no cultivo intensivo heterotrófico de <i>L. vannamei</i> , sendo a IPA-S. 252 isoladas do trato digestivo e a IPA-S.111 isolada da água.....	57
Tabela 3 - Antibiógrama das cepas isoladas no cultivo intensivo heterotrófico de <i>L. vannamei</i> , sendo a IPA-S. 252 isolados do trato digestivo e a IPA-S. 111 isolada da água.....	58
Tabela 4 - Análise das Sequências e Identificação Através do NCBI/GenBank e RDP.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC	Associação Brasileira de criadores de camarão
ACE	Teste da Acetamida
ADH	Teste da Arginina Desidrogenase
ADO	Teste do Adonitol
AM	Agar Marinho
ARA	Teste da Arabinose
ARG	Teste da Arginina Desidrogenase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CET	Teste da Cetrimida
CIT	Teste do Citrato Desidrogenase
CTL	Teste da Arginina
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DO	Densidade Óptica
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESC	Teste da Esculina
FAO	Food and Agriculture Organization
fd1	<i>Primer</i> forward do gene 16S rRNA
FISH	Fluorescence in Situ Hybridization
GENBANK	Banco de Sequências Gênicas
HKI	Hasegawa-Kishino-Yano
H2S	Teste do Sulfeto de Hidrogênio
IB	Inferência Bayesiana
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IGS	Intergenic Spacer
IMNV	Infectious Mionecrose Vírus
IND	Teste do Indol
INO	Teste do Inositol
INTERPRO	InterPro: Protein Sequence Analysis & Classification
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco

IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	Luria & Bertani
LDC	Teste da Lisina Descarboxilase
LPSH	List of Prokaryotic Names (Lista dos nomes dos procariontes)
MAL	Teste do Malonato
MAN	Teste do Manitol
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
ME	Mínima Evolução
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MLT	Teste da Maltose
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MV	Máxima Verossimilhança
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₃	Amônia
NJ	Neighborn – Joining
ODC	Teste da Ornitina Descarboxilase
ONPG	O-nitrophenyl galactopyranoside (Teste da β -Galactosidase)
OTUs	Operational Taxonomic Units
Pb	Pares de Base
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Teste da Desaminação da Fenilalanina
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHRED	Editor de leitura Phil's
PIR	Protein Information Resource
PL	Pós-larvas
RAF	Teste da Rafinose
RAM	Teste da Rhamanose
RDP	Ribosomal Database Project
rD1	<i>Primer</i> Reverse do gene 16S rRNA
RECARCIN	Rede de Carcinicultura Nacional
A	
RNase	Ribonuclease

rRNA	RNA ribossomal
RPM	Rotações por Minuto
SAC	Teste da Sacarose
SAL	Teste da Salicina
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
SOR	Teste do Sorbitol
SSA	Southern Shrimp Alliance
SWISS-Prot	Swiss protein sequence db
Taq	Enzima extraída da bactéria <i>Termophylus aquaticus</i>
TBE	Solução tampão contendo Tris, ácido Bórico e EDTA
TCBS	Agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose
TE	Solução tampão de Tris-HCl e EDTA
TIGR	The Institute for Genomic Research
TM	Temperature Melting
TMPD	n,n,n,n-Tetrametil-p-Fenileno Diamina Mono-Hidrocloridratado
TSA	Trypticase Soy Agar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
URE	Teste da Urease
VP	Teste da Acetoina
WSSV	White Spot Syndrome Virus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo geral.....	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	SITUAÇÃO DA CARCINICULTURA MUNDIAL.....	18
2.2	EVOLUÇÃO DA CARCINICULTURA BRASILEIRA.....	19
2.3	PANORAMA DA CARCINICULTURA NO NORDESTE.....	19
2.4	LITOPENAEUS VANNAMEI (BOONE, 1931).....	20
2.5	TÉCNICAS DE CULTIVO E IMPACTO AMBIENTAL DO CULTIVO.....	22
2.6	SISTEMA AUTOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO.....	23
2.7	BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS.....	25
2.8	IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NO CULTIVO.....	26
2.9	PROBIÓTICOS NA CARCINICULTURA.....	26
2.10	<i>SHEWANELLA ALGAE</i>	28
2.11	BIOFILME E BIOFLOCO.....	30
2.12	O GENE 16S RRNA E A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS.....	33
2.13	FILOGENIA E BIOINFORMÁTICA APLICADA À BACTERIOLOGIA.....	34
2.13.1	Fillogenia.....	34
2.13.2	Bioinformática.....	35
3	ARTIGO 1 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EM SISTEMA DE CULTIVO HETEROTRÓFICO DE <i>Litopenaeus vannamei</i>.....	38
4	ARTIGO 2 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS <i>Shewanella algae</i> ISOLADAS NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE <i>Litopenaeus vannamei</i>.....	48
5	ARTIGO 3 - PEDIDO DE PATENTE - SOLUÇÃO PROBIÓTICA PARA APLICAÇÃO EM SISTEMA INTENSIVO HETEROTRÓFICO NO CULTIVO DE CRUSTÁCEOS E PEIXES.....	68
6	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Apontado como alternativa aos sistemas de cultivos extensivos tradicionais, o sistema intensivo heterotrófico é considerado o mais vantajoso em termos econômicos, sociais e ambientais. Trata-se de um sistema fechado, sem renovação de água, com aplicação ou não de probióticos, alta taxa de aeração e ração com baixa concentração de proteínas (BOYD & CLAY, 2002). O cultivo heterotrófico é baseado no princípio da exclusão competitiva, na qual bactérias patogênicas são substituídas por um suplemento simples ou uma cultura mista de bactérias selecionadas (GULLIAN et al., 2004). O sistema ainda favorece a produção de um complexo formado por sedimentos e microrganismos, denominado biofloco, que é utilizado como alimento natural ao camarão (WASIELESKY et al., 2013).

Neste aspecto, o estudo da diversidade microbiana é essencial à compreensão das interações ecológicas dentro do cultivo, uma vez que determinados microrganismos são importantes para manutenção da qualidade da água do cultivo e saúde do animal. Estes microrganismos em específico são os probióticos, que auxiliam na absorção de compostos nitrogenados, promovem o incremento nas taxas de conversão alimentar e redução dos custos com alimentação (BANERJEE & RAY, 2017).

Os probióticos participam ainda da imunomodulação dos animais e no controle de patógenos, diminuindo a incidência de microrganismos patogênicos, como bactérias do gênero *Vibrio*. Normalmente são isolados do trato digestivo do próprio animal hospedeiro atuando sobre o apetite, promovendo uma maior absorção de nutrientes e maior crescimento do animal em cultivo (CARNEVALI et al., 2016; DANTAS et al., 2009). Contudo, o grande obstáculo para a compreensão destas relações microbiológicas tem sido a identificação das bactérias por técnicas bioquímicas convencionalmente utilizadas.

Atualmente, tanto as relações filogenéticas quanto as taxonômicas são resolvidas através do sequenciamento do gene 16S rRNA (WEISBURG et al., 1991). Ademais, softwares com algoritmos específicos para análise de DNA também se encontram disponíveis (PROSDOCIMI et al. 2002). Algumas técnicas bioquímicas também podem ser utilizadas para caracterização fenotípica bacteriana, porém não mais com o propósito de identificação de bactérias probióticas, como a *Shewanella*, sendo este o papel dos genes ribossomais (HAN et al., 2016).

O gênero *Shewanella* pertencente à classe *Gammaproteobactérias*, do grupo das bactérias gram-negativas, móveis, baciliforme, oxidase positiva, aeróbias não fermentativas e facultativas. Além disso, são classificadas como bactérias aquáticas, sendo comumente encontradas em ambiente marinho, bem como em ambientes extremos e variados, inclusive

áreas de baixa temperatura e em locais com histórico de contaminação por petróleo (HAN et al., 2016; KIM et al., 2007).

Shewanella é também o gênero mais estudado dentro do grupo das bactérias redutoras de ferro e apresenta, ainda, atividade antimicrobiana contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* e *V. harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2012). Diante destas características, alguns estudos reportam o uso da bactéria *Shewanella algae* como potencial probiótico aplicável à carcinicultura em sistema intensivo heterotrófico.

Os microrganismos locais são, muitas vezes, mais adaptados às condições climáticas, ambientais e hidrológicas da região de cultivo, quando comparados a probióticos comerciais. Desta forma, entender a microbiota local nos cultivos intensivos heterotróficos e realizar a prospecção de microrganismos com potencial probiótico é fundamental para o sucesso na produção de camarão em sistemas de alta densidade, bem como redução dos custos empregados no sistema e para a diminuição do ônus ambiental resultante desta atividade.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e caracterizar cepas de *Shewanella algae* presentes na água e no trato digestivo do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema heterotrófico e avaliar seu potencial como candidata a probiótico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar cepas para probióticos a partir dos isolados presentes na água de cultivo heterotrófico e no trato digestivo de *Litopenaeus vannamei*;
- Caracterizar e identificar os isolados a partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S e trechos intergênicos, com o auxílio da técnica BOX PCR;
- Analisar morfolologicamente e bioquimicamente as cepas de *Shewanella algae*, bactéria candidata a probiótico;
- Determinar os antibióticos eficazes contra as cepas candidatas selecionadas;

- Testar a capacidade de produção de biofilme bacteriano com as cepas S.111 e S.252;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre as cepas estudadas e o gênero *Shewanella*;
- Detalhar as características, potencialidades e condições de produção de cepas candidatas de *S. algae*.

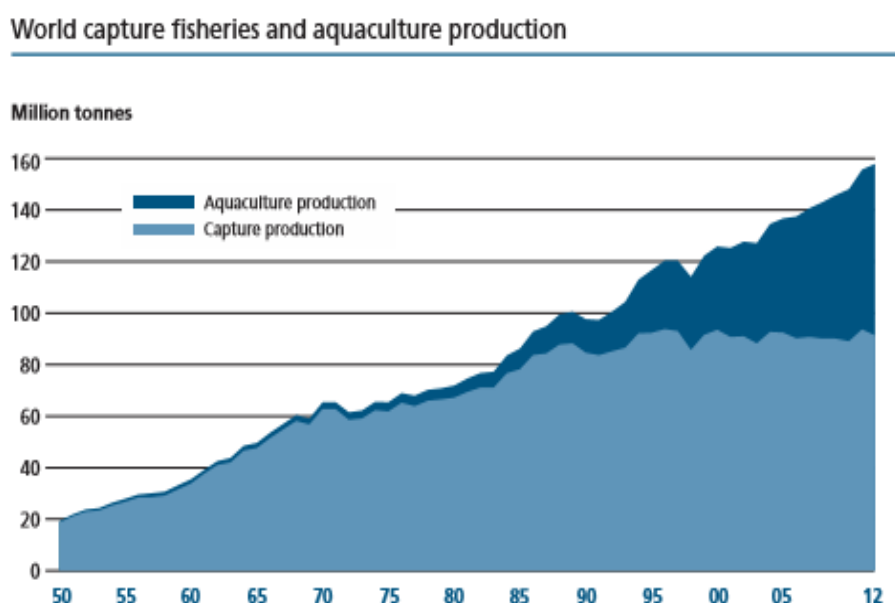
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SITUAÇÃO DA CARCINICULTURA MUNDIAL

A Organização das Nações Unidas para Alimento e Agricultura (FAO, 2014) afirma que a aquicultura será a atividade do setor primário da economia mundial que obterá o maior crescimento nos próximos trinta anos. Este fato deve-se principalmente pela limitação dos estoques naturais de pescado, do domínio tecnológico para produção e cultivo de espécies marinhas, além da crescente demanda por alimentos com elevados teores proteicos (ROCHA, 2013) (figura 1).

A carcinicultura, vertente da aquicultura, é uma atividade que tem crescido consideravelmente nas últimas décadas, onde, no cenário mundial apresentou um crescimento exponencial alcançando a produção de 3.930.059t no ano de 2011 superando a produção por extrativismo de 3.288.467t/ano (FAO, 2014). Neste contexto, os países com maiores produções são a China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Índia, Bangladesh e Filipinas do continente asiático, responsáveis por 85,91 % da produção. Não obstante, o Equador, o México e o Brasil foram responsáveis por 13,76 % da produção mundial em 2011, em parceria com outros países do continente americano (ROCHA, 2013).

Figura 1. Crescimento da produção aquícola mundial nas últimas cinco décadas.



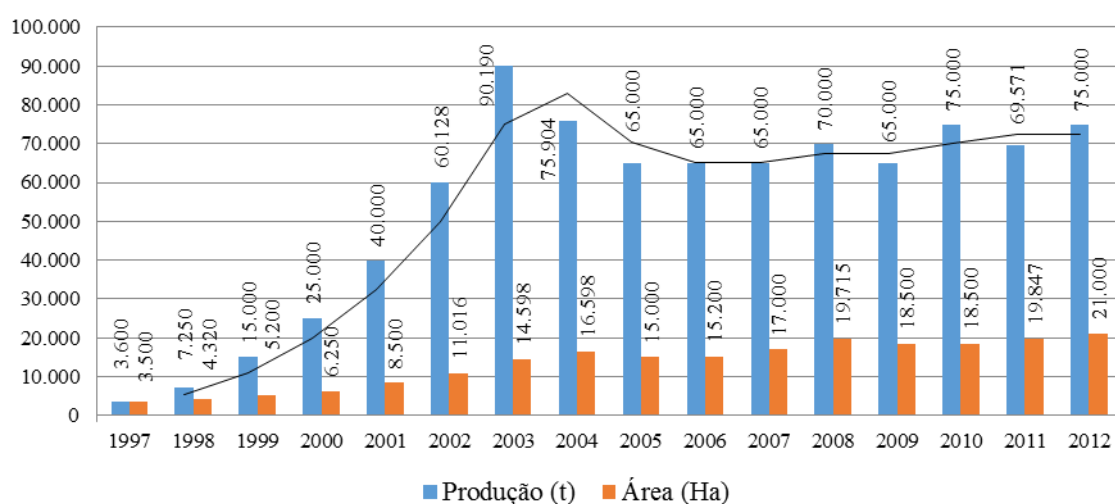
Fonte: FAO, 2014.

2.2 EVOLUÇÃO DA CARCINICULTURA BRASILEIRA

No final dos anos 90 a carcinicultura havia se tornado uma atividade importante e bastante rentável no ponto de vista econômico (BURGOS-HERNÁNDEZ et al., 2005), principalmente entre os anos de 1997 a 2003, no qual a atividade apresentou um incremento de 2.505,28 % (figura 2), traçando toda produção nacional entre 1997 até 2012.

Contudo, a carcinicultura Brasileira, Chinesa, Tailandesa, Indiana, Vietnamita e Equatoriana foram abaladas, entre 2003 e 2004 pela ação *antidumping* promovida pela Aliança Sulista de Pescadores de Camarão (SSA) dos Estados Unidos. Essa diminuição na produtividade resultou na queda das exportações e, conseqüentemente, uma grande perda econômica. Além disso, doenças virais no cultivo, como a Mionecrose Infecciosa Muscular (IMNV) e a Síndrome da Mancha Branca (WSSV) atingiram respectivamente a região Nordeste e Sul (OSTRENSKY et al., 2007). Após o ocorrido, o camarão brasileiro foi perdendo espaço gradativamente no comércio mundial reduzindo as exportações deste produto de 58.455t/US\$ 226,0 milhões em 2003 a 0,0t no ano de 2012. Desta forma, toda produção camaroeira de 2012 foi destinada ao mercado interno (ABCC, 2013).

Figura 2. Evolução da Carcinicultura Brasileira: 1997 a 2012.



Fonte: ABCC, 2013.

2.3 PANORAMA DA CARCINICULTURA NO NORDESTE

Iniciada no estado do Rio Grande do Norte com o “Projeto Camarão”, a carcinicultura Brasileira, emergida nos anos 70, surgiu como opção à extração de sal no Estado (ABCC, 2014). O cultivo, onde, inicialmente, predominava a espécie *Marsupenaeus japonicus* logo cedeu espaço aos estudos com espécies nativas, como *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus*

subtilis, *F. brasiliensis* e *F. paulensis*. Nos anos 90, com a evolução da produção do *L. vannamei* no Equador, o Brasil adotou a espécie e a atividade chegou ao atual estágio de desenvolvimento. Em pouco tempo, o *L. vannamei*, também conhecido como camarão branco do Pacífico ou camarão marinho, se destacou por apresentar características favoráveis ao seu cultivo (OSTRENSKY & BARBIERI, 2002).

Apesar de o Brasil dispor de condições climáticas, hidrobiológicas e topográficas favoráveis em toda a extensão de sua costa, o desenvolvimento da carcinicultura marinha está concentrado na região Nordeste que responde por cerca de 90 % da produção nacional. O litoral do Estado de Pernambuco possui clima tropical e um ecossistema produtivo (MANZO, 2003), o que possibilitou o desenvolvimento de uma carcinicultura rentável e promissora, com produção do *L. vannamei* que abrange 21 municípios distribuídos numa faixa de 187 Km, estendendo-se desde o município de Goiana, ao norte, até o município de São José da Coroa Grande, ao sul. No ranking brasileiro, Pernambuco assume atualmente a quarta posição em produção, possuindo 155 fazendas produtoras (10 % da produção nacional). Apresenta ainda, uma área cultivável de 1.567Ha (7 %), com produção de 4.309t (6,2 %) (ABCC; Ministério da Pesca e Aquicultura e Governo Federal. 2013).

2.4 *LITOPENAEUS VANNAMEI* (BOONE, 1931)

O *L. vannamei* (figura 3) é um crustáceo da ordem Decápoda, da família Penaeida, espécie endêmica do oceano Pacífico, sendo encontrada de Sonora (México) até Tumbes (norte do Peru). Com preferência por fundos lamosos, a espécie é normalmente encontrada no infralitoral com profundidades de até 72 metros. Naturalmente cresce até 23 cm de comprimento e apresenta hábito alimentar onívoro (BARBIERI & OSTRENSKY, 2001).

Figura 3. Camarão branco *Litopenaeus vannamei*.

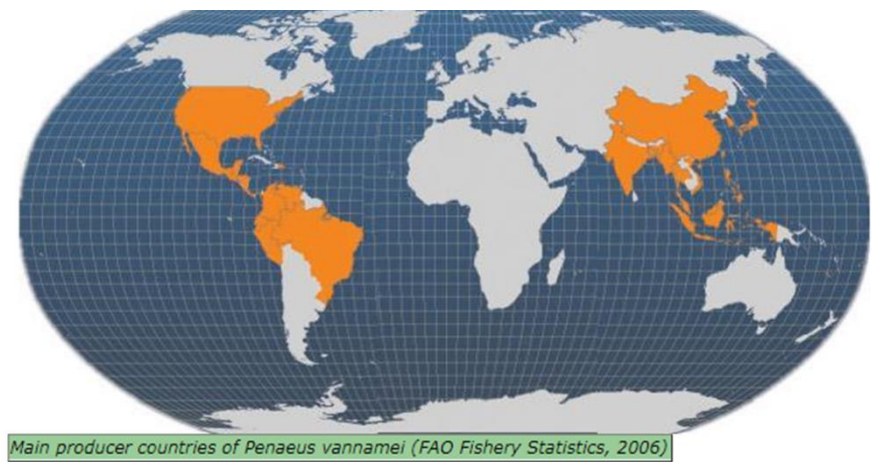


Fonte: LOEBMANN et al., 2010.

O *L. vannamei* é amplamente cultivado em várias partes do mundo (figura 4) e seu excelente desempenho em cultivo, com rápido crescimento, boa taxa de sobrevivência em

cultivo de alta densidade e alta tolerância a doenças, deve-se, em parte, a sua fácil adaptação a condições físico-químicas adversas em cultivos (LIU et al., 2017; LOEBMANN et al. 2010). Dentre as condições suportadas destacam-se variações na temperatura e salinidade, se desenvolvendo muito bem em uma salinidade entre 15 e 30 ‰ e temperaturas entre 23 e 30 °C, além de sua taxa regular de crescimento (SANTOS, 2009).

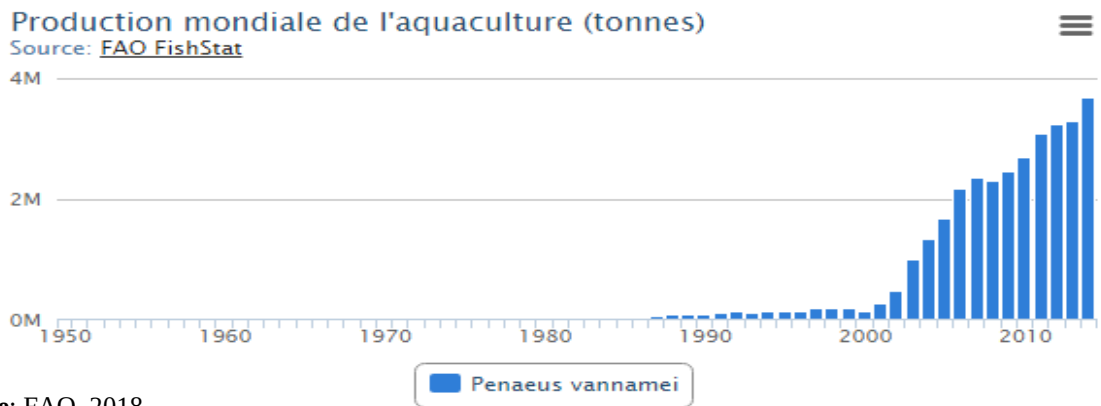
Figura 4. Principais países produtores de *Penaeus vannamei*.



Fonte: FAO, 2018.

Quanto à aceitação comercial da espécie que garante o custeio de todo o ciclo produtivo, o *L. vannamei* é significativamente preferido dentre as demais espécies no mercado nacional e internacional, com forte demanda compradora (SÁ, 2003). Sua produção tem crescido consideravelmente nas últimas décadas e apresentou uma produção mundial de 2.300.000t em 2007 (FAO, 2014) (figura 5).

Figura 5. Produção mundial de *Penaeus vannamei* em toneladas nas últimas décadas.



Fonte: FAO, 2018.

2.5 TÉCNICAS DE CULTIVO E IMPACTO AMBIENTAL

Dentre as técnicas de crescimento utilizadas atualmente na aquicultura, estão presentes as técnicas: extensiva, semi-intensiva, intensiva e super-intensiva, com baixa densidade de povoamento, média, alta e muito alta respectivamente. O tipo de técnica escolhida irá depender da estratégia de produção que o aquicultor decida adotar, levando-se em consideração variáveis, como custo de produção, impacto ambiental e viabilidade econômica.

A técnica extensiva, frequentemente utilizada em países latino-americanos, caracteriza-se pela implantação de fazendas de criação de *L. vannamei* em regiões entre marés sem ventilação ou bombeamento de água. Destacam-se também pela baixa densidade de camarões, alimentação natural acrescida de ração de baixo teor proteico, uma vez por dia, e densidade de 4-10 pl/m² (FAO, 2014). Na técnica de cultivo semi-intensiva ocorre renovação da água e baixa ventilação artificial. A alimentação dos camarões é realizada por adubação dos viveiros, oferta de ração peletizada três vezes por dia e densidade entre 10-30 pl/m² (FAO, 2014).

A técnica intensiva é geralmente localizada distante de regiões litorâneas. O cultivo é realizado com densidades altas, em torno de 60 a 300 pl/m², exigindo grande aeração artificial devido à densidade de povoamento. A técnica baseia-se no desenvolvimento de bactérias heterotróficas e formação de bioflocos. Nesta, a relação entre Carbono e Nitrogênio (C:N) é monitorada a fim de manter a proporção 10:1 favorecendo o desenvolvimento bacteriano. Já a super-intensiva desenvolve-se em estufas sem troca de água, apenas reposição da evaporação (figura 6). Tanto a técnica intensiva quanto a super-intensiva caracterizam-se pelo baixo impacto ambiental, por serem bio-seguras, sustentáveis, além do desenvolvimento de camarões de alta qualidade (FAO, 2014).

Figura 6. Cultivo Super-intensivo de Camarões em meio aos Bioflocos (BFT).



Fonte: Biblioteca Setorial de Pós-Graduação em Oceanografia (2015).

Tradicionalmente, o cultivo extensivo de camarão demanda elevados volumes de água para renovação, sendo necessárias entre 39 e 199 toneladas de água para produção de 1 quilo de camarão em viveiro de engorda (ARANTES, 2007; HOPKINS & VILLALÓN, 1992). Ademais, toda água saturada de matéria orgânica é eliminada, sem nenhum tipo de remediação, diretamente nos rios, alterando o equilíbrio do ecossistema (ARANTES, 2007; HOPKINS et al, 1995; BAIRD, et al, 1996).

Por sua vez, o cultivo intensivo heterotrófico, trabalha utilizando pouca ou nenhuma renovação de água, que é possível graças às bactérias heterotróficas do cultivo que mantém a qualidade da água e o equilíbrio do sistema (BOYD & CLAY, 2002; MORIARTY et al., 2005).

2.6 SISTEMA AUTOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO

O cultivo autotrófico ainda é o mais utilizado entre os produtores brasileiros. Este consiste na utilização de baixas densidades de estocagem de camarões, sistema com trocas frequentes a fim de estabilizar a concentração de algas no cultivo, e a utilização de rações com elevados teores de proteínas (GROSS et al., 2003). No entanto, este sistema tem sido responsabilizado, pelas organizações ambientais, por promover a deterioração dos ecossistemas costeiros, além de perdas econômicas decorrentes de sua auto-poluição (SAMOCHA et al., 2007). Adicionalmente, muitas das doenças são originadas em complexos de fazendas que utilizam sistemas de cultivos extensivos e compartilham efluentes contaminados (KAUTSKY et al. 2000).

Apontado como alternativa ao sistema intensivo tradicional, o sistema heterotrófico tem ganhado a atenção dos pesquisadores por se destacar como o mais vantajoso em termos econômicos e sociais, por sua maior rentabilidade por área e maior necessidade de mão-de-obra (EMERENCIANO et al., 2013). A importância ambiental e econômica que o sistema heterotrófico oferece se dá, principalmente, pelo reaproveitamento da água do cultivo, evitando as trocas frequentes de água e o despejo desta no meio ambiente sem o pré-tratamento necessário e dispendioso para a indústria (GULDHE et al., 2017). Além disto, o sistema heterotrófico reduz o uso de produtos químicos, comparado a outros modelos de cultivo (MORIARTY et al., 2005). Este tipo de sistema favorece o cultivo tanto de espécies dulciaquícolas quanto de espécies halofílicas. Espécies como *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei*, camarões de água salgada, são amplamente estudadas e cultivadas em sistema heterotrófico.

O desenvolvimento do meio heterotrófico também pode ser obtido através de probióticos, baseando-se no princípio da exclusão competitiva, na qual bactérias patogênas

são substituídas por um suplemento simples ou uma cultura mista de bactérias selecionadas (GULLIAN et al., 2004). No decorrer dos anos, vários trabalhos atestam o potencial das bactérias probióticas quanto ao controle de patógenos e melhoria no sistema heterotrófico, como exemplo o *Bacillus* spp., eficiente no cultivo de diferentes espécies de crustáceos como *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Branchinella thailandensis* e *Homarus gammarus* (PURIVIROJKUL et al., 2013), além do *Farfantepenaeus brasiliensis*, atuando na diminuição de *Vibrios* no cultivo (SOUZA et al., 2012).

Em sistemas de altas densidades de estocagem ($>60\text{cam/m}^2$), no qual a alta biomassa de produção acelera a deterioração da água e do solo, a má manutenção da qualidade da água, instabilidade dos parâmetros físicos e químicos, desequilíbrio iônico ou carência de íons essenciais, instabilidade da ecologia microbiana e alimentação de baixa qualidade, são os principais gatilhos para o aparecimento de doenças e para o mau rendimento zootécnico dos cultivos. Ainda, elevados níveis de radiação solar, muito comuns na região nordeste do Brasil, propiciam o desenvolvimento de organismos fototróficos, tornando difícil o estabelecimento de sistemas heterotróficos, mesmo quando administradas grandes quantidades de carbono ao sistema (BURFORD et al., 2004).

Nesse contexto, uma alternativa é o cultivo em sistema mixotrófico. A técnica consiste de um manejo equilibrado entre as comunidades de fitoplâncton e de bactérias heterotróficas. O sistema mixotrófico pode ser dividido em três fases: a fase de fitoplâncton; a fase fitoplanctônica-probiótica e a fase probiótica. O objetivo é aproveitar os processos fototróficos e heterotróficos trabalhando em conjunto e mantendo ativas suspensões de partículas de biofloco na coluna de água através de aeração contínua. Isto, por sua vez, permite uma troca de água mínima ou nenhuma, levando a estabilização do sistema e reciclagem efetiva de nutrientes (AVNIMELECH, 2012; HUDA et al., 2013; JU; FORSTER; DOMINY, 2009; RAY; DILLON; LOTZ, 2011; WASIELESKY et al., 2006).

Os principais grupos de algas presentes inicialmente em sistema de biofloco são as diatomáceas, euglenophitas, cianobactérias e clorófitas, enquanto os dinoflagelados são notáveis apenas no período inicial. As microalgas desempenham um papel fundamental na dinâmica dos sistemas de aquicultura em biofloco. Alguns grupos de fitoplâncton, como diatomáceas, são desejados por seu alto valor nutricional e contribuição para a qualidade da água. Outros grupos, como cianobactérias, são indesejáveis devido ao baixo valor nutricional e à capacidade de produzir toxinas. Assim, o monitoramento da estrutura e sucessão da comunidade de fitoplâncton é fundamental para o gerenciamento de sistemas de biofloco (LLARIO et al., 2018). Ademais, Llario et al (2018) observaram um claro domínio das diatomáceas ao longo dos cinco meses que incluíram um cultivo completo em sistema de

bioflocos. A sucessão do sistema autotrófico pelo sistema de bioflocos heterotróficos é observada a partir da redução na produção primária líquida. A intensidade da luz desempenhou um papel fundamental na determinação da composição e abundância do fitoplâncton (LLARIO et al, 2018).

2.7 BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

Em cultivos autotróficos ocorre uma diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido (ARANTES, 2007; BROWDY et al., 1993) e acúmulo de compostos nitrogenados, como o nitrito (NO_2^-) e a amônia (NH_3) (ARANTES, 2007; WICKINS, 1976), o que implica na diminuição da qualidade da água nos viveiros. No entanto, em sistemas intensivos, as bactérias heterotróficas podem atuar na diminuição dos compostos nitrogenados presentes, incorporando-os na formação de uma biomassa rica em proteínas, além da mineralização destes resíduos tóxicos (ARANTES, 2007; FUHRMAN et al., 1988; WHEELER & KIRCHMAN, 1986), permitindo que haja uma melhoria considerável no cultivo. Ademais, a formação de floculados bacterianos, segundo Burford et al. (2004), proporciona um alimento em potencial ao camarão. No cultivo, apenas 15 a 30 % da alimentação oferecida ao camarão é incorporada em sua biomassa, dessa forma estima-se que 53 a 77 % do incremento do peso dos camarões está relacionado a floculados bacterianos e outros alimentos naturais (ARANTES, 2007).

O grupo das α , β , e γ -proteobactérias está relacionado com a oxidação da amônia a nitrato via nitrito (nitrificação) e seguido pela desnitrificação, que reduz o nitrato a nitrogênio gasoso, vias redutoras do nível de amônia nos tanques de cultivo. As subclasses β , e γ -, da classe Proteobacteria, contém a maior parte das espécies de bactérias nitrificantes, destacando-se os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (OLIVEIRA et al., 2006; BOTHE et al. 2000). Proteobactérias são comumente identificadas em cultivos intensivos heterotróficos como foi constatado por Li et al (2007), onde também observaram uma frequência de 24,6 % de Proteobactérias, sendo pertencentes aos gêneros *Shewanella* sp., *Pantoea* sp., *Aranicola* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio* sp.

Bactérias Vibrioláceas e outros gêneros bacterianos, como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Shewanella* são normalmente encontrados desempenhando papel importante na manutenção do equilíbrio no cultivo. Por outro lado, bactérias do gênero *Vibrio* fazem parte da microbiota natural do camarão e são consideradas os principais patógenos bacterianos causando perda de produção especialmente na larvicultura e engorda (COSTA, 2006). As principais espécies deste gênero, que apresentam risco ao cultivo, são *Vibrio*

vulnificus, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahemolyticus* e *V. harveyi* (COSTA, 2006; LIGHTNER, 1996). Frequentemente as espécies *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* estão associadas à mortalidade (GULLIAN et al., 2004).

No entanto, Dantas et al. (2009) afirmam que a utilização do *Bacillus* spp., como probiótico, pode influenciar na resistência do camarão, quando submetido ao *V. harveyi*. Estudos realizados por Far et al. (2009) com o *L. vannamei*, também relatam aumento da taxa de sobrevivência e rendimento. Resultados semelhantes foram observados com a utilização de *Shewanella algae* com resposta antimicrobiana em várias temperaturas e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, além do antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2008; SHAKIBAZADEH et al., 2012).

2.8 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NO CULTIVO

Os microrganismos que compõem o alimento natural no ambiente de viveiro desempenham papel preponderante no processo de alimentação dos camarões. Por se tratarem de animais com hábito alimentar onívoro, os camarões são extremamente dependentes do alimento natural (MORIARTY, 1997). Microrganismos, como plânctons, bactérias e algas são de grande importância para os sistemas aquícolas, particularmente com respeito à produtividade primária, ciclagem dos nutrientes, nutrição dos animais cultivados, qualidade da água, controle de doenças e do impacto dos efluentes ao meio ambiente (MONTROYA & VELASCO, 2000). Segundo Burford *et al.* (2004), mais de 29 % do alimento consumido por *L. vannamei* pode ser proveniente do floco bacteriano presente no meio heterotrófico.

Partículas floculadas possuem elevados níveis de proteínas, aminoácidos e outros elementos alimentares essenciais, em níveis satisfatórios (TACON et al., 2002; DECAMP et al., 2003; BURFORD et al., 2004). Contêm também vitaminas e minerais em bons níveis, sendo desnecessária a adição destes fatores de crescimento na ração, reduzindo, desta forma, até 30 % os custos destes insumos (CHAMBERLAIN et al., 2001b). Segundo Avnimelech (2006), uma alimentação baseada em microrganismos é de alta qualidade, no entanto, a utilização da proteína microbiana vai depender da habilidade do animal em capturar a bactéria e de digerir a proteína. Desse modo, o estudo da diversidade microbiológica dos viveiros de cultivo dos camarões, além de sua importância para o manejo adequado da qualidade da água, é indispensável para a nutrição do camarão e sua produtividade.

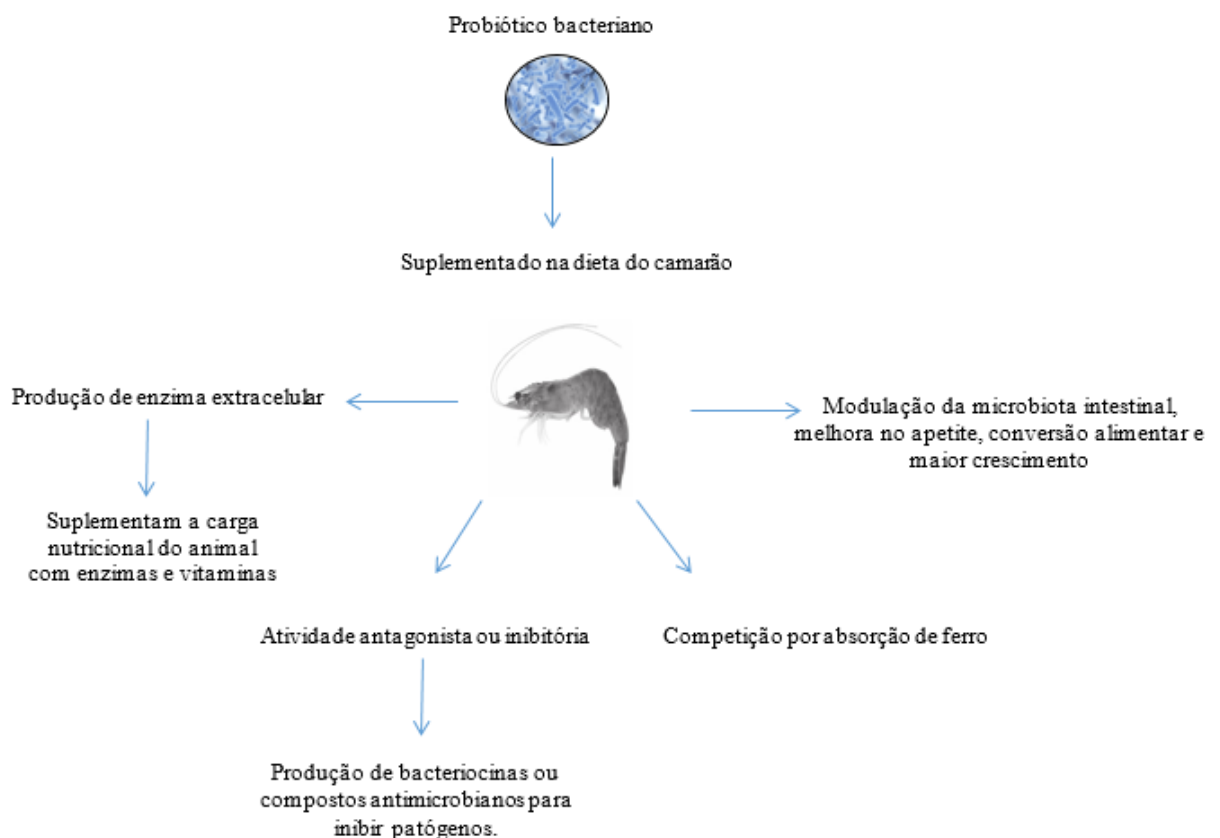
2.9 PROBIÓTICOS NA CARCINICULTURA

O termo Probiótico deriva do Latim e significa “pró-vida” e são microrganismos vivos (bactérias, leveduras e fungos) (BANERJEE & RAY, 2017), que também segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) e World health organization (FAO/WHO) (2001) quando consumidos em condições adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro pela modulação da microbiota intestinal (BALCÁZAR et al., 2006). Lilley e Stillwell (1965) descrevem-nos ainda, como substância secretada por microrganismos que estimula o crescimento de outros.

No entanto, para Moriarty (1999) o termo probiótico tem sido definido como monocultura ou policultura de microrganismos, aplicados a nutrição animal, que afetam positivamente e melhoram a microflora endógena. Ademais, Newaj-Fyzul et al. (2013) consideram probiótico como microrganismos administrados por via oral, promovendo benefícios à saúde, controle de patógenos, principalmente doenças bacterianas.

A origem destes organismos é frequentemente do trato digestivo do animal hospedeiro e o seu modo de ação inclui adesão na mucosa do epitélio intestinal evitando a adesão de patógenos, atividade antagonista ou inibitória com a produção de bacteriocinas ou compostos antimicrobianos para inibir os patógenos, habilidade de produzir enzimas extracelulares que suplementam o estado nutricional do hospedeiro e competir pela absorção de ferro, para que os patógenos tenham deficiência deste composto e seu desenvolvimento seja prejudicado. Probióticos podem também melhorar o apetite e levar a um maior crescimento e melhor conversão alimentar (BANERJEE & RAY, 2017) (figura 7).

Figura 7. Modo de ação dos Probióticos em camarão.



Tem-se observado que a utilização de probiótico é crescente (NAYAK, 2010). Ainda, seriam mais eficazes do que a ingestão de antibióticos (NIMRAT et al., 2012; NINAWA et al., 2009), seja na produção bovina, saúde humana ou fazendas de cultivo de camarão (DANTAS et al., 2009), uma vez que o uso massivo de antibióticos pode ocasionar danos à saúde dos animais, à saúde pública e aumentar a pressão seletiva sobre os microrganismos, promovendo um aumento na resistência bacteriana (CARNEVALI et al., 2016; VERSCHUERE et al., 2000).

A ocorrência de bactérias multirresistentes a antibióticos acentua a busca por alternativas sustentáveis no cultivo (NIMRAT et al., 2012). Recentemente, como alternativa ao uso de antibióticos utilizados no controle de doenças, os probióticos têm atraído bastante atenção na aquicultura. Isto porque os probióticos não agem somente na melhoria da defesa do sistema do hospedeiro, mas também melhorando a qualidade da água, que é essencial ao cultivo, pois auxilia na redução dos níveis de amônia e nitrito na água (BANERJEE & RAY, 2017). Li et al. (1997) afirmaram que a adição de probióticos no cultivo de camarão aumentou a qualidade da água e reduziu a concentração de material tóxico. Adicionalmente, como atestado por Nimrat et al. (2012), a utilização de culturas mistas de *Bacillus* spp., como probióticos, promoveu significativa melhoria no crescimento e na sobrevivência das pós-larvas do *L. vannamei*, aumento na concentração de bactérias não patogênicas e melhoria na qualidade da água aos níveis de pH, amônia e nitrito.

Assim, os probióticos são uma alternativa ao uso de antimicrobianos, possibilitando a produção e comercialização de produtos seguros, saudáveis e com alto valor nutricional. Neste contexto, a bactéria *Shewanella algae* vem sendo proposta como candidata a probiótico, além de ser segura ao consumo humano, sem acarretar prejuízos tanto a consumidores quanto trabalhadores da indústria camareira (SHAKIBAZADEH et al., 2011). Contudo, na carcinicultura as etapas para seleção de probióticos bacterianos incluem coleta de informações sobre o cultivo, aquisição do potencial probiótico, avaliação da competência do futuro probiótico frente a bactérias patogênicas, avaliação da patogenicidade do próprio probiótico, avaliar os efeitos do potencial probiótico no hospedeiro e análise de viabilidade econômica (BALCÁZAR et al., 2006).

2.10 SHEWANELLA ALGAE

O Gênero *Shewanella* é um novo gênero, representante da classe das *Gammaproteobactérias*, ordem *Alteromonales* e família *Shewanellaceae*, compondo um grupo de bactérias gram-negativas, móveis, baciliforme, oxidase positiva, aeróbias não fermentativas e facultativas (KIM et al., 2007; BOWMAN, 2005; GAUTHIER et al., 1995; MACDONELL & COLWELL, 1985; VENKATESWARAN et al., 1999). Cepas de

Shewanella são também conhecidas como bactérias aquáticas, pois são comumente encontradas em ambiente marinho e sedimentos (HAN et al., 2016), mas também podem ser encontradas em ambientes aquáticos poluídos (XU et al., 2005), em ambientes com alta profundidade e abissais (XIAO et al., 2007), em amostras clínicas (BRINK et al., 1995), no trato digestivo de animais (KIM et al., 2011), associado a animais (SATOMI et al., 2006, 2007; SHNIT-ORLAND et al., 2010), em fluidos de campos petrolíferos (SEMPLE & WESTLAKE, 1987) e minas de carvão (XU et al., 2005; SRAVAN KUMAR et al., 2010).

Segundo Yoon et al. (2004), o gênero *Shewanella* também é amplamente conhecido por atuar em várias áreas como biorremediador (HAU & GRALNICK, 2007), por apresentar ação biorremediadora co-metabólica de poluentes orgânicos halogenados (PETROVSKIS et al., 1994), degradação de petróleo bruto (SEMPLE & WESTLAKE, 1987) e redução dissimilatória de manganês e óxidos de ferro (MYERS & NEALSON, 1988), urânio (LOVLEY & PHILLIPS, 1988) e outros compostos (PERRY et al., 1993.; KOSTKA et al., 1996), além da biocatálise na geração de energia (HAU & GRALNICK, 2007).

Shewanella putrefaciens Pdp11, isolada do muco da pele, saudável, do peixe cultivado *Sparus aurata* (CHABRILLÓN et al., 2005), demonstrou efeitos benéficos *in vivo* no cultivo de *Solea Senegalensis* (TAPIA-PANIAGUA et al., 2014). Estes autores também relataram que o probiótico foi capaz de colonizar o intestino dos animais cultivados, compondo a microbiota intestinal, aumentando o crescimento, desempenho e atividades digestivas enzimáticas em Juvenil de *S. senegalensis* (LOBO et al., 2017). Já o probiótico putativo *Shewanella xiamenensis* A-1, combinado a *Aeromonas veronii* A-7 e *Bacillus subtilis* strains administrado oralmente em *Ctenopharyngodon idella*, a carpa-capim, reduziram consideravelmente a abundância de bactérias patogênicas, como *Pseudomonas* e *Flavobacterium* no intestino dos animais cultivados (HAO et al., 2017). Os resultados obtidos sugeriram que a administração de probióticos orais pode melhorar positivamente a composição da comunidade microbiana intestinal na carpa-capim, fato associado à regulação imune nesses animais, além de poder diminuir potencialmente o risco de surtos de doenças durante o estágio de cultivo da carpa-capim (HAO et al., 2017).

A espécie *Shewanella algae* caracteriza-se também por apresentar motilidade através de um flagelo polar, por ser halofílica e crescer entre 10 °C a 40 °C. Ademais, produz gelatinase, lipase e amilase, mas não ADNase, quitinase, ou alginase, além de possuírem conteúdo G+C 54 mol % presente no gene 16S rRNA (SIMIDU et al., 1990). A *S. algae* é comumente isolada do trato digestivo de animais marinhos, principalmente em ambientes de cultivo de peixes e crustáceos. Apresenta modo de ação favorável a sua aplicação como probiótico para carcinicultura e piscicultura, uma vez que suporta variações de pH (entre 2,0 e

7,0), tem habilidade de produzir enzimas extracelulares, e principalmente possui ação antagônica ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2012; INTERAMINENSE et al., 2018) e resposta antimicrobiana em ampla gama de temperatura e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* (SHAKIBAZADEH et al., 2008; KONISHI et al., 2007b).

A afirmação de que *Shewanella* spp. é um gênero patogênico é controversa na literatura. Alguns autores corroboram com a ideia de que infecções por *Shewanella* spp. são um problema significativo à aquicultura e que este gênero é constituído por patógenos naturais (HU et al., 2016; QIN et al., 2014). Contudo, outros pesquisadores sugerem que essas bactérias estão agindo como patógenos oportunistas, ainda, poderiam causar sinais de doença ou mortalidade em peixes com imunidade reduzida (KOZINSKA & PEKALA, 2004; PEKALA et al., 2015).

Em um estudo nenhum sinal clínico, em todas as amostras testadas, foi obtido quando peixes dourados foram infectados experimentalmente com *Shewanella* spp. por aplicação intramuscular (DECOSTERE et al., 1996). Em outro estudo, *S. putrefaciens* foi utilizada com sucesso como um probiótico contra o estresse em fazendas de peixes (CORDERO et al., 2016). Por causa destes diferentes resultados, assumiu-se que a patogenicidade da bactéria pode depender de um isolado específico (JUNG-SCHROERS et al., 2017; PEKALA et al., 2015; DECOSTERE et al., 1996).

2.11 BIOFILME E BIOFLOCO

Com o objetivo de compreender melhor as interações entre o probiótico bacteriano e o hospedeiro, o estudo da dinâmica de formação do biofilme e biofoco é extremamente pertinente. O biofilme bacteriano é uma estrutura resistente e sensível ao ambiente, apresentando estruturas tridimensionais constituídas de células bacterianas capazes de estabelecer uma comunicação através de sinalizações bioquímicas complexas (TEAL, 2008). Já o biofoco são as partículas suspensas na água, composto por microrganismos, responsáveis pela nutrição animal e qualidade da água de cultivo (LARA et al., 2017).

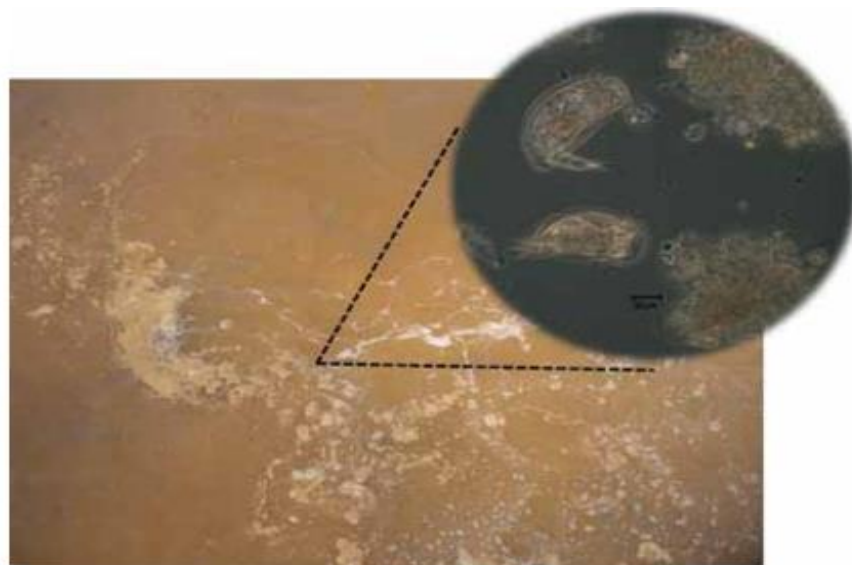
Os biofilmes são formados pela aderência bacteriana à superfície e sucessivas interações com demais bactérias suportadas pela matriz extracelular, que é rica em polissacarídeos e outros componentes (WHITCHURCH et al., 2002; THORMANN et al., 2006). Estudos anteriores, referentes à formação de biofilme em *Shewanella oneidensis*, concluíram, a partir da quantificação de metabólitos, análise por PCR e FISH, que no biofilme ocorre uma estratificação de colônias bacterianas (TEAL et al., 2006; COLE et al., 2004; OKABE et al., 1999). Estes trabalhos demonstraram que existe uma grande heterogeneidade no que diz

respeito à atividade celular e metabólica, consonante à redução da atividade e crescimento próximo do centro do biofilme, onde se espera que as células estejam limitadas nutricionalmente (TEAL et al, 2006; LEQUETTE & GREENBERG, 2005; MAJORS et al, 2005; WERNER et al 2004; YOSHIDA et al, 2002).

A comunidade bacteriana, presente na água e sedimento do cultivo, compondo o bioflocos, interage intimamente acentuando os benefícios ao hospedeiro e reduzindo problemas no cultivo (MORIARTY et al., 2005). Isto porque, esta comunidade bacteriana age na promoção da qualidade da água do cultivo, promovendo um ambiente com maior biossegurança e também evita as altas taxas de troca de água (LARA et al., 2017).

O processo de formação dos bioflocos envolve interações físicas, químicas e biológicas. A agregação do particulado orgânico inicia-se com a adição de fontes de carbono (melaço de cana-de-açúcar, dextrose, farelo de trigo e arroz, e outros) objetivando alterar a relação Carbono:Nitrogênio na água e excitando o crescimento das bactérias heterotróficas (figura 8). O desenvolvimento do sistema é possível quando a relação C:N é mantida próxima a 15-20:1. Todavia, o sistema necessita de grande aporte de oxigênio, possível pela alta aeração no cultivo, acrescida a fontes de carbono, matéria orgânica e outros materiais em suspensão na água. Por sua vez, surgem bactérias secretoras de muco, que contribuem para a agregação e formação dos flocos microbianos, além de protozoários ciliados e flagelados, microalgas, nematoides e rotíferos (WASIELESKY et al., 2013).

Figura 8. Imagem de flocos microbianos obtida em viveiro de cultivo de camarões e em microscópio óptico (detalhe).



Fonte: Revista Visão Agrícola, 2012.

Contudo, o sistema de biofloco precisa de monitoramento constante dos parâmetros de qualidade da água (JHA, 2011), sendo eles, pH, alcalinidade e concentração de CO₂. Isto porque, ocorre uma queda nos níveis de alcalinidade e pH em função do aumento dos sólidos suspensos e, também, um incremento na concentração de CO₂ dissolvido. Ao longo do cultivo os níveis de sólidos suspensos totais aumentam e a comunidade bacteriana heterotrófica passa a ser predominante. Isto pode promover uma atenuação das oscilações diárias nos valores de pH, visto que o processo de fotossíntese é prejudicado pela redução da luminosidade na coluna d’água e turbidez elevada. O nível de alcalinidade igual ou superior a 150mg CaCO₃/L é considerado ideal por muito pesquisadores, no que se refere a produção de camarões marinhos. A manutenção da alcalinidade auxilia no processo de estabilização do pH, mantendo-o acima de 7, o que favorece o crescimento do camarão e do biofloco (WASIELESKY et al., 2013).

O biofloco e seus microrganismos agem ainda, positivamente, na atividade das enzimas digestivas do animal cultivado, bem como favorecendo seu sistema imunológico e habilidade antioxidante, além de aumentar sua resistência contra patógenos (LIU et al., 2017). Foi observado por Xu e Pam (2013) que os animais se desenvolvem, aumentando consideravelmente de tamanho mesmo em alta densidade de estoque, com alta capacidade antioxidante (tabela 1).

Tabela 1. Características principais dos sistemas de cultivo tradicional (semi-intensivo) com o sistema de flocos microbianos (BFT), em viveiros escavados.

SISTEMA DE CULTIVO	DENSIDADE (CAM/M²)	LITROS DE ÁGUA / KILOS DE CAMARÃO	CONVERSÃO ALIMENTAR	SOBREVIVÊNCIA (%)	PRODUTIVIDADE (KG HA ⁻¹)
TRADICIONAL	20-30	65.000	1,5	60-70	6.000
BFT	120	1.000	1,3	80-90	15.000

Fonte: Revista Visão Agrícola, 2012.

Um dos fatores mais importantes no sistema de cultivo heterotrófico, baseado na produção de biofloco, é o ciclo do nitrogênio. Isto se explica pelo fato de que as concentrações de amônia começam a aumentar nos viveiros ou tanques e deve ser feita a fertilização orgânica para estimulação do crescimento de bactérias. Essas bactérias vão fazer com que o ciclo prossiga, transformando a amônia em nitrito e, posteriormente, em nitrato. Assim, a fertilização orgânica promove a redução dos níveis de amônia aproximando-os a valores nulos em 15 a 20 dias de cultivo. Ao passo que a amônia é transformada no sistema,

as concentrações de nitrito elevam-se, e, se as bactérias nitrificantes já estiverem estabelecidas no sistema, o nitrato começa a aparecer, chegando ao final do cultivo como a forma nitrogenada mais abundante (WASIELESKY et al., 2013).

2.12 O GENE 16S rRNA E A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS

O emprego de técnicas moleculares com a finalidade de solucionar problemas taxonômicos e filogenéticos promoveu uma verdadeira revolução aos métodos tradicionais entre as décadas de 80 e 90. A partir de então a resolução destes problemas bacteriológicos passou a ser sanado com o auxílio do gene 16S rRNA (WEISBURG et al., 1991). Estes trechos são bem conservados em bactérias e, portanto, têm sido o fundamento para a revisão das inter-relações entre espécies, gêneros ou até mesmo famílias (OLSEN et al., 1994).

Vários fatores tornam os genes ribossomais aptos à utilização em estudos filogenéticos, como o fato de estarem presentes em todos os organismos vivos, possuírem estruturas secundárias altamente conservadas, abundância nas células, serem facilmente identificados, além de diferenças nas sequências gênicas que evoluem em taxas diferentes (WHITMAN et al, 2012; VANDAMME et al, 1996; WOESE, 1987; 1990).

Os genes que codificam para RNAs ribossômicos são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, uma vez que ocorre nas organelas responsáveis pela síntese proteica. A sequência destes genes corresponde a regiões altamente conservadas (AMANN et al., 1995). Desta forma, estudos têm utilizado o sequenciamento total ou parcial dos genes 16S rRNA e 23S rRNA, bem como regiões intergênicas (IGS), para estudos de filogenia (GURTLE & STANISH, 1996).

O ribossomo procarioto em *Escherichia coli* tem um tamanho de 70S e aproximadamente dois terços dele consiste de rRNA e o restante de proteínas ribossômicas. Assim, as subunidades 50S (contêm o rRNA 16S) e 30S (contêm os rRNAs 5S e 23S) combinadas originam a estrutura 70S (FIGUEIREDO et al., 2010). Contudo, em alguns casos, como nos gêneros *Bradyrhizobium* (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006) e *Burkholderia* (COENEY et al., 2001) variações no gene 16S rRNA são muito baixas, o que torna difícil a identificação precisa ao nível de espécie. A isto, adiciona-se o fato de que em procariotos ocorre frequentemente o fenômeno conhecido como transferência horizontal de genes, gerando genomas extremamente dinâmicos (FIGUEIREDO et al., 2010; GEVERS et al., 2005).

Com a necessidade da identificação rápida e eficiente das bactérias presentes na carcinicultura, a técnica citogenética de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utiliza sondas

de DNA marcadas com fluorescência, e mostra-se eficaz na identificação e enumeração específicas de bactérias, dispondo-se como uma ferramenta poderosa, tanto para cultura mista quanto ambiental, combinando microscopia e discriminação filogenética molecular (SALSA et al, 2010). Esta técnica apresenta uma grande vantagem que é a ausência da necessidade de cultura bacteriana, uma vez que o procedimento é realizado com material fresco (WAAR et al, 2005).

2.13 FILOGENIA E BIOINFORMÁTICA APLICADA À BACTERIOLOGIA

2.13.1 Filogenia

Inicialmente usada para elucidar relações hierárquicas, a filogenética se expandiu, sendo hoje utilizada para diferentes propósitos, como criar novos grupos taxonômicos, reconstruir filogenias de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas (Biogeografia histórica), investigar a evolução de espécies que interagem entre si (hospedeiros e parasitas ou simbioses) e compreender melhor a dinâmica populacional (AVISE et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2007).

Contudo, os métodos filogenéticos comumente utilizados não contam com hibridizações ou transferências genéticas horizontais por intermédio de vetores microbianos, evento muito comum em bactérias, uma vez que a especiação é completa (STEARNS & HOEKSTRA, 2003). Assim, dentre os principais obstáculos referentes aos estudos filogenéticos estão as taxas desiguais de evolução e a evolução convergente. No entanto, estes problemas vêm sendo minimizados a partir de análises especializadas e personalizadas para cada caso (FUTUYMA, 2003).

Alguns dos papéis cruciais da sistemática são classificar e descrever a história evolutiva dos organismos estudados. Segundo a hierarquia Lineliana, estes organismos são classificados de acordo com sua espécie, gênero, família, ordem, classe, filo e reino. Estas categorias taxonômicas denominadas de táxons (FUTUYMA, 2003), também podem ser descritas como OTUs (Operational Taxonomic Units) que, graficamente, em uma árvore filogenética, correspondem aos pontos (nós) ligados por linhas (ramos).

As árvores filogenéticas podem ser construídas a partir de caracteres discretos, qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança), como também por dados quantitativos (métodos de distância), podendo ou não ser enraizado. Contudo, o enraizamento permite a aplicação de conceitos de traços ancestrais ou plesiomorficos e traços derivados ou apomórficos (STEARNS & HOEKSTRA, 2003).

Para realizar uma reconstrução filogenética, as sequências, primeiramente, têm de apresentar ancestralidade em comum, homologia. Dentre os três tipos de homologia, a ortologia é observada quando as sequências têm um único e mesmo ancestral comum. Por outro lado, na paralogia origina-se de uma duplicação gênica e a xenologia quando se originam por incursão lateral (ou horizontal). Porém, apenas sequências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas dos organismos.

2.13.2 Bioinformática

O conceito de bioinformática pode ser sintetizado como a utilização de técnicas advindas da matemática, estatística e computação para a análise de problemas de biologia. A biologia computacional é tradicionalmente concentrada em duas questões básicas: Onde estão os genes e quais são suas funções? Na verdade, estas perguntas podem ser entendidas como uma tentativa de reproduzir *in silico* a maquinaria genético-molecular da célula (HAUBOLD & WIEHE, 2006).

A partir do crescimento e popularização do sequenciamento de DNA de genes até genomas foi necessário uma evolução conjunta dos bancos de dados genômicos. Atualmente existem diversos bancos de dados públicos disponíveis para pesquisa, dentre eles o GenBank (banco americano de DNA e proteínas), EBI (Banco de dados europeu de sequências de DNA), DDBJ (Banco japonês de DNA), PDB (Banco de dados oficial do genoma humano), TIGR Databases (Banco de dados de diversos organismos), PIR (Banco de proteínas anotadas), SWISS-PROT (Banco de dados de proteínas), INTERPRO (Banco de dados de proteínas) e KEGG (Banco de dados genômicos e relações com vias metabólicas) (PROSDOCIMI, et al. 2002).

Com o advento da técnica de Sanger (1980) o sequenciamento de trechos de DNA começou a popularizar-se no meio acadêmico. A técnica consiste da adição de didesoxirribonucleotídeos, que param o crescimento dos fragmentos de DNA na replicação. Posteriormente outras técnicas como o Pirosequenciamento, desenvolvido pela Roche Applied Sciences, apostam na captura de emissões de luz causadas pela enzima luciferase. Esta enzima, por sua vez, encontra-se acoplada à amplificação previamente fragmentada e aderida a microesferas, utilizando sequências adaptadoras (MARGULIES, et al. 2005).

O alinhamento de sequências possui várias aplicações na bioinformática, esta operação é considerada uma das mais importantes na área. Um alinhamento múltiplo é uma hipótese de homologia posicional entre bases ou aminoácidos de genes ou proteínas de duas ou mais espécies. Existem dois tipos de alinhamento, o global, na qual as sequências são alinhadas de

um extremo a outro do alinhamento originando apenas um resultado, e o local, na qual se procura alinhar as regiões mais conservadas independente da localização (PROSDOCIMI et al., 2002).

Os métodos de distância, também conhecidos como métodos fenéticos, possuem diferenças entre duas sequências que são reduzidas a uma só variável. Neste caso, o número de diferenças não será relevante às suas relações filogenéticas (HAUBOLD & WIEHE, 2006). Existem diferentes modelos que podem ser utilizados para a construção de uma matriz de distância, como Distância P, Distância de Jukes-Cantor, Distância de Tajima e Nei, Distância Gama e muitos outros (PROSDOCIMI et al., 2002). A partir dessas matrizes pode ser reconstruída a árvore com os algoritmos UPGMA, Evolução Mínima e *Neighbor-Joining* (NJ), os mais conhecidos e utilizados em análises fenéticas (PROSDOCIMI et al., 2002).

Partindo do princípio que a árvore é aditiva e ultramétrica, o método UPGMA assume que todos os táxons são igualmente distantes da raiz, embora seja improvável. Por esta e outras razões, o UPGMA é raramente utilizado atualmente. O método de *Neighbor-Joining* (NJ) é similar ao UPGMA na medida em que manipula uma matriz de distância, reduzindo seu tamanho a cada etapa e depois construindo a árvore baseada no conjunto de matrizes geradas. A principal diferença entre os dois métodos é que o NJ não forma agrupamentos, mas calcula diretamente as distâncias aos nós internos. Vale ressaltar que, ao contrário do UPGMA, o NJ não assume que todos os táxons são equidistantes da raiz (HAUBOLD & WIEHE, 2006). No método de ME, as medidas corretas das distâncias para múltiplos acessos nos mesmos locais são utilizadas. A topologia mostra o menor valor da soma de todos os ramos (S), que é escolhido como uma estimativa da árvore correta (TAMURA, et al. 2013).

Também existem métodos cladísticos, baseados em algoritmos heurísticos, para avaliar relações filogenéticas. Dentre eles a Máxima Parcimônia parte do princípio de que a melhor hipótese para explicar um processo é aquela que requer o menor número de passos (PROSDOCIMI, et al. 2002). O método é baseado no princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque essa foi herdada do último ancestral comum a ambos. Por sua vez, o método da Máxima Verossimilhança baseia-se na reconstrução filogenética através da busca por uma árvore que maximize a probabilidade dos dados observados. Portanto, encontrar a árvore mais verossímil envolve não somente a análise das topologias possíveis, mas também das variações de comprimento de ramos para cada topologia (HAUBOLD & WIEHE, 2006).

A Inferência Bayesiana realiza uma análise de regressão baseada em probabilidades futuras, a partir de tendências identificadas. Esta apresenta várias vantagens comparadas a outros métodos filogenéticos de inferência, destacando-se pela fácil interpretação de

resultados, capacidade de incorporar a análise e informações prévias, além de algumas vantagens computacionais. Existem vários softwares capazes de realizar a Inferência Bayesiana, dentre os mais comuns pode-se destacar o PAUP e o MrBAYES, onde este último utiliza o Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para prever tendências nas árvores filogenéticas (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001).

3 ARTIGO 1 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS EM SISTEMA DE CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *LITOPENAEUS VANNAMEI*

O artigo será submetido à publicação. O Artigo será submetido a revista African Journal of Microbiology Research, ISSN: 1996-0808, fator de impacto 0,9 e Qualis Capes B4.



Rogério William Santos Portela¹, Carolina Kropniczki Gouveia¹, Eidy Simões de Souza², Lourinaldo B. Cavalcanti³, Márcia do Vale Barreto Figueiredo³, Márcia Vanusa da Silva⁴, José de Paula Oliveira³, Ranilson de Souza Bezerra⁴.

¹Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA - Bolsista CNPq/CAPES, Laboratório de Biologia do Solo — Av. General San Martin, 1371 - Recife - PE - CEP: 50761-000, E-mails: portela.gene@gmail.com, carolkrop@yahoo.com.br ²EMATER – PB – BR 230, Km 13 – Estrada de Cabedelo – PB, CEP: 58310-000. E.mail eidysimoes@yahoo.com.br, ³Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA - Departamento de Pesquisa, Av. General San Martin, 1371 - Recife - PE - CEP: 50761-000, E-mails: jose.paula@ipa.br, lourinaldo.cavalcante@ipa.br, Marcia.figueiredo@ipa.br, ⁴Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, E.mail: marcia.vanusa@ufpe.br

Resumo

No cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema intensivo heterotrófico é crucial entender o papel dos microrganismos presentes no sistema, com o intuito de favorecer o desempenho de bactérias benéficas ao sistema e reduzir a concentração de bactérias patogênicas. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar microrganismos presentes na água e no trato digestivo do camarão *L. vannamei* cultivado em sistema heterotrófico. Foram isoladas 22 cepas bacterianas no meio TCBS. Os DNAs das cepas foram extraídos, quantificados e identificados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparação ao *GenBank* – NCBI e RDP - *Seqmath*. Posteriormente, para o agrupamento, utilizaram-se os iniciadores REP, ERIC e BOX-PCR. Os amplicons apresentaram tamanho específico entre 325 a 438 pb. Foram submetidas 22 sequências e 10 apresentaram identidade com o GenBank. Todos os isolados identificados como gênero *Vibrio*, no GenBank ou no *Seqmath*, foram localizados apenas na água de cultivo. O agrupamento realizado com o REP, ERIC e BOX-PCR apresentou similaridade de 59 % distribuídos em quatro grupos. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu identificar gêneros como *Bacillus*, *Vibrio* e *Shewanella*.

Palavras-chave: *Vibrio*; *Bacillus*; *Shewanella*; probiótico; 16S rRNA.

Abstract

In the cultivation of *Litopenaeus vannamei* in an intensive heterotrophic system it is crucial to understand the role of the microorganisms present in the system. In order to favor the performance beneficial bacteria to the system and reduce the concentration of pathogenic bacteria. This work aimed to isolate and identify microorganisms present in water and in the digestive tract of the shrimp *L. vannamei* cultured in heterotrophic system. 22 Bacterial strains were isolated on TCBS medium. The DNAs of the strains were extracted, quantified and identified by partial sequencing of the 16S rRNA and compared to GenBank - NCBI and RDP - *Seqmath*. Afterwards, the *primers* REP, ERIC and BOX-PCR were used for the grouping. The specific size of amplicons showed 325 to 438 bp. 22 sequences were “blasted” and 10 samples showed identity with GenBank. All isolates identified as *Vibrio* genus, in GenBank or *Seqmath*, were found growing only in the water. The grouping performed with the REP, ERIC and BOX-PCR showed similarity of 59% distributed into four groups. The partial sequencing of the 16S rRNA identified as *Bacillus* genera, *Vibrio* and *Shewanella*. It was suitable for identifying any of the isolates.

Keywords: *Vibrio*; *Bacillus*; *Shewanella*; probiotic; 16S rRNA.

INTRODUÇÃO

O sistema intensivo heterotrófico é um sistema fechado, onde não ocorre renovação de água, aplicação de probióticos e alta taxa de aeração e uso de rações com baixa concentração de proteínas, sendo, portanto, considerado o mais viável economicamente e também mais vantajoso ao meio ambiente (MORENO-FIGUEROA et al, 2018; BOYD & CLAY, 2002). Contudo, em razão da redução nas taxas de renovação de água, este sistema pode apresentar uma grande quantidade de compostos nitrogenados, como o nitrito (NO_2^-) e a amônia (NH_3), devido à diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido (ARANTES, 2007; WICKINS, 1976).

No entanto, as bactérias heterotróficas, naturalmente encontradas no sistema, podem atuar na diminuição dos compostos nitrogenados presentes, que seriam incorporados por estes organismos gerando biomassa e mineralização destes resíduos tóxicos (ARANTES, 2007; FUHRMAN et al., 1988; WHEELER; KIRCHMAN, 1986). Adicionalmente, a formação de floculados bacterianos, segundo Burford et al. (2004), proporciona um alimento em potencial ao camarão, onde estes floculados, abundantemente nestes sistemas, podem contribuir substancialmente para nutrição do *Litopenaeus vannamei*, em até 53 % a 77 % do incremento do peso dos camarões (ARANTES, 2007). Estes microrganismos, que além das bactérias incluem-se também os plânctons e algas, são igualmente importantes para os sistemas aquícolas, pois também favorecem o controle de doenças e do impacto dos efluentes ao meio ambiente (LLARIO et al, 2018; MONTROYA & VELASCO, 2000).

Neste cenário, é fundamental a identificação da microbiota presente no sistema para a compreensão das interações ecológicas dentro do cultivo. Para tanto, são utilizadas técnicas moleculares, como sequenciamento parcial ou total do gene 16S rRNA, região considerada conservada entre as bactérias, amplamente utilizadas para identificação de microrganismos. Esta técnica é responsável por grandes avanços na biologia molecular, pois permite a elucidação de uma quantidade favorável de informações para revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WEISBURG et al., 1991). Os estudos de filogenia também se beneficiaram pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que permite a amplificação de sequências definidas do DNA (SAIKI et al., 1988), o que facilitou as análises da molécula do 16S rRNA (YANAGI & YAMASATO, 1993).

A técnica do sequenciamento de genes, porém, exige um investimento inicial elevado e, desse modo, relações genéticas entre as estirpes têm sido investigadas com outras técnicas, como a utilização dos inicializadores ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence) (HULTON; HIGGINS; SHARP, 1991), REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (STERM et al., 1984) e BOX-PCR (BOX element) (MARTIN et al., 1992). Estas técnicas são

utilizadas por seu alto padrão polimórfico em bactérias para as devidas análises de agrupamento descrito por Versalovic (1994).

As informações obtidas sobre os microrganismos presentes no cultivo, a partir dos testes citados, são de grande relevância para o desenvolvimento do animal cultivado, para a redução dos custos empregados no sistema e para a diminuição do ônus ambiental resultante desta atividade. Portanto, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar microrganismos presentes na água e no trato digestivo do camarão *L. vannamei* em sistema de cultivo heterotrófico, a fim de avaliar a diversidade genética de bactérias do cultivo em meio de cultura específico (TCBS).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e isolamento de bactérias

As amostras de água do cultivo e do trato digestivo dos camarões marinhos *L. vannamei* foram coletadas em experimentos de cultivo heterotrófico realizado na Base de Piscicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no qual se investigou o efeito da adição de melaço em diferentes relações C:N sobre a qualidade da água e desempenho de crescimento do camarão *Litopenaeus vannamei*, na fase berçário. Não foi utilizada renovação de água. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro réplicas.

Dentre os três tratamentos, dois foram realizados com aplicação diária de melaço nas relações C:N 25:1 (25 M) e 15:1 (15 M), e um controle sem aplicação desta fonte de carbono. Doze tanques em fibra de vidro (800 L de volume útil) foram utilizados, abastecidos com 6,25 pós-larvas/L (peso médio < 0,01 g), totalizando 5000 pós-larvas/tanque. A alimentação ofertada possuía ração comercial contendo 40 % de proteína bruta ofertada diariamente às 8, 11, 14 e 17h, numa taxa de alimentação variando de 50 a 15 % da biomassa, do início ao final do cultivo.

O isolamento das bactérias foi realizado no Laboratório de Biologia do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. As amostras de água do cultivo e do trato digestivo dos camarões *L. vannamei* foram diluídas em 9 mL de solução salina (NaCl, 8,5 g L⁻¹). A partir da diluição 10⁻¹ foram realizadas diluições seriadas incubadas em placas de Petri contendo meio TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) (KOBAYASHI, 1963) e em seguida incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C, por 5 dias. Decorrido esse período, as colônias foram purificadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar) (COSTA, 2006) e armazenadas

para ser realizada a identificação através de análise molecular. Para a caracterização molecular foram inoculadas 22 cepas em meio TCBS por 24 horas, de acordo com a seguinte identificação: colônias de 1 ao 17 (isoladas da água) e do 18 ao 22 (isoladas do intestino dos camarões).

Extração e purificação do DNA

A extração de DNA seguiu a metodologia de Grangel (2005). O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 1X pH 8,0, a 76V durante 1 h, com marcador de massa molecular conhecida (*Low DNA mass Ladder* – INVITROGEN), corado com Syber Gold (INVITROGEN), visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado (Loccus L-PIX HE).

Análise parcial do gene 16S rRNA

Para amplificação do gene ribossomal 16S rRNA foram utilizados oligonucleotídeos universais para o domínio bactéria Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y2 (5'- CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'), segundo Young (1991). As reações foram realizadas para um volume de 25 µL, nas seguintes condições: 2,5 µL de tampão PCR 10X, 1,2 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL dNTP (2 mM), 0,5 µM de cada *primer* (10 µM), 0,4 µL de *Taq* DNA polimerase (5U µL⁻¹, INVITROGEN), 3 µL de DNA (10 ng/µL) e volume à completar 25 µL com água ultrapura autoclavada. A amplificação em termociclador (BIOMETRA - Tgradient 96) foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min.; 30 ciclos de 45 s a 93 °C, 45 seg a 65 °C, 2 min. a 72 °C; seguida de extensão final de 3 min. a 72 °C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados com marcador “100 pb DNA Ladder” (INVITROGEN) em gel de agarose 1,2 % (p/v) e purificados segundo a metodologia empregada por Lyra (2001).

Análise de agrupamento

Para a análise de agrupamento, dos isolados em meio TCBS, foram feitas as amplificações com os *primers* REP (1R-I 5'IIICGICGICATCIGGC 3' e 2R 5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3'), ERIC (1R 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC3' e 2R 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') e BOX (A1R 5'CTACGCCAAGGCGACGCCTGACG3'), para as devidas análises de grupamento

(VERSALOVIC *et al.*, 1994). As reações foram realizadas em volumes de 25 µL por reação. Cada mistura de reação continha 2,5 µL de tampão 10X PCR, 1,2 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µL de dNTP mix (10mM), 2 µL de *primer* (10 µM), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5U mL⁻¹, INVITROGEN), 2 µL de DNA molde (10 ng/µL) e fez-se o volume final de 25 µL utilizando água ultrapura autoclavada.

As amplificações foram realizadas em termociclador (BIOMETRA - Tgradient 96) nas seguintes condições: ciclo inicial a 95 °C por 7 min para ERIC e BOX e 6 min para *primer* REP; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min para os *primers* REP, ERIC e BOX; anelamento a 65, 52, e 55 °C por 1 min com os *primers* REP, ERIC e BOX, respectivamente; e extensão a 65 °C por 8 min com ERIC e REP, 72 °C com BOX; ciclo final a 65 °C, 68 °C e 72°C, respectivamente REP, ERIC e BOX a 16 min.

O amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1,5 %, com o auxílio do 100pb ladder (Invitrogen) na avaliação do tamanho dos fragmentos. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias (BUSSABE *et al.*, 1990) construída através do programa UPGMA (“Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean”), utilizando o coeficiente de Jaccard, e representados graficamente por um dendograma (NTSYS-pc, versão 1.8, Exeter Software, USA).

Sequenciamento e análise das sequências

Para o sequenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, os produtos purificados de PCR de cada bactéria foram determinados em um sequenciador ABI PRISM 377 da Applied Biosystems pertencente ao laboratório de sequenciamento de DNA do CENAGEM/EMBRAPA - Brasília. O Kit de sequenciamento utilizado foi o “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems).

As sequências foram avaliadas levando em consideração o tamanho (≥ 250 pb), editadas e submetidas ao GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL, 1997), disponível online no web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Ainda, as sequências submetidas foram selecionadas segundo o “Score” > 120 e “eValue” < -10. As sequências foram submetidas à análise pelo programa *Seqmatch* - disponível no site RDP (*Ribosomal Database Project* - <http://rdp.cme.msu.edu>). O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa Mega4 (TAMURA *et al.*, 2007), utilizando-se a matriz ClustalW (1.6) (THOMPSON *et al.*, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os amplicons apresentaram tamanho específico entre 325 a 438 pb, equivalente ao trecho entre os nucleotídeos 20 a 361 do gene *rrsB* de *Escherichia coli*. Foram sequenciados 22 isolados com os *primers* Y1 (*Forward*) e Y2 (*Reverse*), num total de 44 fragmentos parciais do gene 16S rRNA. Após sequenciamento, o BLASTn apontou acessos com tamanho ≥ 250 e PHRED ≥ 30 (Tabela 1).

Dentre os isolados bacterianos enquadrados nesta análise, as bactérias 1TCBS, 2TCBS, 3TCBS, 4TCBS, 5TCBS, 6TCBS, 8TCBS, 9TCBS, 10TCBS, 12TCBS, 15TCBS, 16TCBS, 17TCBS, 18TCBS, 19TCBS e 21TCBS foram comparadas aos bancos de dados GenBank (NCBI – Blastn) e RDP (*Seqmath*). O NCBI – Blastn aponta homologia como: 6TCBS – *Bacillus subtilis*, 8TCBS – *Vibrio sp.*, o 10TCBS – *Vibrio parahaemolyticus*, 9TCBS - 12TCBS - *Vibrio sp.*, 16TCBS – *Vibrio alginolyticus*, 17TCBS -*Vibrio sp.*, 18TCBS - *Shewanella sp.* e 21TCBS – *Shewanella algae*, estes referentes a acessos de maior pontuação (Tabela 1).

Os resultados obtidos através do programa online RDP - *seqmath*: isolados 12TCBS e 21TCBS foram identificados como Proteobacteria; isolados 3TCBS, 8TCBS, 10TCBS, 16TCBS e 17TCBS apresentaram identidade com *Vibrio sp.*; O 6TCBS foi identificado como *Bacillus sp.* e o 18TCBS como *Shewanella sp.*. Todos os isolados identificados como gênero *Vibrio*, no GenBank ou no *Seqmath*, foram localizados na água de cultivo. Nenhum víbrio foi identificado no trato digestivo dos camarões.

Tabela 1: Cepas identificadas a partir de inferências ao GenBank (NCBI-BLASTn).

Isolados	Organismo mais relacionado	Score	Valor E	Identidade %	Tamanho do Fragmento	Acesso GenBank
3TCBS*	Bactéria desconhecida	504	2,00E-139	98	426	FN823361.1
6TCBS*	<i>Bacillus subtilis</i>	390	2,00E-105	92	353	EU871706.1
8TCBS*	<i>Vibrio sp.</i>	480	6,00E-123	97	438	AJ316191.1
9TCBS*	Bactéria Vibrionaceae	444	1,00E-121	95	320	FJ178084.1
10TCBS*	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	356	5,00E-95	89	370	AF388390.1
12TCBS*	<i>Vibrio sp.</i>	282	8,00E-73	84	346	FJ357678.1
16TCBS*	<i>Vibrio alginolyticus</i>	416	6,00E-113	94	368	EF542800.1
17TCBS*	<i>Vibrio sp.</i>	508	1,00E-140	96	325	EU413955.1
18TCBS**	<i>Shewanella sp.</i>	443	4,00E-121	94	328	EU252498.1
21TCBS**	<i>Shewanella algae</i>	284	3,00E-73	84	385	FJ969269.1

*Isolados presentes na água do cultivo e ** isolados do trato digestivo do camarão.

Os resultados obtidos através da análise de agrupamento realizado com os *primers* REP, ERIC e BOX apontam uma similaridade entre 10 % a 59 % distribuídos em quatro

grupos distintos. Grupo 1: 3TCBS, 9TCBS, 8TCBS, 16TCBS, e 17TCBS; Grupo 2: 18TCBS e 21TCBS; Grupo 3: 6TCBS; e Grupo 4: 10TCBS e 12TCBS;

As cepas 3TCBS, 8TCBS, 9TCBS, 16TCBS, e 17TCBS identificadas, respectivamente, como Bactéria desconhecida (RDP-Seqmath: *Vibrio* sp.), *Vibrio* sp., Vibrionaceae (RDP-Seqmath: *Vibrio* sp.), *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio* sp., compõem um grupo mais apomórfico (Figura 1). Os isolados 18TCBS e 21TCBS, pertencentes ao segundo grupo, identificado como *Shewanella* sp. e *Shewanella algae* (RDP-Seqmath: Proteobacteria) compõem um grupo mais conservado apresentando variações pontuais mínimas. O isolado 6TCBS que apresenta alta homologia a espécie *Bacillus subtilis* e compõe o terceiro grupo. Os isolados 10TCBS e 12TCBS, respectivamente *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio* sp. constituem um quarto grupo mais plesiomórfico (Figura 1).

No que se refere à identificação de todos os isolados, Val-Moraes et al. (2009) obtiveram frequências de bactérias não similares a acessos do GenBank, em torno de 50 %, dados semelhantes aos constatados no presente trabalho, além de bactérias homólogas a *environmental samples* não homólogas a nenhum filo bacteriano específico. Este resultado foi compatível com as análises realizadas. Um resultado similar a este foi obtido por Val-Moraes (2009), onde 45,45 % dos isolados foram homólogos a acessos do GenBank e RDP (Seqmath), ao nível de gênero.

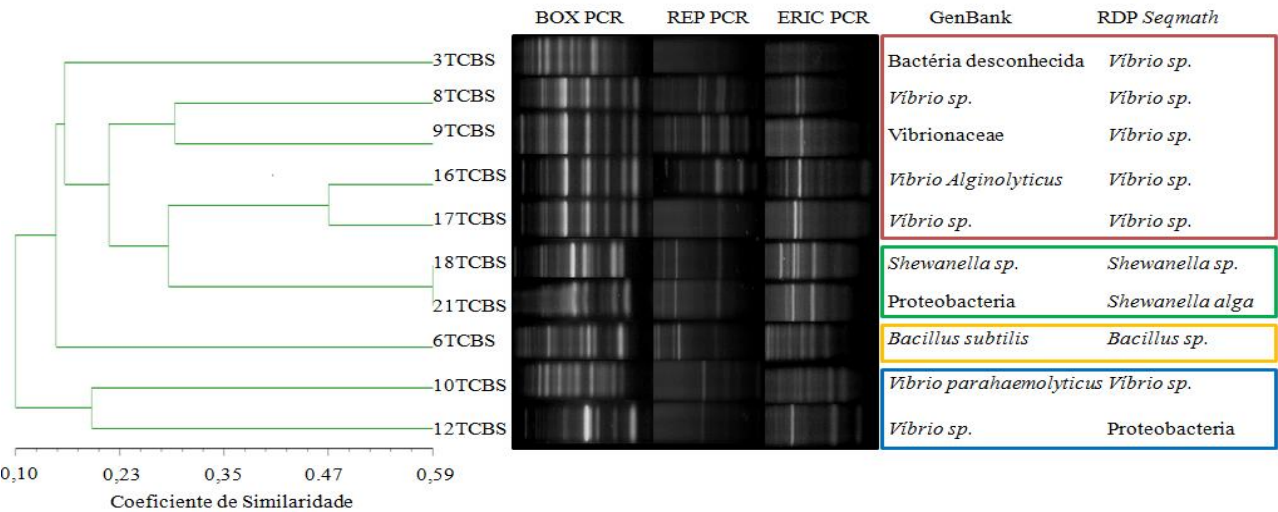
Os melhores resultados foram obtidos com o *primer* BOX, sendo altamente discriminativo e compatível aos resultados do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Em seu trabalho, Maluping et al. (2005) propõem que as amplificações com REP e ERIC-PCR não promovem a formação de agrupamentos genéticos bem definidos. Constatação que pôde ser observado neste trabalho, uma vez que os agrupamentos apontam grupos parafiléticos de víbrios. Visto que o isolado 6TCBS homólogo a *Bacillus subtilis* deveria comportar-se como grupo externo e os grupos 1 e 4 deveriam ter formado um único grupo de bactérias vibrionáceas. Contudo, as amplificações com REP e ERIC-PCR podem ser úteis no acompanhamento de surtos ocasionais de cepas bacterianas (MALUPING et al., 2005), assim como observado por Versalovic et al. (1991), bactérias Gram-negativas apresentam maior afinidade de hibridização dos oligonucleotídeos REP e ERIC.

Dentro dos resultados obtidos, observa-se que as bactérias Vibrionáceas foram as mais bem representadas, dentro do cultivo. Costa (2006) adverte que altas concentrações do gênero *Vibrio* presentes no cultivo indicam risco em potencial à cultura em casos de debilidade do sistema imune, seja por fatores ambientais ou, segundo Mendes (2009), tempo excessivo de cultivo. Frequentemente as espécies *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* estão associadas à mortalidade (GULLIAN et al., 2004).

Entretanto nenhuma bactéria isolada do trato digestivo do camarão obteve homologia com o gênero *Vibrio* sp. Segundo Balcázar et al. (2006) isolados de *V. alginolyticus* têm sido utilizados para o aumento da sobrevivência e crescimento do camarão branco *L. vannamei*.

Bactérias Vibrioláceas e outros gêneros bacterianos, como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Shewanella* são normalmente encontrados desempenhando papel importante na manutenção do equilíbrio no cultivo. Por outro lado, bactérias do gênero *Vibrio* fazem parte da microbiota natural do camarão e são considerados os principais patógenos bacterianos, causando perda ao cultivo (DASH et al., 2017). As principais espécies deste gênero que apresentam risco ao cultivo são *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* (COSTA, 2006).

Figura 1. Dendrograma construído através do programa UPGMA e coeficiente de Jaccard (NTSYS-pc, versão 1.8, Exeter Software, USA), utilizando-se os *primers* BOX, ERIC, REP-PCR e tabela comparativa entre GenBank-NCBI E RDP-Seqmach referente aos 22 isolados presentes na água de cultivo (1-17) e no trato digestivo (18-22) do camarão *L. vannamei*, cultivado em sistema intensivo heterotrófico. Destacado em vermelho grupo 1, verde grupo 2, amarelo grupo 3 e azul grupo 4.



Proteobacterias foram identificadas por Li et al. (2007) com frequência de 24,6 %, sendo pertencentes aos gêneros, *Vibrio* sp., *Pantoea* sp. *Aranicola* sp., *Pseudomonas* sp. e *Shewanella* sp. Os isolados 18TCBS e 21TCBS, ambos encontrados no trato digestivo do camarão são identificados no GenBank, como respectivamente *Shewanella* sp. e *S. algae*. Estudos realizados por Shakibazadeh et al. (2008) apontam *S. algae* com ação antimicrobiana em ampla gama de temperatura e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, ambos identificados na água de cultivo deste trabalho. Por fim, o 21TCBS identificado como *Shewanella algae*, apresenta altíssima similaridade a 18TCBS, ambos presentes no trato digestivo dos camarões (Figura 1).

No entanto, Dantas et al. (2009) afirmam que a utilização do *Bacillus spp.*, como probiótico, pode influenciar na resistência do camarão, quando submetido ao *V. harveyi*. Estudos realizados por Far et al. (2009) com o *L. vannamei*, também relatam aumento da taxa de sobrevivência e rendimento. Resultados semelhantes foram observados com a utilização de *Shewanella algae*, com resposta antimicrobiana em várias temperaturas e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, além do antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2008; SHAKIBAZADEH et al., 2012).

Shewanella putrefaciens Pdp11, isolada do muco da pele, saudável, do peixe cultivado *Sparus aurata* (CHABRILLÓN et al., 2005), demonstrou efeitos benéficos in vivo no cultivo de *Solea Senegalensis* (TAPIA-PANIAGUA et al., 2014). Estes autores também relataram que o probiótico foi capaz de colonizar o intestino dos animais cultivados, compondo a microbiota intestinal, aumentando o crescimento, desempenho e atividades digestivas enzimáticas em Juvenil de *S. senegalensis* (LOBO et al., 2017).

Já o probiótico putativo *Shewanella xiamenensis* A-1, combinado a *Aeromonas veronii* A-7 e *Bacillus subtilis* administrado oralmente em *Ctenopharyngodon idella*, a Carpa-capim, reduziram consideravelmente a abundância de bactérias patogênicas como *Pseudomonas* e *Flavobacterium* no intestino dos animais cultivados (HAO et al, 2017).

Os resultados obtidos sugeriram que a administração de probióticos orais pode melhorar positivamente a composição da comunidade microbiana intestinal na Carpa-capim, fato associado à regulação imune nesses animais. A alteração induzida por probióticos da microbiota pode diminuir potencialmente o risco de surtos de doenças durante o estágio de cultivo da Carpa-capim (HAO et al., 2017).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio e incentivo financeiro provindos da Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA.

**4 ARTIGO 2 - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS
SHEWANELLA ALGAE ISOLADAS DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE
LITOPENAEUS VANNAMEI (BOONE, 1931)**

O manuscrito será submetido à publicação para a “Aquaculture” (ISSN: 0044-8486) com fator de impacto 2,552 e classificação B1 pela CAPES 2012.



Rogério William Santos Portela^{a,b}, Carolina Kropniczki Gouveia^{a,b}, Arthur Lira Gabriel^b, José de Paula Oliveira^b, Márcia Vanusa da Silva^c, Ranilson de Souza Bezerra^a

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil. ^bInstituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Laboratório de Biologia do Solo e Laboratório de Genoma, Bongi, 50761-000, Recife-PE, Brasil. ^cUniversidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Bioquímica e Biofísica, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Corresponding author:

Ranilson Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

E-mail: ransoube@uol.com.br

RESUMO

A *Shewanella algae* é uma bactéria comumente isolada do trato digestivo de animais marinhos, principalmente em ambientes de cultivo de peixes e crustáceos. Esta bactéria apresenta ação lipolítica, proteolítica, amilolítica e antagonismo a bactérias patogênicas, características de um potencial probiótico para carcinicultura e piscicultura. Este estudo teve por objetivo identificar potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracterizá-las através de análises morfológicas, bioquímicas, produção de biofilme e antibiograma. A partir do cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* foram selecionadas as cepas IPA-S.111 e IPA-S.252 para identificação através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparados ao *GenBank* – NCBI e RDP - *Seqmatch*. As cepas foram alinhadas a 45 espécies do gênero *Shewanella* e avaliadas filogeneticamente utilizando os métodos *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Quanto às análises morfológicas foram avaliados parâmetros de acordo com a similaridade a padrões estabelecidos. Os testes bioquímicos foram realizados com o auxílio dos kits BACTRAY (Labroclin®). Foram realizados ainda a avaliação da capacidade de formação de biofilme e o antibiograma das cepas bacterianas. O sequenciamento das cepas revelou alta similaridade a espécie *Shewanella algae*, utilizando o GenBank e o RDP-*Seqmath*. A Inferência Bayesiana apresentou maior aporte estatístico e fidelidade dentre os métodos analisados. A *Shewanella upenei* apresentou alta similaridade as cepas estudadas, assim como a *S. algae*. As cepas estudadas foram sensíveis aos antibióticos Clorafenicol (30 µg), Amicacina (30 µg), Ampicilina/Sulbactam* (10 µg), Ofloxacina (5 µg), Azitromicina (15 µg) e Tetraciclina (30 µg). Portanto, a capacidade de formação de biofilme, adicionada ao alto potencial enzimático, característico do gênero *Shewanella*, tornam estas cepas potenciais probióticos para carcinicultura.

Palavras-chave: carcinicultura; sistema heterotrófico; bactérias probióticas; *Shewanella algae*, 16S rRNA.

INTRODUÇÃO

Apontado como alternativa aos sistemas tradicionais, o sistema heterotrófico é considerado o sistema mais vantajoso em termos econômicos e sociais (EMERENCIANO et al., 2013). Wasielesky et al. (2013) acrescentam ainda que o sistema de biofloco apresenta maior produtividade utilizando menos áreas de cultivo, mais segurança, baixíssima ou nenhuma taxa de renovação de água, redução na concentração de proteínas nas rações ofertadas, aumento na oferta de alimento natural. Bactérias atuando como probiótico, apresentam menor impacto ambiental e ainda permitem o cultivo em regiões afastadas da costa. Este sistema também favorece a manutenção da qualidade da água, através da absorção de compostos nitrogenados (EMERENCIANO et al., 2013).

No sistema intensivo heterotrófico a utilização de probióticos é fundamental para o estabelecimento do equilíbrio na microbiota do cultivo. Estes, por sua vez, são microrganismos administrados por via oral, que propiciam benefícios à saúde, controle de patógenos, principalmente doenças bacterianas, atuando por exclusão competitiva e imunomodulação. Normalmente isolados do trato digestivo do próprio animal hospedeiro, os probióticos podem também melhorar o apetite e levar a um maior crescimento e melhor conversão alimentar (NEWAJ-FYZUL et al., 2013).

No entanto, o obstáculo para a compreensão destas relações tem sido a dificuldade na identificação das bactérias devido às técnicas convencionalmente utilizadas (OLIVEIRA et al., 2006). Em bactérias, as relações filogenéticas e taxonômicas são avaliadas utilizando o gene 16S rRNA (WHITMAN et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2010; VANDAMME et al., 1996; WEISBURG et al., 1991; WOESE et al., 1987; 1990).

Para que uma cepa seja considerada apta ao seu uso como probiótico, ela deve apresentar características, como ser não patogênica às espécies em cultivo, secretar substâncias antimicrobianas, secretar enzimas extracelulares competir por nutrientes necessários à sobrevivência de patógenos e estimular um efeito antitoxina que reduz a necessidade de antibióticos na aquicultura (CARNEVALI et al., 2017). O Gênero *Shewanella* é representado por bactérias gram-negativas comumente encontradas em ambiente marinho, bem como em ambientes extremos e variados, inclusive áreas de baixa temperatura e em locais com histórico de contaminação por petróleo. (KIM et al., 2007).

O gênero *Shewanella* é ainda o mais estudado dentro do grupo das bactérias redutoras de ferro (SILVA, 2009), platina (KONISHI et al., 2007a) e ouro (KONISHI et al., 2007b). Estudos realizados por Shakibazadeh et al. (2008) apontam que uma espécie deste gênero, a *Shewanella algae* apresenta resposta antimicrobiana em ampla gama de temperatura e pH contra os *Vibrio parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, além de antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2012). Esta espécie também pode atuar em biorremediação e produz enzimas extracelulares, como amilase, quitinase e alginase, fatores que favorecem o seu uso como probiótico na piscicultura e carcinicultura (ALMUZARA, et al., 2017; SIMIDU et al., 1990)

Por conseguinte, este estudo objetivou identificar e analisar filogeneticamente potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas e estômago do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracterizá-las fenotipicamente através de análises morfológicas, bioquímicas, além de estudar a capacidade de produção de biofilme e antibiograma.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo heterotrófico do *L. vannamei* foi realizado na Estação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O isolamento bacteriano, caracterização e identificação foram realizados nos Laboratório de Biologia do Solo e Genoma do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

Obtenção das cepas bacterianas candidatas a probiótico

As cepas foram inicialmente coletadas a partir do cultivo experimental realizado na UFRPE na qual foram obtidas amostras da água e dos camarões cultivados. Foram isoladas 233 cepas bacterianas. Posteriormente, foram selecionadas as cepas mais promissoras, quanto à produção de probiótico, através de testes enzimáticos amilolíticos e proteolíticos, objetivando obter cepas potenciais probióticas na carcinicultura. Destas, foram selecionadas as cepas bacterianas IPA-S.252 (isolada do camarão) e IPA-S.111 (isolada da água do cultivo) para caracterização morfológica e bioquímica, realização do antibiograma, identificação e análise filogenética.

Extração do DNA bacteriano

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Grange (2005). As bactérias foram cultivadas em meio específico Müller-Hilton HIMEDIA® (Mueller & Hinton, 1941) durante 48 h em temperatura de 30 °C. As culturas de bactérias foram então lavadas por três vezes com solução salina (NaCl 0,85 %). Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 400 µL de TE 50:20 (5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 100 mL de água ultrapura). Foram adicionados 50 µL de SDS (10 %) 10 µL de Lisozima (5 mg/mL), 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 1 µL de RNase (10 mg/mL). A mistura foi homogeneizada lentamente por inversão e incubada a 37 °C durante uma hora. Foram acrescentados 30 µL de NaCl 0,25 M e 60 µL de AcNa 0,3 M.

As amostras foram homogeneizadas lentamente e deixadas em repouso por uma hora a 4 °C. Em seguida, foi realizada centrifugação a 13.200 *g* durante 15 min e o sobrenadante recolhido e transferido para tubos de 1,5 mL. Foi adicionado duas vezes o volume de Etanol 95 % e a incubação realizada em temperatura de -20 °C *overnight*. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.200 *g* durante 15 min, o etanol foi descartado, os precipitados colocados para secar em temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h e, em seguida, ressuspensos em água ultrapura estéril. O DNA extraído foi estocado a -20 °C e posteriormente quantificado por espectrofotometria (Espectrofotômetro Bel® SPECTRO S05- comprimento de onda 260 nm) e sua integridade verificada por eletroforese horizontal (Loccus® LCH 12x14) em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 1X pH 8,0, a 110V (fonte Loccus® LPS 600V) durante 1 h 30min e corado com Syber Gold (Invitrogen®). Posteriormente visualizado e fotodocumentado (Loccus® L-PIX HE).

Amplificação e Sequenciamento das cepas

Foram identificadas as bactérias IPA-S.111, IPA-S.252 e como bactéria testemunha, uma cepa de *Bacillus subtilis* ATCC6633 (B.S.) cedida pelo Departamento de Antibióticos da UFPE. A reação foi realizada utilizando os *primers* fd1 (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), que correspondem a posição 8 – 28 e 1526 – 1542 respectivamente do gene 16S rRNA da *Escherichia coli* (Weisburg et al., 1991). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 1x tampão PCR 10x, MgCl₂ (2,6 mM), dNTP (0,5 mM), 1 µM de cada

primer, Taq DNA polimerase (2,5 U/ μ L), DNA (20 ng/ μ L) e o volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 50 segundos a 92 °C, 50 segundos a 62,3 °C e 1 minuto e 45 segundos a 72 °C; seguida de extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1,2 % (p/v) com o marcador de massa “100 pb DNA Ladder” (Invitrogen®) e purificados segundo Lyra (2001).

Após a purificação as bactérias foram encaminhados à ACTGene Análises Moleculares LTDA®. Cada amostra de DNA foi sequenciada pelo *primer* fD1(forward) e rD1 (reverse), sendo depositado em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL com 30 a 60 ng de DNA-molde e 4,5 pmol de *primer* em um volume final de 6 μ L completado com água ultrapura (Mili-Q).

Identificação e estudo filogenético

Com o auxílio do programa CodonCode Aligner® (2002 – 2010) foi avaliada a qualidade das sequências através de seus respectivos eletroferogramas. Com o mesmo programa foram avaliadas a qualidade e criação de sequências consenso entre os fragmentos sequenciados. As sequências foram avaliadas pelo programa PHRED (Quality Base Calling) também presente no aplicativo CodonCode Aligner®, selecionadas com PHRED > 30, que por sua vez avalia a probabilidade de erro no sequenciamento, apresentando probabilidade de 1/1000 com PHRED igual a 30.

Para a criação do banco de dados dos isolados sequenciados foi utilizado o programa online OligoCalculator® (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>). Neste foram analisados o conteúdo de Guanina (G) e Citosina (C), tamanho do fragmento, temperatura TM (Melting Temperature) °C e peso molecular.

As sequências obtidas foram comparadas no banco de dados NCBI-Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribossomal Data Base Project) - *Seqmath* (<http://rdp.cme.msu.edu/>) com o objetivo de identificar as cepas em nível de espécie. Para construção das árvores filogenéticas foram utilizadas as três (2) cepas em estudo (IPA-S.111 e IPA-S.252), selecionados quarenta e cinco (45) representantes do gênero *Shewanella* e um (1) representante do gênero *Vibrio* (*Vibrio cholerae* – espécie tipo do gênero).

As sequências do gene 16S rRNA foram obtidas pelo NCBI-Genbank no qual foram coletadas as sequências dos representantes de cada espécie. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o software Mega5® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis - TAMURA et al., 2011), utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 2000) e editando manualmente quando necessário. Foram construídas árvores para análises fenética e filogenética. Para a análise fenética foi construída uma árvore pelo método neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) com Mega6® (TAMURA et al., 2013), a confiabilidade da árvore foi mensurada por análise de bootstrap com 2000 simulações e editada com MEGA6® (TAMURA et al., 2013). A árvore filogenética foi construída pelo método Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood tree) com Mega6® (TAMURA et al., 2013), a confiabilidade da árvore foi mensurada por análise de bootstrap com 2000 repetições e editada com MEGA6® (TAMURA et al., 2013).

Também foram realizadas análises filogenéticas pelo método de Inferência Bayesiana (IB) utilizando o software MrBAYES®. Inicialmente foi realizado um teste para avaliar os modelos ideais para utilização da Inferência Bayesiana a partir do software Mega6® (TAMURA et al., 2013) e posteriormente, foi selecionado o modelo HKI +G+I (Hasegawa-Kishino-Yano). Os alinhamentos foram realizados no MEGA6® (TAMURA et al., 2013) e exportados para o software MrBAYES® no formato NEXUS®. Em seguida, foi criada a árvore filogenética a partir de um milhão de repetições. A árvore foi visualizada e editada no software FigTree® v1.3.1 (ANDREW RAMBAUT, 2006-2009).

Caracterização fenotípica das cepas de *S. algae* selecionadas

Crescimento bacteriano e análise morfológica das cepas

As cepas S.111 e S.252 foram submetidas aos meios de cultura AM HIMEDIA® (Agar Marinho – ZOBELL, 1941), LB (Luria & Bertani), Mueller-Hinton HIMEDIA® (Mueller & Hinton, 1941), TSA HIMEDIA® (Trypticase Soy Agar) e TCBS HIMEDIA® (Agar de Tiosulfato, Citrato, Bilis e Sacarose - KOBAYASHI, 1963) avaliando-se o crescimento entre 4 °C a 57 °C. A dinâmica de crescimento bacteriano foi realizada utilizando as cepas em estudo em meio LB líquido (pH 8.0, NaCl 25 %,

Temperatura 30 °C, 2000 RPM por 60 h) e avaliando o crescimento bacteriano a cada 4 h, utilizando espectrofotômetro (Espectrofotômetro Bel® SPECTRO S05- comprimento de onda 660 nm). As cepas foram avaliadas de acordo com a similaridade aos padrões já estabelecidos de forma, borda, elevação, superfície, consistência, cor, luz transmitida e refratada, decorrente do crescimento bacteriano em meio sólido (Muller-Hinton) por 24 h em estufa a 30 °C.

Testes bioquímicos

A técnica com coloração de Gram foi realizada em meio específico (AM) para incubação em estufa bacteriológica por 24 h a 30 °C. As lâminas com os esfregaços bacterianos foram submetidas aos seguintes reagentes para avaliação do perfil de coloração: cristal violeta (corante primário), iodo-lugol (mordente), etanol (agente descolorante) e safranina (contrastante). As Gram-negativas garantiram uma cor rósea ou avermelhada e as Gram-positivas, púrpura (TORTORA, 2010).

Os testes para Catalase e Oxidase iniciaram-se com o crescimento das cepas em meio sólido LB por 24 h. Ademais, o teste de Catalase desenvolveu-se através da adição de 50 µl de peróxido de hidrogênio no esfregaço bacteriano e verificação da produção de gás. O teste de Oxidase realizou-se utilizando as fitas para determinação de oxidase (Probac do Brasil®), avaliando a mudança de coloração do esfregaço bacteriano.

Outros testes bioquímicos foram realizados com o auxílio dos kits BACTRAY I, BACTRAY II e BACTRAY III (Laborclin®). Executou-se um total de 30 testes bioquímicos, no qual todos foram analisados e computados neste trabalho. Após crescimento de 24 h, as cepas foram suspendidas em água destilada autoclavada na concentração final semelhante a 0,5 McFarland. Posteriormente, as análises foram realizadas em acordo com o protocolo estabelecido pela Laborclin®, realizando três repetições para cada teste.

Antibiograma das cepas selecionadas

Na realização do antibiograma, as bactérias foram incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, foi realizada a suspensão bacteriana de 1mL à 0,5 McFarland e aplicadas à técnica de Kirby e Bauer, com três repetições. Entre as classes de antibióticos utilizados estão os β -Lactâmicos (Amoxicilina, Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Penicilina, Ampicilina e Oxacilina), Tetraciclinas

(Tetraciclina), Macrolídeos (Azitromicina), Quinonas (Ofloxacina), Glicopeptídeos (Vancomicina), Aminoglicosídeos (Amicacina), Fenicóis (Clorofenicol) e Polipeptídeos (Bacitracina), Laborclin®. Para aferição do halo de inibição foi utilizado paquímetro digital (Zaas Precision® - 300mm). Foram admitidas cepas sensíveis apenas as que apresentaram halo inibitório $\geq 5\text{mm}$.

Produção de Biofilme

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo Christensen et al. (1985). Na qual as cepas foram inoculadas em 10 mL de meio LB líquido por 24 h a 30 °C em crescimento estático. Posteriormente os tubos foram esvaziados e corados com corante Cristal violeta 0,1 % por 1 minuto, sendo realizadas quatro repetições para cada tratamento.

RESULTADOS

As bactérias isoladas apresentaram crescimento nos meios de cultura Agar marinho, TCBS, TSA, Mueller-Hinton, LB sólido e líquido (pH 8.0 e NaCl 25 %). As cepas IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252 obtiveram crescimento a partir de 8 °C. A cepa IPA-S.51 obteve crescimento até 54 °C nos meios supracitados. As cepas IPA-S.111 e IPA-S.252 apresentaram crescimento até 46 °C nos meios AM e LB, e 44 °C para todos os meios analisados.

Tabela 1. Morfologia das cepas bacterianas analisadas a partir de caracterização morfológica da bactéria e colônia.

Morfologia	IPA-S.111	IPA-S.252
Forma Bactéria	Baciliforme	Baciliforme
Tamanho Colônia*	1-2mm	1-2mm
Forma	Circular	Circular
Borda	Lisa	Lisa
Homogeneidade	Homogênia	Homogênia
Cor	Laranja	Laranja
Trasparência	Translúcida	Translúcida
Elevação	Drop-like	Drop-like
Consistência	Butírica	Butírica
Muco	Escasso	Escasso
Alteração no meio	Básico	Básico
Elasticidade	Pouco	Pouco

(*) Avaliação em 24h de crescimento.

Quanto às fases de crescimento bacteriano, as cepas mantiveram-se na fase Lag até 8 h de crescimento. A fase Log apresentou-se a partir das 8 h até às 18 h de crescimento. A fase Estacionária entre as 18 h e 48 h. A fase de morte foi observada a partir das 48 h até o final do ciclo de crescimento (60 h). A cepa com maior taxa de crescimento foi a IPA-S.111 com D.O. igual a 3,278 em 54 h, seguida da IPA-S.252 (D.O. 3,212 em 54 h), alterando o pH do meio para básico (Tabela 2).

Os resultados morfológicos obtidos referentes às cepas IPA-S.111 e IPA-S.252 descrevem-nas como baciliformes, apresentando tamanho entre 1 mm e 2 mm, com forma circular, borda lisa, com colônias homogêneas, de cor Laranja, e translúcidas, apresentando elevação do tipo *Drop-Like* (forma de gota), com consistência butírica, muco escasso e com pouco elasticidade.

Tabela 2. Caracterização Bioquímica das cepas isoladas no cultivo intensivo heterotrófico de *L. vannamei*, sendo a IPA-S. 252 isolados do trato digestivo e a IPA-S.111 isolada da água.

Testes Bioquímicos	Cepas Bacterianas	
	IPA-S.111	IPA-S.252
Teste Gram*	N	N
Catalase*	P	P
Oxidase*	P	P
β -Galactosidase (ONPG)	N	P
Arginina Desidrogenase (ADH)	P	P
Lisina descarboxilase (LDC)	P	P
Ornitina descarboxilase (ODC)	P	P
Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	P	P
Urease (URE)	N	N
Acetoina (VP)	N	N
Adesaminação da fenilalanina (PD)	N	N
Indol (IND)	N	N
Citrato (CIT)	N	N
Malonato (MAL)	N	N
Rhamnose (RAM)	N	N
Adonitol (ADO)	N	N
Salicina (SAL)	N	N
Arabinose (ARA)	P	N
Inositol (INO)	N	N
Sorbitol (SOR)	N	N
Sacarose (SAC)	N	N
Manitol (MAN)	N	N
Rafinose (RAF)	N	N

Cetrimide (CET)	N	N
Acetamida (ACE)	N	N
Maltose (MLT)	N	N
Esculina (ESC)	P	P
Arginina (CTL)	P	P
Arginina dehidrolase (ARG)	P	P

(*) Testes realizados individualmente.

() Testes realizados no BACTRAY®.

Os resultados observados no teste de Gram classificam todas as cepas como Gram Negativas. Os testes da Catalase e Oxidase foram positivos para todas as cepas analisadas (Tabela 2). As cepas IPA-S.111 e IPA-S.252 apresentaram testes equivalentes, exceto quanto o testes da Arabinose (ARA) no qual a cepa IPA-S.111 apresentou teste positivo enquanto que a cepa IPA-S.252 apresentou teste negativo. Todos os testes bioquímicos podem ser observados na tabela 2.

Quanto aos testes de produção de biofilme utilizados (CHRISTENSEN et al., 1982) a cepa IPA-S.252, isolada do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*, foi positiva na produção do biofilme bacteriano e apresentou alta aderência ao substrato testado. Por sua vez, a cepa IPA-S.111 apresentou resultado negativo por obter baixíssima produção de biofilme. Em todas as quatro repetições os resultados foram idênticos para cada cepa.

Tabela 3. Antibiógrama das cepas isoladas no cultivo intensivo heterotrófico de *L. vannamei*. Sendo a IPA-S. 51 e IPA-S. 252 isolados do trato digestivo e a IPA-S.111 isolada da água.

Antibiótico	IPA-S. 111	IPA-S. 252
Bacitracina	0	0
Amoxicilina (10µg)	8,82 mm ± 0,55	0
Clorafenicol (30µg)*	12,2 mm ± 1,22	9,52 mm ± 0,15
Amicacina (30µg)*	8,20 mm ± 0,77	7,77 mm ± 0,75
Vancomicina	2,79 mm ± 0,77	1,24 mm ± 0,42
Ampicilina/Sulbactam* (10µg)*	11,00 mm ± 0,80	7,78 mm ± 0,62
Amox./Ac. Clavulânico(30µg)	10,52 mm ± 0,57	4,88 mm ± 1,79
Ofloxacina (5µg)*	9,31 mm ± 1,46	11,42 mm ± 1,51
Azitromicina (15µg)*	13,86 mm ± 2,49	9,22 mm ± 0,67
Tetraciclina (30µg)*	9,24 mm ± 0,13	6,07 mm ± 0,43
Penicilina (10µg)	8,26 mm ± 0,72	1,25 mm ± 1,09
Ampicilina (10µg)	10,52 mm ± 0,086	1,52 mm ± 1,64
Oxacilina (1µg)	0	0

Desvio padrão 1%.

() Concentração dos antibióticos.

(*) Antibióticos eficazes contra as cepas testadas.

Dentre os resultados observados na realização do antibiograma a Bacitracina e a Oxacilina mostraram-se ineficazes nas duas bactérias testadas, somando-se a Amoxicilina, ineficaz apenas na cepa IPA-S.252, com halo de inibição igual a zero. O maior halo de inibição foi obtido com a IPA-S.111, promovendo um halo de inibição de 13,86 mm ($\pm$ 2,49 mm) através da ação do Azitromicina (15 μ g). Ademais, o Clorafenicol mostrou-se sensível também a IPA-S.252 produzindo um halo inibitório de 9,52 mm ($\pm$ 0,15 mm) (Tabela 3).

A cepa IPA-S.111, não foi sensível apenas ao antibiótico Vancomicina, com halo inibitório de 2,79 mm ($\pm$ 0,77 mm), sendo assim, sensível a todos os demais. A cepa IPA-S.252 foi resistente aos antibióticos Bacitracina, Amoxicilina (10 μ g), Vancomicina, Amoxicilina/Ácido Clavulânico (30 μ g), Penicilina (10 μ g), Oxacilina (1 μ g). O antibiótico mais eficaz contra a cepa IPA-S.252 foi a Ofloxacina (5 μ g), com halo inibitório de 11,42 mm ($\pm$ 1,51 mm).(Tabela 3).

Os resultados obtidos no sequenciamento do gene 16S rRNA apontaram alta qualidade nos eletroferogramas obtidos. As cepas IPA-S.111, IPA-S.252 e o *Bacillus subtilis* apresentaram, respectivamente, valores do PHRED iguais a 665.5, 714 e 719.5 (Tabela 4), todos maiores que o valor mínimo recomendado (PHRED 30). Quanto ao conteúdo G/C o *Bacillus subtilis* apresentou concentração G/C 55 %, contudo as demais cepas apresentaram G/C igual a 54 % (Tabela 1). A temperatura Melting (T_m) observada foi de, 86.8 (IPA-S.111), 86.7 (IPA-S.252) e 86.9 (*B. subtilis*). Todas as cepas apresentaram *contigs* com tamanho superior a 1400pb (Tabela 4).

Na identificação das cepas foram contabilizados os 20 primeiros acessos de cada *contig* submetidos aos bancos de dados genéticos NCBI/GenBank e RDP-Seqmach. A cepa IPA-S.111 apresentou alta similaridade a acessos de *Shewanella algae* em ambos os bancos de dados (Tabela 4). Tendo no NCBI/GenBank similaridade de 40 % a acessos identificados como *Shewanella algae*, 33 % como *Shewanella sp.*, 7 % como *Shewanella haliotis* e similar em 20 % a acessos com outras identificações. No RDP-Seqmach apresentou similaridade em 60 % a acessos de *Shewanella algae*, 20 % em acessos de *Shewanella sp.*, 10 % como *Shewanella haliotis* e 10 % de similaridade a acessos com outras denominações.

A cepa IPA-S.252 foi altamente similar a *Shewanella algae* GQ372874.1 (acesso melhor pontuado segundo parâmetros do GenBank), mesmo acesso obtido quando submetida a cepa IPA-S.111 (Tabela 4). Quando submetida ao NCBI/GenBank, apresentou frequência de 37 % a acessos identificados como *Shewanella algae*, 35 % como *Shewanella* sp. e 28 % com acessos identificados com outras denominações. Utilizando o RDP-Seqmach obteve-se 45 % dos acessos identificados como *Shewanella algae*, 30 % como *Shewanella* sp. e 25 % outros.

Tabela 4: Análise das sequências e identificação através do NCBI/GenBank e RDP.

Cepas	PHRED*	Tamanho	NCBI/GenBank**	RDP-SeqMath**
IPA-S.111	665,5	1455	<i>S. algae</i> [GQ372874.1]	<i>S. algae</i> [U91547]
IPA-S.252 ^H	714	1480	<i>S. algae</i> [GQ372874.1]	<i>S. algae</i> [X81622]
B.S.	719,5	1471	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> [CP002183.1]	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> [AB018486]

(*) Média do Base Calling das sequências Forward e Reverse baseado no PHRED.

(**) Acessos melhor pontuados em cada banco de dados.

(H) Cepas bacterianas encontradas no hepatopâncreas e estômago do camarão.

As análises fenéticas utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) resultaram no agrupamento visível na Figura 1. O agrupamento realizado apresentou topologia semelhante à árvore filogenética criada através do método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood tree) (Figura 2), objetivando facilitar o entendimento das mudanças topológicas do agrupamento e árvore realizadas, estes foram subdivididos em cinco (5) grupos.

O grupo 1 é composto pelas espécies *S. marinintestina* AB081759.1, *S. sairae* NR 024793.1, *S. schlegeliana* AB081761.1, *S. halifaxensis* NR 074822.1, *S. pealeana* AF011335.1, *S. pneumatophori* NR 041292.1, *S. psychrophila* NR 042173.1, *S. kaireitica* NR 040951.1, *S. fidelia* NR 025195.1, *S. woodyi* AF003549.1, *S. hanedai* NR 037072.1, *S. sediminis* NR 074819.1, *S. surugensis* NR 040950.1, *S. abyssi* NR 041290.1, *S. gelidimarina* NR 026058.1, *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 (Figura 1 e 2).

Quanto às mudanças na topologia do agrupamento e árvore filogenética, a *S. pneumatophori* NR 041292.1, no agrupamento observado no sub-ramo suportado estatisticamente por Bootstrap 30 (Figura 1) foi deslocado um ramo abaixo na árvore de

Máxima Verossimilhança, pelas espécies *S. halifaxensis* NR 074822.1 e *S. pealeana* AF011335.1 (Figura 2). Outra mudança observada no grupo 1 é a substituição ocorrida no ramo suportado estatisticamente por Bootstrap 19 (Figura 1). As espécies *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 foram trocadas de posição com *S. woodyi* AF003549.1, *S. hanedai* NR 037072.1 e *S. sediminis* NR 074819.1 (Figura 2).

No grupo 2 estão presentes os acessos *S. affinis* AY351983.1, *S. colwelliana* NR 043074.1, *S. algidipiscicola* NR 041297.1, *S. marisflavi* 025793.1, *S. waksmanii* NR 025684.1, *S. aquimarina* NR 025794.1 e *S. loihica* NR 043689.1, grupo passivo de várias alterações na topologia (Figura 1 e 2). O agrupamento apresentou apenas um ramo principal (Figura 1) enquanto na filogenia foi possível observar três subdivisões (Figura 2). No agrupamento o ramo superior sustentado pelo Bootstrap 52 (Figura 1) foi deslocado para uma zona medial na árvore filogenética (Figura 2). Logo abaixo, no ramo com Bootstrap 32 (figura 1) a espécie *S. waksmanii* NR 025684.1 foi posicionada na árvore filogenética, como a espécie plesiomórfica do grupo 2 (Figura 2).

O grupo 3 é representado pelas as cepas de *S. algae* IPA-S.111, IPA-S.252 e os acessos *S. amazonensis* AF005248.1, *S. chilikensis* JF414774.1, *S. haliotis* EF178282.1, *S. algae* NR 028673.1 e *S. upenei* JQ670746.1 (Figura 1 e 2). Diferente do método *Neighbor-Joining* (Figura 1), na máxima Verossimilhança é possível observar a formação de um clado representado pelos táxons *S. algae* NR 028673.1, IPA-S.111, *S. upenei* JQ670746.1 e IPA-S.51, a partir da IPA-S.252 com bootstrap 31 (Figura2).

Não obstante, o grupo 4 composto pelas espécies *S. pacifica* AF500075.1, *S. donghaensis* AY326275.1, *S. aestuarii* JF751044.2, *S. denitrificans* NR 027556.1, *S. frigidimarina* NR 027556.1, *S. livingstonensis* NR 025443.1 e *S. gaetbuli* DQ 167234.1 (Figura 1), foi deslocado, na filogenia, para o grupo 5 acrescida da alteração topográfica do acesso *S. gaetbuli* DQ 167234.1 (Figura 2).

Por fim, o grupo 5 é constituído pelos acessos *S. decolorationis* AJ609571.1, *S. glaciopiscicola* AB681674.1, *S. morhuase* NR 041299.1, *S. baltica* NR 025267.1, *S. hafniensis* AB205566.1, *S. profunda* NR 104770.1, *Shewanella putrefaciens* X82133.1, *S. ircinae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1 e o acesso *Vibrio cholerae* Z21856.1 como grupo externo (Figura 1). Estes, por sua vez, foram deslocados para o grupo 4 quando comparados ao método de Máxima Verossimilhança (Figura 2), sendo preservados apenas os táxons *S. ircinae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1 e o grupo externo *Vibrio cholerae* Z21856.1 (Figura 2). Contudo, foi possível observar

algumas alterações topológicas entre o agrupamento e o método de Máxima Verossimilhança. No entanto estas alterações não abalaram a estrutura, preservando a interpretação fenética e filogenética, em respectivas análises.

Figura 1. Agrupamento por neighbor-joining.

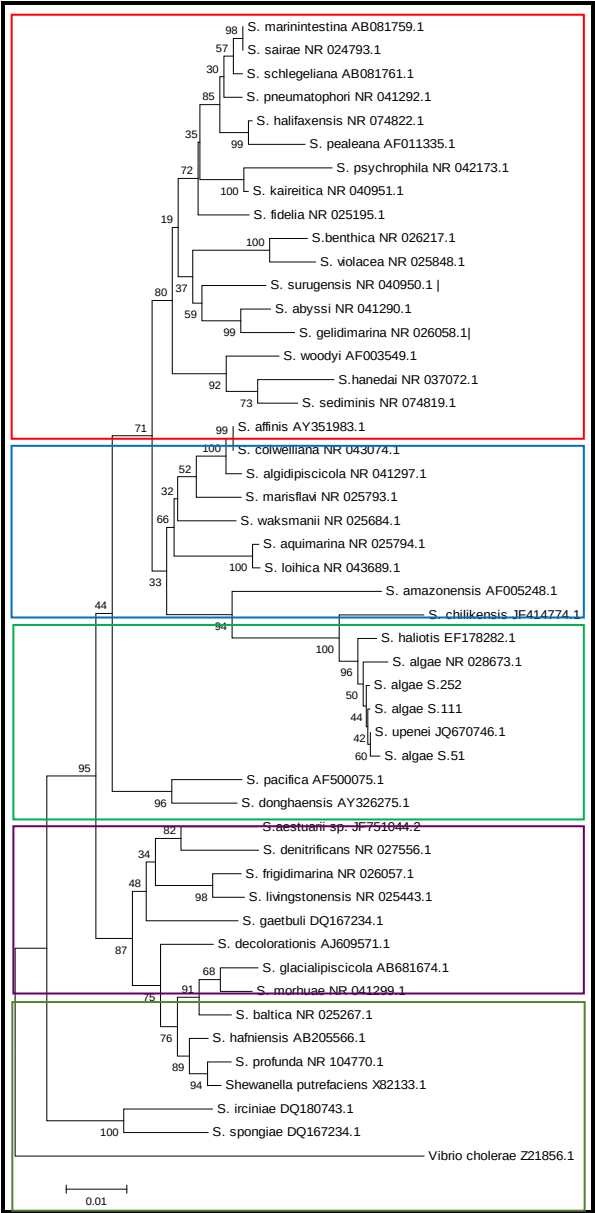
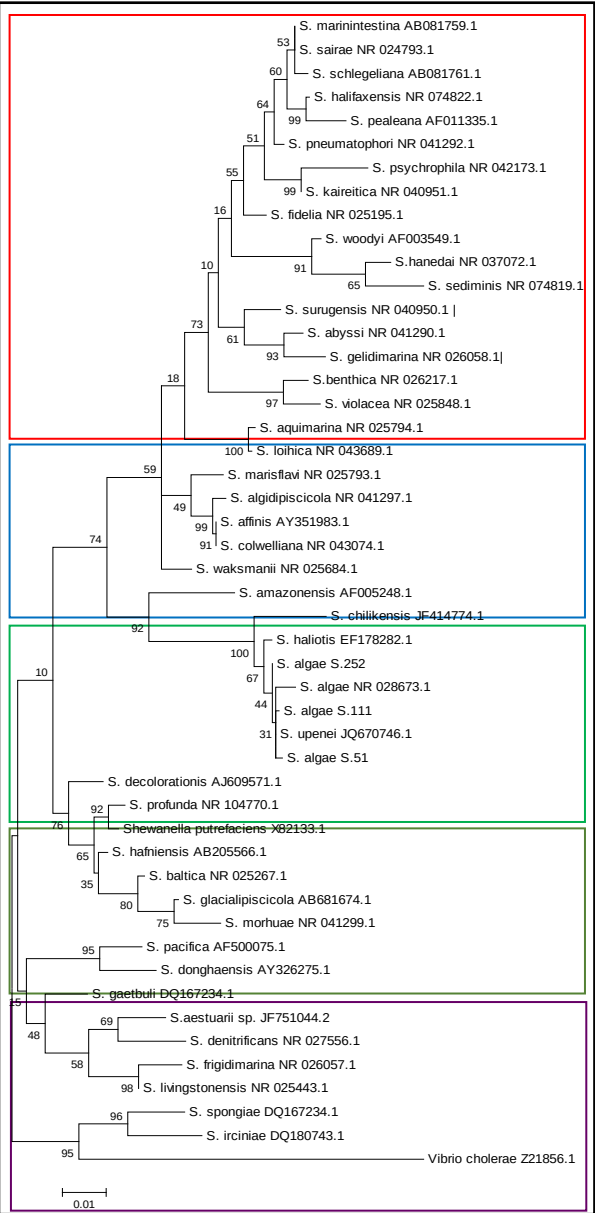


Figura 2. Árvore Máxima Verossimilhança.



- Grupo 1
- Grupo 2
- Grupo 3
- Grupo 4
- Grupo 5

*Errata, onde vê-se S.51 entender S.21.

A Inferência Bayesiana (IB) realizada apresentou algumas variações na estrutura da árvore comparada ao método de Máxima verossimilhança (MV), ainda, apresentando ramos com maior suporte estatístico do que os observados nos outros métodos, justificado pela presença de apenas oito (8) ramos com probabilidade inferior a 70 %. No grupo 1 (Figura 3) na árvore Bayesiana, observa-se a presença do grupo externo e os táxons *S. irciniae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1, invertendo a topologia da árvore (Figura 3), comparada ao grupo 1 (Figura 2) da árvore elaborada pelo método da Máxima Verossimilhança (MV). Ademais, várias inversões na topologia da árvore podem ser observadas.

O táxon *S. schlegeliana* AB081761.1, que na máxima M.V. encontrava-se agrupado no mesmo clado da *S. marinintestina* AB081759.1 e *S. sairae* NR 024793.1 (Figura 2), na I.B. apresenta-se mais afastado filogeneticamente em outro ramo, com probabilidade de 82 % (Figura 3). Os acessos *S. pneumatophori* NR 041292.1 e *S. fidelia* NR 025195.1, na M.V. em clados diferentes (Figura 2), apresentam-se no mesmo clado na I.B. somado aos acessos *S. psychrophila* NR 042173.1 e *S. kaireitica* NR 040951.1 (Figura 3). Outra mudança observa-se na formação do clado composto pelos táxons *S. surugensis* NR 040950.1, *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 (Figura 3).

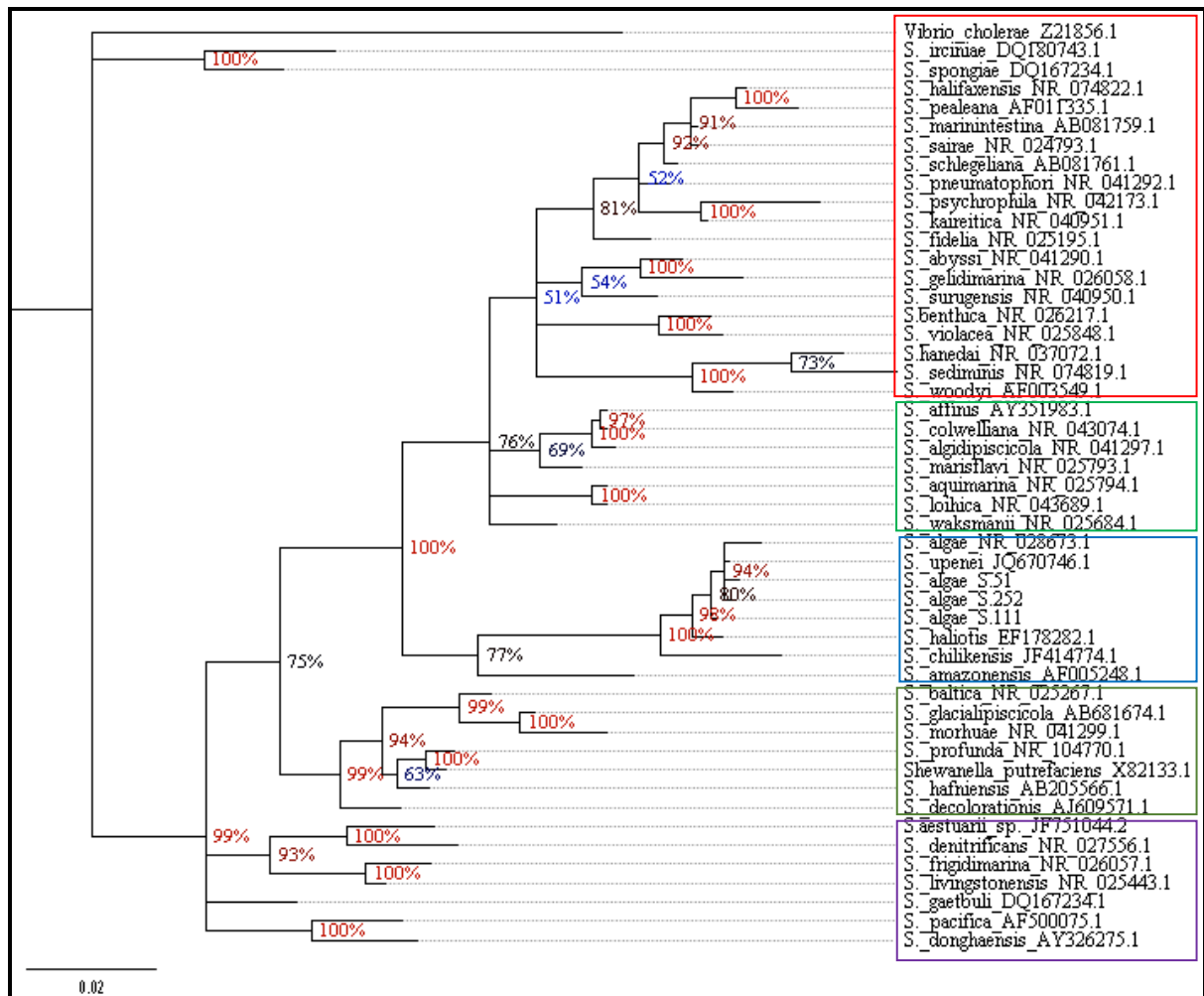
O táxon *S. schlegeliana* AB081761.1, que na máxima M.V. encontrava-se agrupado no mesmo clado da *S. marinintestina* AB081759.1 e *S. sairae* NR 024793.1 (Figura 2), na I.B. apresenta-se mais afastado filogeneticamente em outro ramo, com probabilidade de 82% (Figura 3). Os acessos *S. pneumatophori* NR 041292.1 e *S. fidelia* NR 025195.1, na M.V. em clados diferentes (Figura 2), apresentam-se no mesmo clado na I.B. somado aos acessos *S. psychrophila* NR 042173.1 e *S. kaireitica* NR 040951.1 (Figura 3). Outra mudança foi observada na formação do clado composto pelos táxons *S. surugensis* NR 040950.1, *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 (Figura 3).

Na árvore filogenética construída pela I.B., o grupo 2 se destaca pelo deslocamento do clado referente aos táxons *S. woodyi* AF003549.1, *S. hanedai* NR 037072.1 e *S. sediminis* NR 074819.1, antes do grupo 1 na M.V. (Figura 2) para o grupo 2 (Figura 3).

O grupo 3 apresenta apenas um inversão entre as cepas IPA-S.252 e IPA-S.111, quando comparado a I.B.(Figura 3) e M.V. (Figura 2). O grupo 4 não apresentou

nenhuma alteração significativa entre a I.B.(Figura 3) e M.V. (Figura 2). Por fim, o 5º grupo destaca-se apenas a mudança no enraizamento da árvore que acarretou no deslocamento do grupo externo e os táxons *S. ircinae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ167234.1 para o grupo 1 (Figura 3).

Figura 3. Árvore filogenética construída pelo método Inferência Bayesiana (KHI-INV).



(*) Ramos azuis probabilidade < 70%. Ramos em preto probabilidade ≥ 70%; Ramos em vermelho probabilidade ≥ 90%. **Errata, onde vê-se S.51 entender S.21.

- Grupo 1
- Grupo 2
- Grupo 3
- Grupo 4
- Grupo 5

A cepa IPA-S.111 foi muito similar aos acessos *S. upenei* JQ670746.1 (99,93 %), *S. algae* NR 028673.1 (99,64 %) e *S. haliotis* EF178282.1 (99,71 %). Por fim, a

cepa IPA-S.252 apresentou grande similaridade aos táxons *S. upenei* JQ670746.1 (99,93 %), *S. algae* NR 028673.1 (99,64 %) e *S. haliotis* EF178282.1 (99,71 %).

DISCUSSÃO

Neste aspecto a caracterização fenotípica tem importância crucial não apenas na caracterização, mas também no processo de identificação entre espécies. As cepas IPA-S.111 e IPA-S.252, quando comparadas a *S. upenei* são morfologicamente semelhantes (KIM et al., 2011). Entretanto, apresentam similaridades a *S. algae* por apresentarem testes positivo para Esculina, crescimento até 44 °C, apresentar conteúdo G+C de 54 %, assim como sua sensibilidade a Ampicilina, esta observada apenas na cepa IPA-S.111. Ademais, a cepa S.252 difere da *S. upenei* por apresentar teste positivo para β -Galactosidase. Por fim, S.111 e S.252 apresentam teste positivo para Ornitina, incompatível com o mesmo teste para *S. algae* (SIMIDU et al., 1990). Cepas isoladas por HAN et al. (2017), apresentaram sensibilidade aos antibióticos tetraciclina e cloranfenicol, assim como o presente trabalho.

Em estudos realizados por JUNG-SCHROERS et al. (2017), puderam ser testados peixes doentes e peixes clinicamente saudáveis em ambiente aquático, sendo isoladas diferentes espécies de *Shewanella*. Isso indica que *Shewanella spp.* atua como um patógeno secundário em meio aquático. Contudo, foi constatado, pelo mesmo autor, que a virulência de *Shewanella spp.* provavelmente não depende da espécie, mas do isolado. Muitos isolados de *Shewanella spp.* estavam apresentando múltiplas resistências contra antibióticos de rotina. Sendo assim, necessária a investigação dos antibióticos mais eficazes contra cada cepa de *Shewanella* (JUNG-SCHROERS et al., 2017).

A exemplo no isolamento e identificação de *S. algae* em *Cynoglossus semilaevis*, a caracterização morfológica combinada com testes bioquímicos e fisiológicos, foram cruciais para apontar os isolados como prováveis cepas de *S. algae*. Contudo, apenas a partir do sequenciamento completo do gene rRNA 16S, correspondendo 1509pb foi possível confirmar a espécie (HAN et al., 2017). O alinhamento, utilizado na construção das árvores fenética e filogenéticas, foi composto por 1405, representando 91,88 % do gene 16S rRNA da *Escherichia coli*, dados semelhantes aos observados por KIM et al. (2011) em estudos utilizando *S. upenei*.

O método com maior suporte estatístico foi a Inferência Bayesiana (I.B.) justificado pelas probabilidades observadas nos ramos criados, não obstante os métodos *Neighbor-Joining* e Máxima verossimilhança apresentaram topologias semelhantes a outros estudos realizados (KIM et al., 2007; KIM et al., 2011). No entanto, a mudança do enraizamento da árvore Bayesiana constata que o grupo externo utilizado (*Vibrio cholerae*) não foi adequado, ainda que este grupo externo venha sendo utilizado em vários estudos (KIM et al., 2011; PARK et al., 2009). Ainda, a topologia da árvore foi compatível com outros estudos realizados com espécies do gênero *Shewanella* utilizando-se do método *Neighbor-Joining* (SIMIDU et al., 1990; IVANOVA et al., 2003; KIM et al., 2007; KIM et al., 2011).

As cepas em análise foram identificadas com o auxílio do NCBI-GenBank e RDP-Seqmach como pertencentes ao Gênero *Shewanella*, espécie *Shewanella algae*. O método mais confiável para a identificação de espécies é o sequenciamento de rRNA 16S (JUNG-SCHROERS et al., 2017). Todas as cepas analisadas apresentaram similaridade maior que 99,8 % com o táxon *S. upenei* JQ670746.1 (99,93 %), sendo este similar em 99,64 % a *S. algae* NR 028673.1. HAN et al. (2017) identificam a espécie *S. algae* com identidade de 99,86 %, 99,86 % e 99,80 %, respectivamente aos acessos *S. ATCC51192* (NR117771), *YJ06114* (EF542799) e *MAS2737* (GQ372875). A maior similaridade a *S. upenei* pode ser justificada pelo processo de edição no alinhamento, na qual foram deletados trechos iniciais e finais do alinhamento objetivando eliminar falsas apomorfias. Esta técnica pode ter eliminado, das análises filogenéticas, mutações que distanciariam as cepas analisadas da *S. upenei*. Contudo, estudos realizados por JUNG-SCHROERS et al. (2017) apontam a criação de um grupo parafilética entre amostras isoladas de *Shewanella ssp.*, apontando alta diversidade com diversos tipos de cepas neste gênero. Ademais, espécies distintas como *S. aquimarina* e *S. loihica* apresentaram similaridade de 99,85 %, *S. sairae* e *S. marinintestina* com similaridade de 100 %, a demais as espécies *S. sediminis* e *S. affinis*.

Como nos gêneros *Burkholderia* (COENEY et al., 2001) e *Bradyrhizobium* (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006) o gene 16S rRNA apresenta baixa variabilidade, o que dificulta a clara definição de espécie (FIGUEIREDO et al., 2010). Ainda, a alta taxa de transferências horizontais de materiais genéticos em bactérias torna os genomas dinâmicos, ocorrendo comumente perdas e incorporações de materiais genéticos (GEVERS et al., 2005). Desta forma, torna-se necessária a realização de

análises complementares com o gene *gyrB* (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1995), o gene 23S rDNA ou espaço intergênico 16S-23S rRNA (IGS, região intergênicas), que apresentam maior variabilidade entre as espécies (GERMANO et al., 2006).

Quanto à aplicação na aquicultura, vários estudos apontam a *Shewanella algae* com potencial probiótico. A cepa IPA-S.252 isolada do trato digestivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, apresentou resultado positivo para produção de biofilme e alta aderência ao substrato analisado. A competição pela aderência entre bactérias probióticas e patogênicas pode trazer benefícios ao hospedeiro, uma vez que a capacidade em aderir ao trato digestivo pode promover competição por substrato com bactérias patogênicas e ainda, em alguns casos, inibir patógenos por alelopatia. Ademais, a colonização bacteriana simbiótica do intestino de peixes e crustáceos está diretamente relacionada à sua capacidade de aderir à superfície da mucosa intestinal (SHAKIBAZADEH et al., 2012; WESTERDAHL et al., 1991; OLSSON et al., 1992).

No ambiente de cultivo, a alta produção de biomassa, observada na cepa IPA-S.111, e biofilme, observada na IPA-S.252, pode produzir incremento na produção de bioflocos bacteriano, consequentemente aumentando a demanda de alimento fresco para o camarão. Isto se dá pelo fato das cepas IPA-S.111 e IPA-S.252 combinarem crescimento rápido e grande produção de biomassa. Ainda, a baixa produção de biofilme produzido pela IPA-S.111 favoreceria a formação de aglomerados celulares dispersos no cultivo. Este, por sua vez proporcionaria a formação do bioflocos.

Adicionalmente, a alta atividade bioquímica, como alta digestibilidade de proteínas e carboidratos (GOUVEIA, 2012), além de outras atividades observadas nas cepas, sustenta a hipótese de que estas bactérias podem atuar na melhoria da qualidade da água do cultivo. Em adição ao fato de que, em estudos em andamento (dados não publicados), as cepas IPA-S.51 e IPA-S.252 apresentaram antagonismo às espécies *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus*, resultados que corroboram os relatados por Shakibazadeh et al. (2008; 2012), fato este que aumenta a necessidade do esclarecimento sobre a especiação destas cepas.

5 ARTIGO 3

Patente: “Composto probiótico para aplicação no sistema intensivo heterotrófico em cultivo de crustáceos e peixes”.



Espaço reservado para o
protocolo

Espaço reservado para a
etiqueta

Espaço reservado para o código (



**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL**
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 69/91
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

1. Depositante:

- 1.1. Nome: Rogério William Santos Portela
- 1.2. Qualificação: Mestre em Ciências Biológicas
- 1.3. CNPJ/CPF: 061.133.694-47
- 1.4. Endereço Completo: Rua Visconde do Uruguai, 376. Madalena, Recife - PE.
- 1.5. CEP: 50610545
- 1.6. Telefone: (81) 30238500 - 32366220
- 1.7. Celular: (81) 986118329
- 1.8. E-mail: portela.gene@gmail.com

2. Natureza: Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

Composto probiótico para aplicação no sistema intensivo heterotrófico em cultivo de crustáceos e peixes.

4. Inventores:

4.1. Nome: Rogério William Santos Portela*; José de Paula Oliveira; Ranilson de Souza Bezerra; Carol K. Gouveia; Lidiane Cristina Pinho Nascimento Portela; Diego Buarque; Juliana Inteiraminense.

4.2. Qualificação*: Doutor em Ciências Biológicas

4.3. CPF*: 061.133.694-47

4.4. Endereço Completo*: Rua Visconde do Uruguai, 376. Madalena, Recife-PE.

4.5. CEP*: 50610545

4.6. Telefone*: (81) 30238500 - 32366220

4.7. Celular*: (81) 986118329

4.8. E-mail*: portela.gene@gmail.com

5. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

6. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

7. Documentos Anexados:

	<i>Documentos Anexados</i>	<i>Folhas</i>
7.1	Guia de Recolhimento da União (GRU)	X
7.2	Procuração.	-
7.3	Documentos de Prioridade.	-
7.4	Documento de contrato de trabalho.	-
7.5	Relatório descritivo.	X
7.6	Reivindicações.	X
7.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada <u>com o</u> resumo: nº por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do	X
7.8	Resumo.	X
7.9	Listagem de sequências em arquivo <u>eletrônico</u> : nº de CDs ou DVDs	-

	7.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagens de sequências.	X
	7.11	Listagem de sequências em formato impresso.	X
	7.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	X
	7.13	Outros (especificar)	—

8. Total de folhas anexadas: 28 fls.

9. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Local e Data

Assinatura e Carimbo

RESUMO

A invenção consiste de preparado probiótico para administração regular em sistemas de cultivo intensivo heterotrófico. O probiótico é composto pelas cepas bacterianas *Shewanella algae* cepa IPA-252 e IPA -111, e a bactéria *Bacillus subtilis*, cepa IPA-51. É caracterizado por ser uma solução probiótica destinada a aplicação em sistemas de biofloco para cultivo de peixes ou crustáceos. Este preparado probiótico possui ação antimicrobiana contra diversas espécies de *Vibrio* sp., atuando na ciclagem da matéria orgânica, com capacidade de aderência ao trato digestivo e melhoria nas taxas de conversão alimentar dos animais cultivados. Ademais, acentua a produção de biofloco, estimulando o desenvolvimento de alimentos vivos, como zooplânctons em suspensão no sistema e, ainda, estimula a atividade imune em crustáceos.

6 CONCLUSÕES

As cepas estudadas mostraram-se como bactérias importantes na dinâmica do cultivo intensivo heterotrófico do camarão *Litopenaeus vannamei*. A identificação parcial do gene rRNA 16S somado a técnica de BOX PCR apontaram identidades as cepas apenas a nível de gênero. Contudo, apontaram cepas do gênero *Shewanella* presentes tanto no camarão quanto na água de cultivo com candidatas a probiótico.

A caracterização morfológica, bioquímica, antibiograma e a avaliação da produção de biofilme apresentaram divergências entre as cepas de *S. algae* IPA-S.111 e IPA-S.252 estudadas, apontando características e aplicações probióticas e prebióticas no cultivo de camarões. A análise filogenética do 16S rRNA revelou várias incongruências quanto à validade de algumas espécies. As cepas devem ser reavaliadas filogeneticamente com o auxílio dos genes *gyrB*, 23S rDNA e espaço intergênico 16S-23S rRNA, além de reavaliação da bactéria *S. upenei* como espécie e a relação entre *S. aquimarina* e *S. loihica*, *S. sairae* e *S. marinintestina* e entre as espécies *S. sediminis* e *S. affinis*. Assim, torna-se crucial a preservação de um possível produto probiótico através de um pedido de patente.

REFERÊNCIAS

- ABCC. **Estatística Nacional**. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: 09 janeiro 2014.
- ABCC; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA; GOVERNO FEDERAL. Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011. **Convênio ABCC/MPA: Nº 756578/2011**, p.11, 2013.
- ALMUZARA, M. et al. Genetic analysis of a PER-2-producing *Shewanella* sp. strain harbouring a variety of mobile genetic elements and antibiotic resistance determinants. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 11, p. 81-86. 2017.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- AMANN, R. I; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.
- ARANTES, R. F. **O efeito da relação carbono-nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação**. 2002. 39p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- AVISE, J.C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 371 – 379, 1998.
- AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering**, v. 34, p.172-178, 2006.
- AVNIMELECH, Y. Biofloc technology: A practical guide book, 2nd ed. Baton Rouge, Louisiana, USA: **World Aquaculture Society**, 272 p. 2012.
- BAIRD, D. J. et al. Aquaculture and water resource management. **Blackwell Science**, London, p.219, 1996.
- BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173–186, 2006.

- BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in veterinary science**, v. 115, p. 66-77, 2017.
- BARBIERI JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. Camarões Marinhos (Reprodução, Maturação e Larvicultura). **Aprenda Fácil Editora**, Viçosa, 2001.
- BOTHE, H. et al. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Review**, v.24, p.673-690, 2000.
- BOWMAN, J. P. **Genus XIII. Shewanella** Macdonell and Colwell. 1986, 355VP (Effective publication: MacDonell and Colwell 1985, 180). Edited by D. J. Brenner, N. R. Crieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 480–491. 2006.
- BOYD, C. E.; CLAY, J.W. "Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Superintensive Shrimp Aquaculture System". Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. **Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium**, p. 17, 2002.
- BRINK, A. J.; VAN STRATEN, A.; VAN RENSBURG, A. J. *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens* bacteremia. **Clin Infect Dis**, v.20, p.1327–1332. 1995.
- BROWDY, C. L. et al. IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. **Journal of Crustacean Biology**, v.13, p.87-94, 1993.
- BURFORD, M. A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v.232, p.525–537, 2004.
- BURGOS-HERNÁNDEZ, A., et al. *In vitro* studies of effects of aflatoxin B1 and fimonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.250, p. 399-410, 2005.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. **Aquaculture**, v. 472, p. 144-155, 2016.

CHABRILLÓN, M., et al. A. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Journal of Fish Diseases**. v. 28, p. 229–237. 2005.

CHAMBERLAIN, G. et al. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - II: Composition and nutritional value of organic detritus. **Global Aquaculture Advocate**, June, p. 23-24, 2001b.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase negative *Staphylococi* to plastic tissue cultures: a quantitative model for adherence of *Staphylococi* to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology** 22, 996-1006. 1985.

COENYE, T. Taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC 39, 3427-3436. 2001.

COLE, A. C.; SEMMENS, M. J. & LAPARA, T. M. Stratification of activity and bacterial community structure in biofilms grown on membranes transferring oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 1982–1989. 2004.

CORDERO, H. et al. Effects of *Shewanella putrefaciens* on innate immunity and cytokine expression profile upon high stocking density of gilthead seabream specimens. *Fish and Shellfish Immunology*, 51, 33–40, 2016.

COSTA, A. C. **Pesquisa de vibrio no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do ceará**. Fortaleza, UFCE. p.18. Dissertação (Ciências Marinhas Tropicais). 2006.

DANTAS, D., et al. Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.85-90, 2009.

DASH, P., et al. Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives. **Journal Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**. v. 25, p. 245-255. 2017.

DECAMP, O. et al. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 4, p. 345-355, 2003.

DECOSTERE, A. et al. Identification and pathogenic significance of *Shewanella* sp. from pond fish. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, 65(2), 82–85, 1996.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Capítulo 12 - Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. MIODRAG DARKO MATOVIC (Ed.), p.448. ISBN: 978-953-51-1106-1, InTech, DOI: 10.5772/53902. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-bft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-food-industry>. 2013.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured aquatic species information programme. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en>. Acesso em: 16 janeiro 2014

FAO/WHO. **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Argentina. 2001.

FAR, H. Z. et al. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.14, p.3369-3376, July. 2009.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura, testes de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: EMBRAPA, v.1, 2010.

FUHRMAN, J. A.; HERRIGAN, S. G.; CAPONE, D. G. Use of super(13)N as tracer for bacterial and algal uptake of ammonium from seawater. **Marine Ecology Progress Series**, v.45, p.271-278, 1988.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ed. 2º. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 309p. 2003.

GAUTHIER, G.; GAUTHIER, M.; CHRISTEN, R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. **International Journal of Systematic and Bacteriology**. 45,p.755–761, 1995.

- GERMANO, M. G. et al. RFLP Analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobial* strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Washington, DC. v.56, p. 217-229, 2006.
- GERVERS, D. et al. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, New York 3, 733-739. 2005.
- GEVERS, D. et al. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, New York. v.3, p. 733-739, 2005.
- GOUVEIA, C. K. Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. 2012.
- GRANGE, L. A. **Análise polifásica na reclassificação filogenética de *Rhizobium etli* e o estudo da diversidade genética de isolados dos cerrados brasileiros**. 153p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.
- GROSS, A. et al. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. **Aquaculture**, v. 223, p. 51-62, 2003.
- GULDHE, A. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: a biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 47-53, 2017.
- GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, p. 1-14, 2004.
- GURTLER, V.; STANISH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology (Reading)**, v.142, p.3-16, 1996.
- HAN, Z. et al. Isolation, identification and characterization of *Shewanella* algae from reared tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. **Aquaculture**, v. 468, p. 356-362, 2016.

- HAN, Z. et al. Isolation, identification and characterization of *Shewanella algae* from reared tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. **Aquaculture**. v. 1. p. 356-362. 2017
- HAO, K. et al. Effects of Dietary Administration of *Shewanella xiamenensis* A-1, *Aeromonas veronii* A-7, and *Bacillus subtilis*, Single or Combined, on the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Intestinal Microbiota. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. v. 9, p. 386-396. 2017.
- HAU, H. H.; GRALNICK, J. A. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p. 237-258. 2007.
- HAUBOLD, B.; WIEHE, T. **Introduction to Computational Biology. An Evolutionary Approach**. Textbook, 328p. Birkhauser, Basel. Ed. 1º, p. 1-12. 2006.
- HOPKINGS, J. S. et al. Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States. **Estuaries**, v.18, p.25-42, 1995.
- HOPKINGS, J. S.; VILLALON, J. Synopsis of industrial panel input on shrimp pond management. In: WINBAN, J.A. (Ed.). Proceedings of the special session on shrimp Farming. **World Aquaculture Society**, p.138-143,1992.
- HU, X. C. et al. Characterization of *Shewanella* sp. isolated from cultured loach *Misgurnus anguillicaudatus*. Israeli **Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 68, 1–9. 2016.
- HUDA, A. S. et al. Successful production in semi-biofloc in Indonesia. **Aquaculture Asia Pacific**, 2, 8–12. 2013.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.
- HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, n.4, p. 825-834, 1991.
- INTERAMINENSE, J. A. et al. *In vitro* and *in vivo* potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. **Aquaculture**. 2018.

- IVANOVA, E. P. et al. *Shewanella fidelis* sp. nov., isolated from sediments and sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 53, 577-582. 2003.
- JHA, A. K. Probiotic technology : an effective means for Bioremediation in shrimp farming ponds. **Journal of Bangladesh Academy of Sciences**, v. 35, p. 237-240, 2011.
- JU, Z. Y., FORSTER, I. P.; DOMINY, W. G. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, 292, 237–243, 2009.
- JUNG-SCHROERS, V. et al. Methods for identification and differentiation of different *Shewanella* spp. isolates for diagnostic use. **Journal of Fish Diseases**. p. 1-26. 2017.
- KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspective on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.
- KIM, D. et al. *Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2926–2931, 2007.
- KIM, K. et al. *Shewanella upenei* sp. nov., Lipolytic Bacterium Isolated from Bensasi Goatfish *Upeneus bensasi*. **The Journal of Microbiology**, v.49, n.3, p.381-386, 2011.
- KOBAYASHI, T., et al. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). **Japan Journal Bacteriology**. v.18, p.387-391, 1963.
- KONISHI, Y. et al. Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella algae*. **Journal of Biotechnology** 128, 648–653. 2007a.
- KONISHI, Y. et al. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 186–192. 2007b.
- KOSTKA, J. E. et al. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. **Clays Clay Miner**, v.44, p.522–529, 1996.
- KOZINSKA, A.; PEKALA, A. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish - a potential new pathogen of fish. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, 24, 189–193. 2004.

- LEQUETTE, Y.; GREENBERG, E. P. Timing and localization of rham- nolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 37–44. 2005.
- LI, K. et al. Bacterial community structure in intestine of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.47, n.4, p.649-653, 2007.
- LI, Z.; ZHANG, Q.; YANG, H. The effect of the probiotics to the shrimp ponds. **Aquacult China** [in Chinese], v. 5, p. 30-31, 1997.
- LIGHTNER, D. V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. 1996.
- LILLEY, D. M.; STILLWELL, R. J. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**. v.147, p.747–748. 1965.
- LLARIO, F. et al. Phytoplankton evolution during the creation of a biofloc system for shrimp culture. **International Journal of Environmental Science and Technology**. p. 1-12, 2018.
- LOBO, C., et al. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 probiotic supplementation as enhancer of Artemia n-3 HUFA contents and growth performance in Senegalese sole larviculture. **Aquaculture Nutrition**. v. 1, p. 548-561. 2017.
- LOEBMANN, D.; MAI, A. C. G.; LEE, J. T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil. **Revista Biologia Tropical**. v.58, n.3, p.909-923, 2010.
- LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 54, p. 1472–1480, 1988.
- LYRA, M. C. C. P. **Estudios genéticos y fisiológicos Del gen *nolT* de La región específica de cultivar, *nolxwbtuv*, de La bacteria de amplio rango de nodulación hh103 y SUS implicaciones em El sistema de secreción de tipo III (TTSS)**. Tese (Doutorado), Universidad de Sevilla, Sevilla, 2001.
- MACDONELL, M. T.; COLWELL, R. R. Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.6, p.171–182, 1985.

- MAJORS, P. D. et al. NMR methods for in situ biofilm metabolism studies. **Journal of Microbiology Methods**. v. 62. p. 337–344. 2005.
- MALUPING, R. P., et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from the Philippines by PCR-based methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n.2, p. 383–39, 2005.
- MARGULIES, M. et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. **Nature**. v.437, n.7057, p. 376–380, 2005.
- MARTIN, B., et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.20, n.13, p.3479-3483, 1992.
- MENDES, E. S., et al. *Vibrio spp.* isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco, **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.
- MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene a of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, n. 4, p. 315-32, 2006.
- MONTOYA, R.; VELASCO, M. O papel das bactérias nas estratégias de alimentação e de manejo em sistemas de aquicultura. **Revista da ABCC**, Recife, v. 2, n. 2, p. 22-23, agosto, 2000.
- MORENO-FIGUEROA, L. D., et al. Performance of a photo-heterotrophic, hypersaline system for intensive cultivation of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with minimal water replacement in lined ponds using a stochastic approach. **Aquaculture Research**. v. 49, p. 57-67. 2018.
- MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp Aquaculture with probiotic bacterial. Microbial interactions in aquaculture. Microbial Biosystems: New Frontiers. **Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology**. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1997.
- MORIARTY, D. J. W.; DECAMP, O.; LAVENS, P. Probiotics in aquaculture. **AQUA Culture AsiaPacific Magazine**. Sep/Out. p. 14-16. 2005.

- MUELLER, J.H.; HINTON, J. A protein-free medium for primary isolation of the *gonococcus* and *meningococcus*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 48, 330-333. 1941.
- MYERS, C. R.; NEALSON, K. H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. **Science**, v.240, p.1319–1321, 1988.
- NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish Shellfish Immunology**. v.29, p.2-14. 2010.
- NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A.H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**. v.416, p.10, 2013.
- NIMRAT, S. et al. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 443–450. 2012.
- NINAWA, A. S.; SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, n.1, p.43-66. 2009.
- OKABE, S. et al. Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic waste- water biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 5107–5116. 1999.
- OLIVEIRA, S. S. et al. Caracterização da assembleia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, Rio Grande, v.28,n.1. p. 33-45, 2006.
- OLIVEIRA, S. S. et al. Caracterização da assembleia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, Rio Grande 28, 33-45. 2013.
- OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1-12, 1994.
- OLSSON, J. C. et al. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Applied and Environmental Microbiology** 58, 551-55. 1992.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA)**. Curitiba, p. 171-173. 2007.

OSTRENSKY, N. A.; BARBIERI R. C. J. Camarões marinhos. **Aprenda fácil**, Viçosa, p.367, 2002.

PARK, S.C. et al. *Shewanella marina* sp. nov., isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59, 1888-1894. 2009.

PEKALA, A. et al. Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens* strains isolated from diseased freshwater fish. **Journal of Fish Diseases**, 38, 283–293, 2015.

PERRY, K. A. et al. Mediation of sulfur speciation by a Black Sea facultative anaerobe. **Science**, v.259, p. 801–803, 1993.

PETROVSKIS, E. A.; VOGEL, T. M.; ADRIAENS, P. Effects of electron acceptors and donors on transformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* MR-1. **FEMS Microbiol Lett**, v.121, p.357–364, 1994.

PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n.29, p.12-25, 2002.

PURIVIROJKUL, W. Application of Probiotic Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria in Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* culture. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.13, p. 187-196. 2013.

QIN, L., ZHU, M.; XU, J. First report of *Shewanella* sp. and *Listonella* sp infection in freshwater cultured loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture Research**, 45(4), 602–608, 2014.

RAY, A. J., DILLON, K. S.; LOTZ, J. M. Water quality dynamics and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production in intensive, mesohaline culture systems with two levels of biofloc management. **Aquacultural Engineering**, 45, 127–136, 2011.

ROCHA, I. P. A importância da aquicultura e da carcinicultura no contexto da produção mundial de pescado: Desafios e oportunidades para o Brasil. **Revista da ABCC**. Ano 15, n.2, p. 16-24, 2013.

SÁ, T. D. Projeto de carcinicultura Salina Nova Vida Beberibe/CE. Ceará Aquacultura Ltda. Estudo de Impacto Ambiental (EIA). **Geoconsult Consultoria, Geologia e Meio Ambiente**, Fortaleza, v. 1, tomo A, 2003.

SAIKI, R. K., et al. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution** 4, 406-425. 1987.

SALSA, L. C.; NEWMAN, M. M.; LILES M. R. Fluorescence In Situ Hybridization of Bacterial Cell Suspensions. doi: 10.1101/pdb.prot5493. **Cold Spring Harb protocol**, 2010.

SAMOCHA, T. M. et al. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and growout systems for *Litopenaeus vannamei*, **Aquacultural Engineering - Journal**, doi:10.1016/j, 2007.

SANTOS, E. C. B. **Desempenho produtivo do camarão cinza *Litopenaeus vannamei*, utilizando técnicas de povoamento direto e indireto**. Recife, UFRPE. 47p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura). 2009.

SATOMI, M. et al. Description of *Shewanella glacialis* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.347–352, 2007.

SATOMI, M.; VOGEL, B. F.; GRAM, L.; VENKATESWARAN, K. *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.243–249, 2006.

SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. 2ª edição. Ribeirão Preto. Editora e Sociedade Brasileira de Genética p. 13-15, 2007.

SEMPLE, K. M. & WESTLAKE, D. W. S. Characterization of iron-reducing *Alteromonas putrefaciens* strains from oil field fluids. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.366–371, 1987.

- SHAKIBAZADEH, S. et al. A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. v.11, n.4. p. 849-866. 2012.
- SHAKIBAZADEH, S. et al. Assessment of possible human risk of probiotic application in shrimp farming. **International Food Research Journal**, v.18, p. 433-437. 2011.
- SHAKIBAZADEH, S. et al. Evaluation of *in vitro* *Vibrio* static activity of *Shewanella algae* isolated from healthy *Penaeus monodon*. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.21, p.3952-3961, Nov. 2008.
- SHNIT-ORLAND, M.; SIVAN, A.; KUSHMARO, A. *Shewanella corallii* sp. nov., a marine bacterium isolated from a Red Sea coral. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.2293-2297, 2010.
- SILVA, A. L. S. **Estudos ecogenômicos e bioprospectivos de *Shewanella* spp.** Natal, UFRN, p.30. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). 2009.
- SIMIDU, U. et al. Taxonomy of Four Marine Bacterial Strains That Produce Tetrodotoxin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.331-336, 1990.
- SOUZA, D. M. et al. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. **Aquaculture Research**. v.43, p. 1828-1837. 2012.
- SRAVAN KUMAR, R. et al. *Shewanella fodinae* sp. nov., isolated from a coal mine and from a marine lagoon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.1649-1654, 2010.
- STEARNS, S. C.; HOEKSTRA, R. F. **Evolução: uma Introdução**. São Paulo: Atheneu Editora. ed. 1º, p. 240-250. 2003.
- STERM, M. J., et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v.37, n.3, p.1015-1029, 1984.
- TACON, A. G. J. et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**, v.8, p. 121-137, 2002.

- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** 28, 2731-2739. 2011
- TAMURA, K. et al. MEGA6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.
- TAMURA, K., et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** v.24, n.8, p.1596-1599. 2007.
- TAPIA-PANIAGUA, S. T. et al. Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms. **Aquaculture**, v.424–425, p.234–238. 2014.
- TEAL, T. K. et al. Spatiometabolic Stratification of *Shewanella oneidensis* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 11, p. 7324. 2006.
- TEAL, T. K. **Studies of the Spatial Organization of Metabolism in Shewanella oneidensis and Pseudomonas aeruginosa Biofilms**. Pasadena, California Institute of Technology. p.5. Tese (Doutorado em Biotecnologia). 2008.
- THOMPSON, J. D. et al. DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. **Nucleic Acids Research**, 28, 2919-2926. 2000.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific-gap penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.
- THORMANN, K. M. et al. Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. **Journal of Bacteriology**. v.188, n. 7, p. 2681–2691. 2006.
- TORTORA, G. J. **Microbiology: an introduction**. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 10th ed. p. 87. 2010.
- VAL-MORAES, S. P., et al. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.1, p.7-16, 2009.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological Reviews**, Washington, DC. v.60, n.2, p.407-438, 1996.

VENKATESWARAN, K. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.705–724, 1999.

VERSALOVIC, J., et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**. v. 5, n. 1, p. 25–40. 1994.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655–671, 2000.

WAAR, K. et al. Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**. v. 54, p. 937-944. 2005.

WASIELESKY, W. et al. Cultivo de camarões em sistema de bioflocos: realidade e perspectivas. **Revista ABCC**, Ano 15, n.2, p.30-36, 2013.

WASIELESKY, W. JR. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396–403. **Aquacultural Engineering**, 45, 127–136, 2006.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. Washington, DC. v.173, p. 97-703, 1991.

WEISBURG, W. G., et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **The Journal of Bacteriology**., v. 173, p. 697-703, 1991.

WERNER, E. et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p.6188–6196. 2004.

WHEELER, P. A.; KIRCHMAN, D. L. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. **Limnology and Oceanography**, v.31, p.998-1009, 1986.

- WHITCHURCH, C. B. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v.295, n.5559, p.1487, 2002.
- WHITMAN, W. B. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed, p. 1750, 2012;
- WICKINS, J. F. The tolerance of warm-water prawns to recirculated water. **Aquaculture**, v. 9, p. 19-37, 1976.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, DC. v.51, p.221-271. 1987.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC. v.87, p.4576-4579, 1990.
- XIAO, X. et al. *Shewanella psychrophila* sp. nov. and *Shewanella piezotolerans* sp. nov., isolated from west Pacific deep-sea sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, 60–65, 2007.
- XU, M. et al. *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.363–368. 2005.
- YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal *primers* and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. 61, 1104-1109. 1995.
- YANAGI, M.; YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 107, p. 115-120, 1993.
- YOON, J. H. et al. *Shewanella gaetbuli* sp. nov., a slight halophile isolated from a tidal flat in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.487–491, 2004.

YOSHIDA, A.; KURAMITSU, H. K. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (PgtfB:gfp) construct to monitor development. **Microbiology**. v.148, p.3385–3394. 2002.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**, New York, London, Chapman e Hall, 1991.

ZOBELL, J. Marine Research, 4:42. 1941.