Renata Stecca Iunes

Avaliação da influência do meio ambiente do sistema de berçário na imunidade
inata de Camarões, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

Renata Stecca Iunes

Avaliação da influência do meio ambiente do sistema de berçário na imunidade inata de Camarões, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

lunes, Renata Stecca.

Avaliação da influência do meio ambiente do sistema de berçário na imunidade inata de Camarões, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) / Renata Stecca lunes. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Imunologia de invertebrados.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the influence of the environment of the nursery system in innate immunity of shrimps, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

1. Camarão 2. Fagocitose 3. Explosão respiratória 4. Imunologia veterinária I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB013/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Stecca lunes.

Título da Dissertação: Avaliação da influência do meio ambiente do sistema de berçário na imunidade inata de Camarões, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

Orientador(a): Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 428/10 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação da influência do meio ambiente do sistema de berçário na imunidade inata de camarões *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)*" sob a responsabilidade de **Renata Stecca Iunes**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 05 de novembro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

A toda a minha família pelo apoio, e incentivo constantes. Amo vocês!
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ronaldo lunes e Maria Antônia Stecca lunes, pelo apoio, carinho e paciência e dedicação em todos esses anos de formação, e por me ensinar a ser crítica e sempre incentivarem minha curiosidade e lutar pelo que acredito, e sempre estarem por perto para responder as minhas dúvidas mesmo quando vocês não entendia exatamente o que eu queria saber e acabaram em uma saia justa, amos vocês.

As minhas irmãs Roberta Stecca lunes (Rô) e Rejane Stecca lunes (Jane) por estarem ao meu lado sempre, por serem minhas melhores amigas e estarem sempre prontas para ouvir um desabafo ou dar conselhos e opiniões, mesmo quando não tinham a menor ideia do que eu estava falando.

A minha sobrinha Vitória lunes de Almeida por me lembrar de como o mundo é mais interessante e fascinante vistos pelos olhos de uma criança, e por isso é bom olhar as coisas com os olhos de nossa criança interior para acharmos a beleza e incitar nossa curiosidade, algo que acredito que todo o pesquisador deve exercitar.

Aos meus avós Roberto lunes (*in memorian*) e Yvonne Harb lunes (*in memorian*) por acreditarem que eu era capaz de qualquer coisa, e consequentemente fazer com que eu acreditasse também, e por me mostrarem a importância da família, sinto muita a falta de vocês.

Ao meu tio Luiz Barco por ser um exemplo a ser seguido, uma constante fonte de inspiração e incentivos; a minha tia Maria Guilhermina Stecca Barco pela correção do português e carinho e aos dois e seus filhos (Lilian, Laura, Léa e Bruno) por me mostrarem desde pequena que pensar é a uma das coisas mais divertida e interessantes que podemos fazer e por me incentivarem as sempre questionar as coisa.

Ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva do Departamento de Biologia Celular e do desenvolvimento do ICB – USP, pela orientação, confiança, pelas conversas, sugestões e paciência.

Ao Prof. Dr. Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos do Departamento de Oceanografia Biológica do IO – USP pelos conselhos, apoio, críticas e colaboração nos cedendo os animais.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Antonio Ponce de Leon Ferreira de Carvalho da Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Escola Agrícola Jundiá da UFRN por montar os tanques de cultivo e nos ensinar como a fazer o biofoco.

Ao Pessoal da base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo em Ubatuba, SP, principalmente aos técnicos Caio Cesar Ribeiro e Ricardo Haruo Ota, por manter os animais e coletar os dados da qualidade da água durante todo o experimento.

A Doutoranda Paola Cristina Branco por me ser uma amiga para toda a hora, me ajudar na elaboração do projeto de pesquisa bem como nas coletas, por ter paciência para ouvir minhas lamentações, minhas frustrações, e sempre estar disposta a me oferecer um ombro amigo e uma perspectiva diferentes das coisas.

A Técnica Emilia Ribeiro pela ajuda na preparação das soluções, e por sempre estar disposta a tirar dúvidas em geral dos procedimentos feito no laboratório.

Ao Prof. Ms. Leandro Nogueira Pressinotti do Departamento de Ciências Biológicas do Campus Universitário de Cáceres da UNEMAT pelas conversas, dicas, conselhos e pela grande ajuda na estatística.

Ao pessoal do laboratório de histofisiologia evolutiva: Alfonso Braga Bartolini Salibeni Vivaí, Ana Paula da Silva, Andrews Krupinski Emerenciano Camila Lima Neves, Débora Alves Leite Figueiredo, Douglas Amaral dos Santos, Joana Mona e Pinto, João Carlos Shimada Borges, Karina Fernandes Oliveira Rezende, Lígia Maria Salvo, Ricardo Moraes Borges, Tania Cristina Lima, Yoel Rodríguez Pinto pela ajuda quando necessária, convivência, conversas, risadas e trocas de experiências.

A Prof^a. Dr^a. Marília Cerqueira Leite Seelaender do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB – USP e ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP pelas dicas e sugestões na qualificação.

Ao Gaspar ferreira de Lima do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB – USP pela ajuda no processamento e obtenção dos cortes ultrafinos para microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Edson Rocha de Oliveira do setor de Microscopia eletrônica do ICB- USP por ajudar na obtenção das eletromicrografias.

A Prof^a. Dr^a. Heloiza Ramos Barbosa do Departamento de Microbiologia do ICB – USP por nos ajudar a isolar as bactérias do biofloco.

A equipe de secretárias do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB – USP Celiana Marchiori (Celi), Ana Lúcia Teixeira de Lima Mota (Ana), Eloise Piva Cícero de Sá (Elo), Regina Cássia Valbom pela disposição em sempre tirar dúvidas e apoio referente as burocracia e papelada durante todo o mestrado.

A FAPESP pelo apoio financeiro (2010/04293-4).

“Para cada coisa que acredito saber, dou-me conta de nove que ignoro”.
Ditado Árabe

“La sapienza è figlia dell'esperienza.”
(A sabedoria é filha da experiência).
Leonardo Da Vinci

RESUMO

lunes RS. Avaliação da influência do meio ambiente do sistema de berçário na imunidade inata de Camarões, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A aquicultura sofre diferentes pressões por um lado o impacto que as doenças causam na produção, e por outro a pressão por parte de grupos ambientalistas e do governo devido ao impacto ambiental. Diferentes soluções foram propostas para esses problemas como probióticos e imunoestimulantes para prevenir e controlar doenças com nenhum ou algum sucesso. Outra opção seria o biofloco para minimizar o impacto ambiental, com excelentes resultados zootécnicos. Porém, não sabemos se o sistema de biofloco estimula ou inibe o sistema imune de camarões (*Litopenaeus vannamei*). Esse é o objetivo desse estudo, saber se o sistema de biofloco altera a contagem total e diferencial de hemócitos, os índices fagocíticos, utilizando ensaio de fagocitose *in vitro* com *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de ânion superóxido pelo ensaio de *Nitroblue tetrazolium* (NBT). Na contagem total de hemócitos nos 2 primeiros meses os animais criados em água clara possuem uma contagem maior que os criados em biofloco enquanto que no 4º mês os animais de biofloco possuem uma contagem maior. Na contagem diferencial no 4º mês as células hialinas estão em maior porcentagem nos animais criados em biofloco enquanto que as granulares e simi-granulares estão em menor porcentagem nesses animais, quando comparamos com os animais criados em água clara. Os índices fagocíticos e a produção de ânion superóxido não apresentam diferença entre os animais criados em água clara e os criados em biofloco.

Palavras-chave: Camarão. Fagocitose. Explosão respiratória. Imunologia veterinária.

ABSTRACT

lunes RS. Evaluation of the influence of the environment of the nursery system in innate immunity of shrimps, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). [Masters thesis (Cell Biology and Tissue)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The aquaculture production suffers different pressure in one hand disease, and in the other its environment impact. Different solutions are offered to solve this problems such as probiotics and immunostimulant to prevent and control the diseases with some or no success. Another option is the biofloc to minimize its environmental impact, with excellent results to zootechnical characteristics. But it is not known whether biofloc stimulate or inhibits the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) immune system. That is what our study aim to answer if the biofloc system affects or not the total and differential hemocytes count, the phagocytic indexes of *in vitro* phagocytosis with *Saccharomyces cerevisiae* and the production of superoxide anion with the Nitroblue Tetrazolium (NBT) assay. At the first 2 month the animal rare in clear water had a higher total hemocyte count, while it was higher in the animals rare in the biofloc at the 4th month. At the 4th month the hyalines cells had a higher concentration in animals rare at biofloc system, while the granular and semigranular cells had a lower concentration in this animals when compared with the ones rare at the clear water system. The phagocytic indexes and the production of superoxide anion did not have any difference between animals rare at clear water system and biofloc system.

Keywords: Shrimp. Phagocytosis. Oxidative burst. Veterinary immunology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC- Associação Brasileira de Criadores de Camarão

C: N- Carbono-nitrogênio

Cl^- - Hipoclorito

COD- Carbono orgânico dissolvido

DMSO- Dimetilsulfóxido

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HOCl - Ácido hipocloroso

KCl- Cloreto de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

LPS - Lipopolissacarídeo

MPA- Ministério da Pesca e aquicultura

NaCl – Cloreto de sódio

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotideo fosfato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotideo fosfato + Hidrogênio

NaHCO_3 – Bicarbonato de sódio

NID- Nitrogênio inorgânica dissolvido

NOD- Nitrogênio dissolvido

O_2^- - Ânion superóxido

OH^- - Radical hidroxila

PBS- Solução tampão de fosfato (Phosphate buffer solution)

proPO – Sistema pro-fenoloxidase (pro-phenoloxidase system)

VHS- Solução de VAN Harreveld (Van Harreveld's solution)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema dos sistemas de água clara e biofoco.	18
Figura 2- Esquema das etapas da fagocitose e da explosão respiratória.	25
Figura 3 - Fotografia dos Tanques onde os animais foram mantidos na base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, SP.	27
Figura 4 – Fotografia da biometria de camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> de 6 meses de idade.	29
Figura 5 – Fotografia da retirada de hemolinfa.....	30
Figura 6 – Gráfico das médias da temperatura da água.	33
Figura 7 – Gráfico das médias de oxigênio dissolvido na água.....	34
Figura 8 – Gráfico da Saturação de oxigênio dissolvido.	34
Figura 9 – Gráfico do pH da água.	35
Figura 10 – Gráfico da salinidade da água.....	35
Figura 11 – Gráfico da Concentração de amônia da água.....	36
Figura 12 - Gráfico da quantidade de biofoco.....	36
Figura 13- Gráfico do tamanho dos animais	38
Figura 14 - Gráfico do peso dos animais.....	39
Figura 15 - Gráfico com número total de hemócitos.....	40
Figura 16 - Gráfico da capacidade fagocítica das células hialinas após 1 hora de fagocitose.....	42
Figura 17 - Gráfico da capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose.....	43
Figura 18 - Gráfico da capacidade fagocítica das células granulares após 1 hora de fagocitose.....	44
Figura 19 - Gráfico da capacidade fagocítica das células granulares após 3 horas de fagocitose.....	45
Figura 20 - Gráfico da capacidade fagocítica dos hemócitos após 1 hora de fagocitose.....	46
Figura 21 - Gráfico da capacidade fagocítica dos hemócitos após 3 horas de fagocitose.....	47
Figura 22 - Gráfico do índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose.....	48
Figura 23 - Gráfico dos índices fagocíticos das células hialinas após 3 horas de fagocitose.....	49
Figura 24 - Gráfico dos índices fagocíticos das células granulares após 1 hora de fagocitose.....	50
Figura 25 - Gráfico dos índices fagocíticos das células granulares após 3 horas de fagocitose.....	51
Figura 26 - Gráfico do índice fagocítico de hemócitos após 1 hora de fagocitose.	52
Figura 27 - Gráfico do índice fagocítico de hemócitos após 3 horas de fagocitose...53	
Figura 28 - Gráfico da produção de ânion superóxido nos diferentes sistemas.	54

Figura 29 - Eletromicrografia dos hemócitos.....	55
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Produção de Camarão	16
1.2 Sistema Heterotrófico	17
1.3 Sistema Imune de Crustáceos	20
1.3.1 Células do Sistema Imune	22
1.3.2 Fagocitose	23
1.3.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	24
2 OBJETIVO	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção e Manutenção dos Animais	27
3.2 Biofoco	28
3.3 Isolamento e Identificação das Bactérias	28
3.4 Coleta da Hemolinfa e Contagem Absoluta e Diferencial de Hemócitos	29
3.5 Fagocitose e Índices Fagocíticos	30
3.6 Produção de Ânion Superóxido	31
3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
3.8 Análise Estatística dos Resultados	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Qualidade da Água	33
4.2 Isolamento e Identificação das Bactérias	37
4.3 Tamanho e Peso dos Animais	37
4.4 Contagem Total e Relativa de Hemócitos	39
4.5 Índices Fagocíticos	41
4.6 Produção de Ânion Superóxido	53
4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão	54
5 DISCUSSÃO	56
5.1 Qualidade da Água	56
5.2 Isolamento e Identificação das Bactérias	56
5.3 Tamanho e Peso dos Animais	57
5.4 Contagem Total e Relativa de Hemócitos	58
5.5 Índices Fagocíticos	60

5.6 Produção de Ânion Superóxido	63
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A – Relatório da Identificação das bactérias	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção de Camarão

A aquicultura continua sendo o setor de produção de alimentos de origem animal que cresce mais rapidamente que o crescimento populacional, com um aumento de suprimento per capita de 0,7 Kg em 1970 para 7,8 Kg em 2008, uma média de crescimento anual de 6,6% (Food and Agriculture Organization (FAO), 2010).

Entre 1987 e 1997, a produção mundial de pescado cultivado mais que dobrou em volume e valor, devido ao declínio dos estoques pesqueiros marinhos (Naylor et al., 2000). Em 2010, a produção de pescado mundial foi de 148,5 milhões de toneladas (t), dessas, 59,9 milhões são do cultivo em águas interiores e marinhas (sendo 18,1 em águas marinhas) (FAO, 2012). Dados preliminares da FAO (2012) estimam que a produção de pescado mundial em 2011 foi de 154 milhões de t, sendo que 19,3 t foram produzidas pela aquicultura marinha.

A aquicultura existe no Brasil desde o início do século 20. No início dos anos 90, a produção era de aproximadamente 30.000 t e aumentou para 176.531, em 2000 e para 246.183 em, 2002 (FAO, 2004; Brasil, 2012); já em 2007, a produção foi de 289.648 t gerando uma renda de US\$ 597.975 (FAO, 2007).

Em 2010, no Brasil, a pesca e a aquicultura produziram um volume de 785.366 t de pescado, dos quais a aquicultura contribuiu com 479.398 t. Desse valor, a aquicultura marinha contribuiu com 85.058,6 t (Brasil, 2012).

A aquicultura marinha no Brasil consiste basicamente da malacocultura e carcinicultura. A região nordeste foi responsável por 79,2% (67.327,9 t) da produção da aquicultura brasileira em 2010, enquanto que as regiões sul, sudeste e norte foram responsáveis pelos outros 20,8% (17.730,8 t). (Brasil, 2012)

As fazendas de camarão começaram no Brasil durante a década de 1980, mas apenas após a introdução do *Litopenaeus vannamei*, a indústria viveu um período de rápido desenvolvimento (FAO, 2004; Ostrensky et al., 2008). A maioria das fazendas é de pequena escala (75%), seguidas pelas de médio porte (9,6%) e de grande escala (5,52%). A produção média aumentou de 1.015 kg/ha/ano, em 1997,

para 6.084 kg/ha/ano em 2003, contra a média mundial de 958 kg/ha/ano (FAO, 2004).

A Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) afirma que existiam 18.500 ha de tanques de camarão produzindo 65.000 toneladas, em 2009 (ABCC, 2012). Brasil (2012) os principais produtores de camarão são o Rio Grande do Norte e o Ceará e a produção total de camarão em 2010 foi de 69.422,4 t.. A exportação brasileira de camarão até maio de 2012 atingiu o volume de 16.198 t (ABCC, 2012).

A carcinicultura no Brasil gera mais empregos por hectares que culturas de frutas. Em muitas cidades é a primeira oportunidade de emprego para muitos trabalhadores destituídos de qualificação. Produz 3,75 trabalhos diretos e indiretos por hectare e estima-se que em 2003, 50.000 pessoas estavam empregadas nas fazendas de camarão (FAO, 2004).

No Brasil, os camarões são produzidos em tanques escavados variando de 10 ha a 1.000 há, dependendo da fazenda. Destas, 98% utilizam bandejas para alimentação, 95% fazem o tratamento do solo dos tanques, 85% avaliam os parâmetros da água, 71% utilizam arejadores, 55% utilizam berçários antes de transferir os animais para tanques de engorda. Algumas fazendas trabalham com água recirculada, sem troca de água durante a estação de crescimento de 3 meses. A produção de camarões orgânicos também está atraindo a atenção de algumas copmanhias, que estão conseguindo a certificação, utilizando baixa densidade de estoque e um sistema integrado de cultivo com peixe, ostras, camarões e algas (FAO, 2004).

1.2 Sistema Heterotrófico

A carcinicultura é um agronegócio importante nas áreas tropicais e subtropicais em várias partes do mundo, porém, existem preocupações quanto à sustentabilidade ambiental da atividade, uma vez que as águas de descarga das fazendas podem resultar na modificação dos ecossistemas adjacentes (Naylor et al., 2000).

Para melhorar a sustentabilidade e a biossegurança da atividade, têm sido desenvolvidos sistemas de cultivos com altas densidades de estocagem sem renovação de água. Essa tecnologia vem sendo desenvolvida nos Estados Unidos desde a década de 1990 (Browdy et al., 2001; Hopkins et al., 1995; Hopkins et al., 1996). Reduzir a renovação de água ou não renovar a água é uma técnica essencial

da carcinicultura moderna e ambientalmente responsável, para maximizar a biossegurança e minimizar os impactos ambientais externos que a carcinicultura causa (Avnimelech, 2011). A figura 1 esquematiza os sistemas de água clara e o de bioflocos. Essa técnica beneficia o produtor, pois reduz os custos de bombeamento e a possibilidade de introduzir compostos tóxicos, patógenos, vetores de doenças ou outros organismos indesejáveis na fazenda, além de reduzir as descargas de nutrientes e de matéria orgânica das fazendas (FAO, 2006).

Figura 1 - Esquema dos sistemas de água clara e bioflocos.

Na figura A, vemos um esquema do sistema de água clara onde há acúmulo de matéria orgânica não utilizada (C,N) , fazendo que seja necessária a utilização de um fluxo contínuo de água para que eles não se acumulem; já na figura B, esquema do sistema de bioflocos esta troca constante de água não é necessária já que as bactérias utilizam essa matéria orgânica e a amônia produzida pelos animais em seu metabolismo, fazendo com que o sistema fique em equilíbrio, embora seja necessária a adição de fontes de carboidratos.

Nos sistemas sem renovação de água, há um acúmulo de matéria orgânica e consequente diminuição do oxigênio dissolvido, fazendo com que seja necessário uma arejamento artificial, estimulando a formação de uma biota predominantemente aeróbica e heterotrófica, a partir da fertilização com fontes ricas em carbono orgânico e da arejamento constante do ambiente de cultivo (Emerenciano et al., 2007; Schryver et al., 2008; Wasielesky et al., 2006). Esse sistema apresenta diversas vantagens, como reduções do uso de água e menor risco de introdução e disseminação de doenças, possibilidade do uso de dietas com níveis reduzidos de proteína, além do incremento significativo da produção.

Vários autores têm demonstrado resultados satisfatórios em termos de produção e eficiência de retenção do nitrogênio, ao adicionarem fontes de carbono

orgânico (açúcar, melão, amido de mandioca etc.) com manutenção de um sistema de arejamento para estimular o desenvolvimento de bactérias heterotróficas em viveiros de camarão (Avnimelech, 1999; Burford et al., 2003, 2004; Hari et al., 2004).

Diversos experimentos observam a redução nos níveis de nitrito, nitrato e amônia em tanques de biofloco quando comparados com sistema de água clara, além de um maior ganho de peso dos animais, ou seja, uma melhor taxa de conversão alimentar é observada nos animais criados em sistema de biofloco (Megahed, 2010; Zhao et al., 2012). Segundo Ray et al. (2009), após o estabelecimento do biofloco a qualidade da água é extremamente estável.

Os flocos bacterianos são formados durante o ciclo de produção e constituem-se, principalmente, de bactérias, microalgas, excrementos, exoesqueletos, restos de organismos mortos, cianobactérias, protozoários, pequenos metazoários e formas larvais de invertebrados, entre outros (Burford et al., 2003; Wasielesky et al., 2006). Essas partículas microbianas floculadas possuem elevados níveis de proteínas, aminoácidos e outros elementos alimentares essenciais (Burford et al., 2004; Tacon, 2003).

Com arejamento constante, o floco bacteriano se desenvolve e estabelece elevada relação de carbono orgânico dissolvido (COD) / nitrogênio orgânico dissolvido (NOD), que promove a diminuição da matéria orgânica, reduz o nitrogênio inorgânico dissolvido (NID) e a necessidade de ração, a partir da produção de proteína microbiana (Avnimelech, 1999; Browdy et al., 2001; Megahed, 2010).

Avnimelech (1999) sugeriu que rações para *Penaeus monodon* com 30% de proteína poderiam ser substituídas por rações com 20,48%, apenas com um suplemento de hidrato de carbono, favorecendo o fluxo de amônia para a proteína microbiana, estabelecendo uma relação de 15,75:1 de carbono:nitrogênio (C:N). Para aperfeiçoar a produção dos flocos, consequentemente, a retenção dos nutrientes na biomassa bacteriana, Schneider et al. (2005) recomendam uma relação C:N no substrato de aproximadamente 15:1. Burford et al. (2003) corroboram informando que a relação C:N deve situar-se acima de 10. Wasielesky et al. (2006) sugerem que a relação C:N ideal para formação dos flocos microbianos, com predomínio de bactérias heterotróficas, situa-se entre 14 e 30:1, mas até o presente momento estudos de como o biofloco afeta o sistema imune desses animais são escassos.

Kim et al. (2012) acreditam que o biofloco possua muitos imunostimulantes. Após determinar a expressão de seis genes relacionados à imunidade de *L. vannamei* criado em sistema heterotrófico (Jang, 2012) sugere que o sistema heterotrófico tem um efeito positivo no sistema imune de camarões.

1.3 Sistema Imune de Crustáceos

Por não ter sistema imune adaptativo, animais invertebrados desenvolveram outros tipos de defesa chamada imunidade inata (Iwanaga, Lee, 2005). A imunidade inata, também chamada de inespecífica, é filogeneticamente falando um mecanismo de defesa mais antigo quando comparado com a imunidade adquirida e é comum a todos os organismos multicelulares representando a primeira linha de defesa (Bols et al., 2001; Lee, Söderhäll, 2002). Pode ser definida como o conjunto de mecanismos de defesa que protege o organismo contra infecções, sem depender de nenhuma exposição prévia a nenhum tipo de microrganismos (Bols et al., 2001). A resposta imune dos invertebrados consiste em reações celulares como a fagocitose, encapsulação e/ou formação de nódulos e de reações humorais (Hauton et al., 2006), assim como a produção de peptídeos antimicrobiais, coagulação da hemolinfa, formação de melanina, ativação do complemento mediado pela lecitina, produção de espécies reativas de oxigênio e ativação do sistema pro-fenoloxidase (pro-PO) (Iwanaga, Lee, 2005). Isso faz com que os invertebrados mesmo não produzindo anticorpos e sem ter uma memória imune, tenham mecanismos suficientes para se proteger de microrganismos invasores. Isto adicionado ao fato de eles terem uma cutícula os recobrindo, que serve como uma barreira mecânica e a capacidade de produzir uma rápida resposta imune durante infecções (Lee, Söderhäll, 2002).

Segundo Bachère et al. (2004), o ambiente aquático nos quais o camarão vive é rico em uma variedade de microrganismos, protozoários, microalgas, fungos, leveduras e bactérias. Alguns deles constituem a microflora interna dos camarões e vivem como comensais. E, portanto, os camarões desenvolveram sistemas para distinguir os microrganismos benéficos fisiologicamente daqueles que poderiam ser nocivos ou patogênicos. Logo, na natureza os animais devem entrar em equilíbrio com o meio ambiente e o sistema imune é capaz de manter as infecções sob controle, porém, em aquicultura os animais são submetidos a um ambiente

estressante e condições ecológicas que dificultam sua homeostase como: alta densidade populacional, diminuição da qualidade da água, desbalanço nutricional todas as condições que favorecem o aparecimento de doenças (Bachère et al., 2004).

Crustáceos decápodos têm o sistema circulatório aberto que é usado tanto para a circulação de células sanguíneas como para a distribuição de nutrientes e hormônios para o corpo (Bachère et al., 2004).

Doenças infecciosas e não infecciosas são uns dos limitantes da carcinicultura mundial (Bachère et al., 2004). Os vírus são os patógenos enzoóticos mais sérios para camarões. Infecções bacterianas são um problema nas larviculturas. Segundo Martin et al. (1987), os hemócitos de crustáceos possuem diversas funções fisiológicas e patológicas, como coagulação, fagocitose, reconhecimento de corpos estranhos, transporte de carboidratos e encapsulação. Três populações principais são identificadas nos hemócitos de crustáceos, baseados na presença de grânulos citoplasmáticos: Hialinas, granulares (com grânulos grandes) e semigranulares (com grânulos pequenos). Combinando características morfológicas, citoquímicas e estudos funcionais, duas grandes linhagens foram demonstradas em camarões hemócitos hialinos envolvidos no processo de coagulação e hemócitos granulares ativo na fagocitose, encapsulação e armazenamento do sistema pro-fenoloxidase (Bachère et al., 2004; van de Braak et al., 2002). Heng e Lei (1998) observaram a ultraestrutura de hemócitos de *Litopenaeus vannamei* e identificaram 3 tipos de hemócitos: células hialinas, células com grânulos pequenos e células com grânulos grandes, confirmando os achados de Martin e Graves (1985) em duas espécies diferentes de paneídeos.

Segundo Bachère et al. (2004), existem duas fases distintas na resposta imune de camarões: a primeira corresponde a aproximadamente as primeiras 12 horas após o desafio, que é caracterizada pela diminuição de hemócitos circulantes que migram da circulação sanguínea para os tecidos lesados por quimiotaxia; durante a segunda fase (cerca de 48 a 72 horas após o desafio), observa-se uma reação sistêmica com grande acúmulo de hemócitos, enquanto que o número de hemócitos na circulação sanguínea volta quase aos padrões normais.

Após alguns minutos em contato com bactérias, os grânulos dos hemócitos demonstram alterações marcantes em sua forma e morfologia, sugerindo a liberação

de seu conteúdo para o citoplasma. Esse fenômeno é seguido pela lise e morte dos hemócitos (Bachère et al., 2004).

1.3.1 Células do Sistema Imune

Dentre as células da hemolinfa, também chamadas de hemócitos, as células hialinas (ou agranulócitos) são os menores dos hemócitos, não possuem grânulos elétrons densos, possuem um tamanho médio de 11,11 μm X 6,96 μm , e representam 25,8% dos hemócitos. Possuem uma alta relação núcleo:citoplasma: o núcleo é ovoidal e é constituído metade por eucromatina e metade por heterocromatina. O citoplasma contém retículo endoplasmático rugoso e liso e grande quantidade de ribossomos livres; possuem mitocôndrias com cristas lamelares e uma quantidade bem menor de complexos de Golgi, algumas pequenas vesículas, com apenas uma camada envolvendo-as, são vistas no citoplasma (Heng, Lei, 1998; Martin, Graves, 1985).

Células hialinas promovem a coagulação da hemolinfa pela rápida citólise e consequente liberação de fatores citoplasmáticos como as transglutaminases, que são responsáveis pela ligação entre os fatores coagulantes do plasma (Bachère et al., 2004; Hose, Martin, 2011), com a fagocitose (Muñoz et al., 2000).

As células granulares consistem em 16,1% dos hemócitos e possuem tamanho médio de 12,51 μm X 8,99 μm , seu citoplasma está repleto de grânulos elétrons densos com diâmetro médio de 1,35 μm e possuem um núcleo relativamente pequeno. Possuem muito mais retículo endoplasmático rugoso e liso, também possuem mitocôndria, ribossomos livres e vesículas no citoplasma e nenhum complexo de Golgi (Heng, Lei, 1998; Martin, Graves, 1985). Estão envolvidos com armazenamento do sistema proPO (Bachère et al., 2004; Gargioni, Barracco, 1998; Lee, Söderhäll, 2002), encapsulação (Bachère et al., 2004), e fagocitose (Gargioni, Barracco, 1998; Hose, Martin, 2011; Sung, Sun, 2002).

As células semigranulares são o tipo de hemócito mais abundante, representando 58,1% dos hemócitos, contém pequenos grânulos elétrons densos com subestruturas homogêneas (e por isso também chamadas de hemócito de grânulos pequenos), possuem tamanho médio de 10,78 μm X 8,63 μm . Seus grânulos na maioria são redondos com diâmetro médio de 0,52 μm . Têm uma baixa razão núcleo:citoplasma quando comparadas com as células hialinas e o contorno

do núcleo é mais convoluto, o citoplasma também contém mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e liso, ribossomos livres, vesículas e complexos de Golgi. (Heng, Lei, 1998; Martin, Graves, 1985). Estão envolvidas com armazenamento do sistema proPO (Bachère et al., 2004; Gargioni, Barracco, 1998; Lee, Söderhäll, 2002), e fagocitose em diferentes espécies de paneídeos (Gargioni, Barracco 1998; Hose, Martin 2011; Rodriguez et al., 1995).

1.3.2 Fagocitose

Como um processo filogeneticamente conservado que envolve a internalização de bactérias e vírus, a fagocitose tem um papel essencial na defesa dos organismos através da ingestão e destruição de patógenos (Cardelli, 2001; Zong et al., 2008). Corpos estranhos detectados pelo sistema fagocítico são engolfados por fagócitos como células parecidas com macrófagos, neutrófilos e células dentríticas, são internalizados como fagossomos e então mortos (Iwanaga, Lee, 2005). A atividade fagocítica pode servir como indicador das variações da resposta imune inespecífica dos peixes em função de diversos fatores bióticos e abióticos (Borges et al., 2002).

A fagocitose se inicia com o reconhecimento de partículas e a ligação destas aos receptores celulares de membrana (Cardelli, 2001; Cossart, Sansonetti, 2004). Esse reconhecimento desencadeia uma cascata de sinalização que leva ao engolfamento e internalização da partícula formando o fagossomo que irá formar o fagolisossomo. Os animais utilizam esse mecanismo para se defenderem de microrganismos patógenos em algumas fases do desenvolvimento (Wu et al., 2008). A figura 2 esquematiza as etapas da fagocitose, bem como as da explosão respiratória que é um dos mecanismos que as células utilizam para eliminar patógenos e que será discutido mais adiante.

Portanto, a utilização de índices fagocíticos é bastante útil como um método na avaliação do estado de saúde de peixes (Jensch-Junior et al., 2006). Dos esforços decorrentes da fagocitose, devemos destacar a capacidade de matar os patógenos (capacidade germicida). Muitos estudos mostram que os fagócitos possuem potentes agentes microbicidas, com mecanismos intra e extracelulares (Beck et al., 2002; Belp et al., 1996; Ellist, Barrett, 1982; Mangiaterra, Silva, 2001). Sendo assim, o estudo da atividade fagocítica e da capacidade germicida são

importantes para a obtenção de parâmetros sobre a imunidade inespecífica celular de peixes.

1.3.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) são necessários para a manutenção e regulação da homeostase (Ames et al., 1993), assim como para mecanismos de sinalização e funções celulares como secreção, crescimento e expressão gênica (Halliwell, Gutteridge, 1997), porém, o aumento de sua produção pode causar uma mudança no balanço entre oxidantes e antioxidantes, favorecendo os oxidantes, causando um dano oxidativo em biomoléculas importantes, como DNA lipídios e proteínas (Chang et al., 2009).

A produção de espécies reativas de oxigênio é uma resposta metabólica a microrganismos, já que alguns desses compostos são tóxicos às células (Holmblan, Soderhall, 1999), causando danos citados anteriormente. Um complexo de enzimas ligado à membrana das células, NADPH oxidase, é montado depois da ligação das células com materiais que não pertencem ao organismo reduzindo o oxigênio molecular em superóxido (Chanockf, Bennis, 1994).

A eliminação de partículas fagocitadas envolve a liberação de enzimas degradativas dentro do fagossomo e uma série de intermediários reativos do oxigênio como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O), que possuem grande capacidade microbicida. Esse processo é chamado de explosão respiratória e o ânion superóxido é seu principal produto (Lin et al., 2008). Esse mecanismo foi descrito pela primeira vez em crustáceos por Bell e Smith (1993) em *Carcinus maenas*.

Figura 2- Esquema das etapas da fagocitose e da explosão respiratória.

Fagócito e microrganismo (1), através da quimiotaxia a célula se aproxima de um microrganismo, para engolfá-lo (2), internalizando-o e formando o fagossomo (3), o fagossomo se funde com o lisossomo formando o fagolisossomo (4), ocorre a morte do microrganismo ou através das enzimas do lisossomo ou pela explosão respiratória (5) como é o caso no esquema. O complexo NADPH oxidase (A) remove o hidrogênio da molécula de NADPH resultando em uma molécula de NADP^+ e uma de hidrogênio (H^+) e simultaneamente convertendo 2 moléculas de oxigênio (O_2) em 2 moléculas de ânion superóxido (O_2^-), que por possuir um elétron não partilhado é extremamente reativo e tóxico, a superóxido dismutase (B) reage com o ânion superóxido convertendo em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), o peróxido de hidrogênio pode gerar radical hidroxila (OH^-) e oxigênio ou ser degradado pela mieloperoxidase (C) na presença de hipoclorito (Cl^-) formando ácido hipocloroso (HOCl) e água. Após a morte do microrganismo seus restos são eliminados da célula (6)

2 OBJETIVO

Avaliar como o sistema de criação de biofloco afeta o sistema imune de camarões, comparando o índice fagocítico, a capacidade fagocítica e a produção de ânion superóxido de hemócitos de camarões criados em sistema de cultivo de água clara e biofloco.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e Manutenção dos Animais

Pós-larvas de camarões *Litopenaeus vannamei* foram adquiridas da empresa *Aquatec Ltda, Canguaretama, RN*, e foram mantidas em tanques, da base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, em Ubatuba, SP. Após um período de aclimação os animais foram divididos em 6 tanques (figura 3) com 110 cm de diâmetro e com um aproximadamente 300 L de água, 65 camarões em cada tanque (3 com água clara e renovação constante de água (4l/ minuto), e 3 com biofoco). Os parâmetros da água (temperatura, salinidade, pH, amônia, oxigênio dissolvido e saturação de oxigênio) foram monitorados semanalmente. Os animais foram alimentados com 7 g de ração para camarões marinhos (Potimar 38 Active - Guabi®) (Tabela1), dividido em 8 vezes.

Figura 3 - Fotografia dos Tanques onde os animais foram mantidos na base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, SP.

. A) tanques de água clara, (B) interior do tanque de água clara, (C) tanques de biofoco, setas brancas conta gotas com melaço, (D) interior do tanque de biofoco.

Tabela 1 - Níveis garantidos em rótulo pela Guabi® para a ração Potimar 38 Active.

NÍVEIS DE GARANTIA

Proteína (min.)	38,0%
Fibra (28 máx.)	5,0%
Gordura (min.)	7,5%
Fósforo (min.)	1,45%
Cálcio (máx.)	3,0%
Vitamina A	13.000 UI/Kg
Vitamina D3	2.500 UI/Kg
Vitamina E	200 mg/Kg
Vitamina C	500 mg/Kg
Selênio	0,3 mg/Kg
Cromo	0,2 mg/Kg

Fonte: Guabi (2011).

3.2 Biofloco

Nos tanques de biofloco junto com a ração foram colocados 3,5 g de melaço por dia (figura 3, setas brancas) e o biofloco foi produzido a partir das bactérias existentes no tanque, não foram adicionadas algas. No início os, compostos nitrogenados foram monitorados diariamente e quando atingiam níveis próximos aos tóxicos, 5% da água do tanque era trocada.

3.3 Isolamento e Identificação das Bactérias

Para a identificação das bactérias, 50 ml de uma mistura de águas dos 3 tanques de biofloco foi resfriada a 4 °C, por 24 horas. Após esse período, as bactérias foram isoladas no laboratório de fisiologia de microrganismos do departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com a colaboração da Profª. Drª. Heloiza Ramos Barbosa, onde 300 µl das águas de biofloco foram colocados em 4 tipos de meios diferentes (caldo glicosado, caldo nutriente, caldo sintético e TSB) a 28 °C por 24 h. Após esse período cada meio foi semeado em Agar nutriente a 28 °C por 24 h, foi feita uma

coloração de Gram em uma amostra de cada colônia para se identificar as diferentes colônias e elas eram novamente semeadas em Agar nutriente a 28 °C, por 24 horas até que só tivesse um tipo de bactéria crescendo na placa. As placas com as colônias isoladas foram enviadas para identificação por sequenciamento, no Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas biológicas e agrícolas da Universidade de Campinas.

3.4 Coleta da Hemolinfa e Contagem Absoluta e Diferencial de Hemócitos

Antes da retirada da hemolinfa, todos os animais foram medidos e pesados (figura 4 e 5) para a contagem diferencial e total dos hemócitos sob microscopia de luz nos, 4 quadrantes externos (Borges et al., 2002).

Figura 4 – Fotografia da biometria de camarão *Litopenaeus vannamei* de 6 meses de idade.

Um camarão (*Litopenaeus vannamei*) de 6 meses de sendo medido (A), e pesado (B).

Figura 5 – Fotografia da retirada de hemolinfa.

Retirada de 150 µL de hemolinfa do primeiro segmento abdominal..

3.5 Fagocitose e Índices Fagocíticos

Alíquotas de 100 µL de hemolinfa foram colocadas sobre lâminas de vidro por 1 hora em câmara unida, após esse prazo as lâminas foram lavadas com tampão PBS (0,015 M NaH₂PO₄; 0,15 M NaCl, pH7,4) para a remoção das células não aderidas, posteriormente foi adicionada e homogeneizada com uma suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. A razão de leveduras por células hialinas ou granulares foi de 10:1 por contagem em câmara de Neubauer.

As lâminas foram incubadas por 1 e 3 horas, fixadas com McDowell (McDowell, Trump, 1976) e coradas com Rosenfeld para melhor visualização da fagocitose (Hose, Martin, 2011; Jayasree, 2009; Silva, 2000). A coloração por Rosenfeld consiste em pingar o corante de Rosenfeld filtrado sobre a lâmina e deixá-lo por 2 minutos; após esse período, acrescentar água destilada ao corante e deixar por mais 2 minutos, antes de lavá-las, com água destilada.

A fagocitose foi quantificada sob microscopia de luz em campo claro, com objetiva de 40X (microscópio Standard 25 ICS- Carl Zeiss®). Foram contadas 50 células hialinas e 50 células granulares. Os índices de fagocitose serão calculados através das seguintes formulas:

$$\text{Capacidade Fagocítica: CF} = \frac{\text{Nº de hemócitos fagocitando}}{\text{Nº de hemócitos totais}}$$

$$\text{Índice Fagocítico: IF} = \frac{\text{Nº total de leveduras fagocitadas}}{\text{Nº de hemócitos fagocitando}}$$

3.6 Produção de Ânion Superóxido

A produção de ânion superóxido foi avaliada usando “nitroblue tetrazolium” (NBT); foram colocados 100 µl da suspensão de hemócitos com anticoagulante para crustáceos (0,45 M NaCl; 30 mM citrato de sódio; 26 mM ácido cítrico; 20 mM EDTA) (Alpuche et al., 2009) em uma placa de 96 poços de fundo chato em triplicata; foram acrescentados 100 µl de solução de Van Harreveld (VHS: 0,2 M de NaCl, 0,1 M de CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM NaHCO₃, pH 7,4) (Van Harreveld, 1936) gelado. A placa foi incubada a temperatura ambiente por, 30 minutos, para a formação de uma monocamada de hemócitos. Após esse período, foi acrescentado 100 µl de uma solução contendo 0,3% de NBT, mais 0,2% de leveduras em PBS e incubadas a 37 °C por 2 horas. Então o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS gelado, metanol 70% e fixados com metanol 100%. Os poços foram secados ao ar e então foram adicionados 120 µl de KOH 2M e 140 µl de dimetil sulfoxido (DMSO) em cada poço e a placa foi lida em um leitor de ELISA, no comprimento de onda de 630 nm.

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise ultraestrutural, o restante da hemolinfa foi fixado com McDowell gelado. As células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato, por 2 horas, a 4 °C. Após esse período, o pellet de células foi colocado em uma solução de uranila 0,5% em água destilada com 1% de sucrose, a 4 °C, por 24 h. Depois da desidratação em uma bateria de soluções alcoólicas de 70 a 100%, duas imersões em óxido de propileno, foram feitas, cada uma de 2 minutos, seguida por uma infiltração com óxido de propileno e resina Spurr (Sigma®), por 12 horas, a temperatura ambiente em um agitador orbital. O pellet de células foi colocado em resina Spurr pura e colocada em moldes que foram colocados em estufa a 70 °C por 3 dias, para polimerização. Os cortes semifinos (0,5 µm) foram feitos em um ultramicrotomo LKB Porter Blum MT1 e os cortes ultrafinos (70 nm) foram feitos LKB Porter Blum MT2 e colocados em telas de cobre de 300 mesh. Posteriormente as telas foram impregnadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes

foram observados no microscópio eletrônico de transmissão (TEM-JEOL-JEM-100 CXII), do instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.8 Análise Estatística dos Resultados

Todos os resultados foram analisados estatisticamente com o programa Statistica 6.0 (StatSoft, Inc- Tulsa, Oklahoma EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Qualidade da Água

As médias da temperatura, do oxigênio dissolvido, da saturação de oxigênio dissolvido, do pH, da salinidade e da amônia nos tanques de água clara durante os 6 meses de experimento foram respectivamente: $27,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,4$; $4,7\text{ mg/l} \pm 0,7$; $71,2\% \pm 8,6$; $7,8 \pm 0,4$; $32,9\text{ ppm} \pm 1,6$ e $0,052\text{ ml/l} \pm 0,05$. Já as medias da temperatura, do oxigênio dissolvido, da saturação de oxigênio dissolvido, do pH, da salinidade, da amônia e do biofoco nos tanques de biofoco durante os 6 meses de experimento foram respectivamente: $27,9\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,4$; $4,6\text{ mg/l} \pm 0,7$; $70,1\% \pm 10$; $7,8 \pm 0,4$; $33,8\text{ ppm} \pm 2,2$; $0,4\text{ mg/l} \pm 0,2$; $25,9\text{ ml/l} \pm 26,5$. Não houve diferença significativa entre os tanques de água clara e biofoco para todos os parâmetros, com exceção da amônia nos primeiros 2 meses de experimentação. Nas figuras 6 a 12, pode-se observar os gráficos com os dados dos parâmetros da qualidade da água que foram observados durante os 6 meses de experimento.

Figura 6 – Gráfico das médias da temperatura da água.

Temperatura média em graus Celsius durante os 6 meses de experimento, cada tipo de tratamento está representado por uma cor: azul água clara e vermelho biofoco.

Figura 7 – Gráfico das médias de oxigênio dissolvido na água.

Oxigênio dissolvido em miligramas por litro durante os meses de experimento, cada tipo de tratamento está representado por uma cor: azul água clara e vermelho biofloco.

Figura 8 – Gráfico da Saturação de oxigênio dissolvido.

Saturação média de oxigênio dissolvido em porcentagem durante os meses de experimento, cada tipo de tratamento está representado por uma cor: azul água clara e vermelho biofloco.

Figura 9 – Gráfico do pH da água.

pH médio da água durante os meses de experimento, cada tipo de tratamento está representado por uma cor: azul água clara e vermelho bioflocos.

Figura 10 – Gráfico da salinidade da água.

Salinidade média da água em partes por milhão durante os meses de experimento, cada tipo de tratamento está representado por uma cor: azul água clara e vermelho bioflocos.

Figura 11 – Gráfico da Concentração de amônia da água.

Concentrações média de amônia em miligramas por litro durante os meses de experimento, cada tipo de tratamento está representado por uma cor: azul água clara e vermelho biofloco.

Figura 12 - Gráfico da quantidade de biofloco.

Quantidade média de biofloco em mililitro por litro durante os meses de experimento

4.2 Isolamento e Identificação das Bactérias

No laboratório de fisiologia de microrganismos do departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram isolados 6 diferentes colônias de bactéria, que posteriormente foram identificados por sequenciamento no Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas biológicas e agrícolas da Universidade de Campinas. Dos seis isolados, 4 foram identificados até o gênero, enquanto 2 foram possíveis identificar até as espécies. 3 dos isolados foram identificados como bactérias do gênero *Citrobacter* (Werkman, Gillen, 1932), um isolado foi identificado como sendo de bactérias do gênero *Klebsiella* (Trevisan, 1885), um isolado foi identificado como da espécie *Klebsiella oxytoca* (Flügge, 1886) e um isolado foi identificado como sendo da espécie *Morganella morganii* (Winslow et al., 1919). O relatório da identificação está no anexo A.

4.3 Tamanho e Peso dos Animais

Houve um aumento do comprimento dos animais mantidos nos dois sistemas de água clara de 9,01 cm $\pm$ 0,91, nos primeiros 2 meses, para 11,8 cm $\pm$ 1,53 após 4 meses de criação para 14,36 $\pm$ 0,79 após 6 meses de cultivo em água clara, também houve um aumento do comprimento dos animais mantidos em biofoco de 9,77 cm $\pm$ 0,77, nos 2 primeiros meses para, 12,91 cm $\pm$ 1,16 após 4 meses de cultivo, porém, entre o 4° e o 6° mês de cultivo, quando os animais tinham um comprimento de 13,8 cm $\pm$ 0,43, não houve crescimento significativo dos animais. Quando comparamos o comprimento dos animais nos diferentes sistemas de cultivo, observamos que apenas após 4 meses de cultivo, os animais criados em biofoco eram significativamente maiores que os criados em água clara (figura 13).

Figura 13- Gráfico do tamanho dos animais

Comprimento dos animais ao longo do experimento nos diferentes sistemas de cultivo. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes às diferenças nos diferentes prazos de coleta, enquanto que letras minúsculas são referentes aos diferentes tratamentos. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0000$; A e C $p < 0,0000$; B e C $p < 0,0000$; D e E $p < 0,0000$; b e c $p < 0,0455$.

Assim como no comprimento dos animais, houve um aumento no peso dos animais criados em água clara de $4,35 \text{ g} \pm 1,12$ nos primeiros 2 meses, para $9,9 \text{ g} \pm 3,03$ após 4 meses de criação, para $18,68 \text{ g} \pm 4,05$ após 6 meses de cultivo em água clara, também houve um aumento do peso dos animais mantidos em bioflocos de $5,54 \text{ g} \pm 1,29$ nos 2 primeiros meses para $13,29 \pm 3,1$ após 4 meses de cultivo, porém, entre o 4º e o 6º mês de cultivo, quando os animais pesavam $16,3 \text{ g} \pm 3,45$, não houve aumento de peso significativo dos animais. Quando comparamos o peso dos animais nos diferentes sistemas de cultivo, observamos que apenas após 4 meses de cultivo os animais criados em bioflocos eram significativamente maiores que os criados em água clara (figura 14).

Figura 14 - Gráfico do peso dos animais

Peso dos animais ao longo do experimento, nos diferentes sistemas de cultivo. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes às diferenças nos diferentes prazos de coleta, enquanto que letras minúsculas são referentes aos diferentes tratamentos. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0000$; A e C $p < 0,0000$; B e C $p < 0,0000$; D e E $p < 0,0000$; b e c $p < 0,0221$.

4.4 Contagem Total e Relativa de Hemócitos

Ao compararmos o número total de hemócitos dos animais criados em água clara, observamos que do 2º para 4º mês, há uma queda na contagem total de hemócitos de $56,24 \pm 77,5 \times 10^4$ células/ml para $21,0 \pm 19,3 \times 10^4$ células/ml, enquanto que essa contagem aumenta no 6º mês para $281,5 \pm 7174,1 \times 10^4$ células/ml. Enquanto que a contagem total de hemócitos dos animais criados em bioflocos aumentou do 2º para o 4º mês de $18,44 \pm 9,6 \times 10^4$ células/ml para $101,68 \pm 43,5 \times 10^4$ células/ml, no 6º mês essa contagem foi para $243,36 \pm 144,3 \times 10^4$ células/ml. Quando comparamos os sistemas de cultivo, podemos observar que no 2º e 6º meses de cultivo a contagem total de hemócitos era maior no sistema de água clara enquanto que no 4º mês de cultivo ela foi maior nos animais criados em bioflocos. Na figura 15, pode-se observar o número total de hemócito nos diferentes sistemas durante o período de experimentação.

Figura 15 - Gráfico com número total de hemócitos.

Número total de hemócitos ($\text{n}^\circ 10^4/\text{ml}$) dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes aos prazos de coleta, enquanto que letras minúsculas são referentes aos diferentes tratamentos. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,05$; A e C $p < 0,001$; B e C $p < 0,001$; D e E $p < 0,001$; D e F $p < 0,001$; E e F $p < 0,01$; $p < 0,0017$; a e b $p < 0,05$; c e d $p < 0,001$.

Na contagem diferencial das células hialinas dos animais criados em água clara não há diferença significativa da 1ª para a 2ª coleta, porém, há um aumento significativo entre a 2ª e a 3ª coleta; já a contagem diferencial das células granulares dos animais criados em água clara apresenta um aumento da 1ª coleta para a 2ª e uma queda da 2ª para a 3ª coleta, enquanto que a contagem diferencial das células semigranulares dos animais criados nesse sistema apresentam diminuição entre as coletas.

Nos animais criados em bioflocos, a contagem diferencial de células hialinas apresenta um aumento da 1ª para a 2ª coleta e nenhuma diferença significativa da 2ª para a 3ª coleta. Já a contagem diferencial das células granulares apresenta uma diminuição significativa da 2ª para a 3ª coleta, enquanto não se observa diferença significativa na contagem da 1ª coleta com a contagem de nenhuma das coletas subsequentes. Na contagem diferencial das células semigranulares, observamos uma diminuição desta da 1ª para a 2ª coleta, mas não se observa diferença significativa entre a 2ª e a 3ª coleta.

Ao compararmos os sistemas de criação, observamos que a contagem diferencial das células hialinas após 2 e 6 meses de cultivo é igual, porém, após 4 meses de cultivo, animais criados em biofoco possuem uma porcentagem maior de células hialinas, enquanto que as células granulares possuem a mesma porcentagem após 2 e 6 meses de cultivo, como a hialina, após 4 meses de cultivo os animais criados em água clara é que possuem uma porcentagem maior dessas células. E o mesmo ocorre com as células semigranulares. Na tabela 2 pode-se observar as porcentagens de cada tipo de hemócito nos diferentes sistemas de criação durante o experimento.

Tabela 2 - Número diferencial de hemócitos (%) dos camarões criados nos diferentes sistemas.

Tempo de exposição	Sistema de água clara			Sistema de biofoco		
	Hialinas	Granular	Semigranular	Hialinas	Granular	Semigranular
2 Meses	66,67	18,58	14,74	68,70	15,96	15,34
	$\pm 11,0^{Aa}$	$\pm 7,1^{Ce}$	$\pm 5,4^{Fi}$	$\pm 8,7^{Ia}$	$\pm 8,3^{KLe}$	$\pm 6,9^{Mi}$
4 Meses	60,77	30,77	9,14	76,22	19,69	4,09
	$\pm 17,0^{Ab}$	$\pm 14,6^{Df}$	$\pm 6,7^{Gj}$	$\pm 8,8^{Jc}$	$\pm 8,0^{Kg}$	$\pm 2,5^{Nk}$
6 Meses	80,57	14,98	4,46	82,42	14,51	3,07
	$\pm 6,0^{Bd}$	$\pm 4,7^{Eh}$	$\pm 3,0^{Hi}$	$\pm 5,8^{Jd}$	$\pm 4,8^{Lh}$	$\pm 1,8^{Ni}$

Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes aos prazos de coleta, enquanto que letras minúsculas são referentes aos diferentes tratamentos. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0000$; C e D $p < 0,0005$; C e E $p < 0,0232$; D e E $p < 0,0000$; F e G $p < 0,0005$; F e H $p < 0,0000$; G e H $p < 0,0029$; I e J $p < 0,0011$; K e L $p < 0,0119$; M e N $p < 0,0000$; b e c $p < 0,0000$; f e g $p < 0,0004$; j e k $p < 0,0002$.

4.5 Índices Fagocíticos

A capacidade fagocítica das células hialinas, após 1 hora de fagocitose dos animais criados em água clara, aumentou entre 22,90% $\pm 18,1$, após 2 meses de cultivo, para 68,72% $\pm 8,9$ após 4 meses de cultivo para cair para 62,86% $\pm 16,3$, após 6 meses de cultivo. Nos animais criados em biofoco, a capacidade fagocítica das células hialinas, após 1 hora de fagocitose aumentou de 26,42% $\pm 9,6$ após 2 meses de cultivo para 64,60% $\pm 13,2$, após 4 meses e se manteve 64,00% $\pm 17,0$, após 6 meses de cultivo. Quando comparamos a capacidade fagocítica das células

hialinas após 1 hora de fagocitose, não observamos nenhuma diferença significativa em nenhuma das coletas. Na figura 16, pode-se observar a capacidade fagocítica das células hialinas após 1 hora de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 16 - Gráfico da capacidade fagocítica das células hialinas após 1 hora de fagocitose.

Capacidade fagocítica (%) de células hialinas após 1 hora de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0000$; C e D $p < 0,0002$.

A Capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose dos animais criados em água clara diminuiu de $41,42 \pm 19,1$ após 2 meses de cultivo para $31,46 \pm 10,3$ após 4 meses de cultivo e se manteve em $31,37 \pm 10,0$ após 6 meses de cultivo. Nos animais mantidos em bioflocos a capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose caiu de $55,27 \pm 12,1$ após 2 meses de cultivo para $37,2 \pm 9,3$, após 4 meses e foi para $29,46 \pm 8,5$ após 6 meses de cultivo. Ao compararmos os dois sistemas, observamos que a capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose é significativamente maior nos animais criados em bioflocos após 2 meses de cultivo, porém, elas se igualam nos períodos

seguintes. Na figura 17, pode-se observar a capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 17 - Gráfico da capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose.

Capacidade fagocítica (%) de células hialinas após 3 horas de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0049$; C e D $p < 0,0082$; a e b $p < 0,0036$.

A capacidade fagocítica das células granulares após 1 hora de fagocitose dos animais criados em água clara foi de $37,48 \pm 18,4$ após 2 meses de cultivo, $26,12 \pm 10,5$ após 4 meses de cultivo e $27,00 \pm 11,4$ após 6 meses de cultivo, enquanto que a dos animais criados em biofloco caiu de $62,15 \pm 11,3$ após 2 meses de cultivo para $26,82 \pm 8,9$ após 4 meses de cultivo e subiu para $28,44 \pm 13,6$ após 6 meses de cultivo. Ao compararmos os sistemas de cultivo não observamos diferença significativa em nenhum dos períodos observados. Na figura 18 pode-se observar a capacidade fagocítica das células granulares após 1 hora de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 18 - Gráfico da capacidade fagocítica das células granulares após 1 hora de fagocitose.

Capacidade fagocítica (%) de células granulares após 1 hora de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: B e C $p < 0,0002$

A capacidade fagocítica das células granulares após 3 horas de fagocitose dos animais criados em água clara foram $24,31 \pm 14,1$ após 2 meses de cultivo, $53,3 \pm 13,1$ após 4 meses e $54,00 \pm 10,3$ após 6 meses de cultivo, enquanto que a dos animais criados em biofloco foram $36,19 \pm 14,1$ após 2 meses de cultivo, $50,5 \pm 12,2$ após 4 meses de cultivo, $53,61 \pm 6,8$ após 6 meses de cultivo. Ao compararmos a capacidade fagocítica das células granulares após 3 horas de fagocitose dos animais criados nos diferentes sistemas não observamos diferenças significativas em nenhum dos períodos. Na figura 19, pode-se observar a capacidade fagocítica das células granulares após 3 horas de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 19 - Gráfico da capacidade fagocítica das células granulares após 3 horas de fagocitose.

Capacidade fagocítica (%) de células granulares após 3 horas de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período.

A Capacidade fagocítica dos hemócitos em conjunto após 1 hora de fagocitose dos animais de água clara sobe significativamente do 2º para o 4º mês de cultivo, de $34,90\% \pm 14,5$ para $45,04\% \pm 5,4$ e passa para $38,47\% \pm 1,4$ no 6º mês, enquanto que nos animais criados em bioflocos ela é de $44,61\% \pm 8,9$ no 2º mês, $45,52\% \pm 6,3$ no 4º mês e cai para $34,04\% \pm 11,1$ no 6º mês de cultivo. Quando comparamos os sistemas de cultivo observamos que a princípio os animais criados em bioflocos possuem capacidade fagocítica melhor do que os criados em água clara mas logo essas capacidades se igualam. Na figura 20, pode-se observar a capacidade fagocítica dos hemócitos após 1 hora de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos.

Figura 20 - Gráfico da capacidade fagocítica dos hemócitos após 1 hora de fagocitose.

Capacidade fagocítica (%) dos hemócitos após 1 hora de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,01$; C e D $p < 0,01$; a e b $p < 0,05$.

A Capacidade fagocítica dos hemócitos em conjunto após 3 horas de fagocitose dos animais de água clara sobe significativamente do 2º para o 4º mês de cultivo de 32,00% $\pm 13,8$ para 45,28% $\pm 6,6$ e cai para 37,41% $\pm 9,6$ no 6º mês, enquanto que nos animais criados em bioflocos ela é de 43,69% $\pm 7,2$ no 2º mês, 44,37% $\pm 6,0$ no 4º mês e cai para 36,29% $\pm 9,3$ no 6º mês de cultivo. Quando comparamos os sistemas de cultivo observamos que a princípio os animais criados em bioflocos possuem capacidade fagocítica melhor do que os criados em água clara mas logo essas capacidades se igualam. Na figura 21, pode-se observar a capacidade fagocítica dos hemócitos após 3 horas de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos.

Figura 21 - Gráfico da capacidade fagocítica dos hemócitos após 3 horas de fagocitose.

Capacidade fagocítica (%) dos hemócitos após 3 horas de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,01$; C e D $p < 0,05$; a e b $p < 0,01$.

O índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose dos animais criados em água clara foi $1,19 \pm 0,5$ após 2 meses de cultivo, $1,45 \pm 0,2$ após 4 meses de cultivo e $1,38$ após 6 meses de cultivo. O índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose dos animais criados em bioflocos foi $1,2 \pm 0,1$ após 2 meses de cultivo, $1,4 \pm 0,2$ após 4 meses de cultivo e houve uma queda para $1,38 \pm 0,2$ após 6 meses de cultivo. Não observamos diferença significativa dos índices fagocíticos das células hialinas após 1 hora de fagocitose, ao compararmos os índices dos animais criados nos diferentes sistemas, em nenhum período observado. Na figura 22, pode-se observar o índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 22 - Gráfico do índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose.

Índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: B e C $p < 0,0427$.

Os índices fagocíticos das células hialinas após 3 horas de fagocitose dos animais criados em água clara foram $1,53 \pm 0,8$ após 2 meses de cultivo, $1,15 \pm 0,2$ após 4 meses de cultivo e $1,17 \pm 0,2$ após 6 meses de cultivo, foi observado diferença significativa apenas entre o 2º e 6º meses de cultivo. Nos animais criados em bioflocos os índices fagocíticos foram $1,43 \pm 0,2$ após 2 meses de cultivo caindo para $1,23 \pm 0,1$ após 4 meses de cultivo e $1,1 \pm 0,1$ após 6 meses de cultivo. Não foi encontrada diferença significativa ao se comparar os índices dos animais criados em água clara e bioflocos em nenhum período. Na figura 23, pode-se observar o índice fagocítico das células hialinas após 3 horas de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 23 - Gráfico dos índices fagocíticos das células hialinas após 3 horas de fagocitose.

Índice fagocítico das células hialinas após 3 horas de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0321$; C e D $p < 0,0278$.

Os índices fagocíticos das células granulares após 1 hora de fagocitose dos animais criados em água clara foram $1,53 \pm 0,8$ após 2 meses de cultivo, caíram para $1,15 \pm 0,2$ após 4 meses de cultivo e $1,17 \pm 0,2$ após 6 meses de cultivo. enquanto que esses índices para os animais criados em biofloco foram $1,43 \pm 0,2$ após 2 meses de cultivo, caiu para $1,23 \pm 0,1$ após 4 meses de cultivo e $1,1 \pm 0,1$ após 6 meses de cultivo. Quando comparamos esses índices entre os animais criados nos diferentes sistemas não encontramos nenhuma diferença significativa entre eles. Na figura 24, pode-se observar o índice fagocítico das células granulares após 1 hora de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 24 - Gráfico dos índices fagocíticos das células granulares após 1 hora de fagocitose.

Índice fagocítico das células granulares após 1 hora de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0414$; C e D $p < 0,0259$.

Os índices fagocíticos das células granulares após 3 horas de fagocitose dos animais criados em água clara foram $1,37 \pm 0,5$ após 2 meses de cultivo, $1,2 \pm 0,1$ após 4 meses de cultivo e $1,13 \pm 0,1$ após 6 meses de cultivo. Os índices fagocíticos das células granulares após 3 horas de cultivo dos animais criados em biofloco foram $1,41 \pm 0,3$ após 2 meses de cultivo, caíram para $1,23 \pm 0,2$ após 4 meses de cultivo e $1,11 \pm 0,1$ após 6 meses de cultivo. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os índices dos animais criados nos diferentes sistemas. Na figura 25 pode-se observar o índice fagocítico das células granulares após 3 horas de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 25 - Gráfico dos índices fagocíticos das células granulares após 3 horas de fagocitose.

Índice fagocítico das células granulares após 3 horas de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: B e C $p < 0,0147$.

O índice fagocítico dos hemócitos em conjunto, após 1 hora de fagocitose dos animais de água clara, cai significativamente do 2º para o 4º mês de cultivo de $1,61 \pm 0,6$ para $1,22 \pm 0,1$ e se mantém em $1,18 \pm 0,1$ no 6º mês, enquanto que nos animais criados em biofloco ele cai de $1,44 \pm 0,2$ no 2º mês, para $1,26 \pm 0,1$ no 4º mês e cai novamente para $1,13 \pm 0,1$ no 6º mês de cultivo. Quando comparamos os sistemas de cultivo observamos que não há diferença significativa entre eles. Na figura 26, pode-se observar o índice fagocítico dos hemócitos após 1 hora de fagocitose nos diferentes sistema e períodos.

Figura 26 - Gráfico do índice fagocítico de hemócitos após 1 hora de fagocitose.

Índice fagocítico dos hemócitos após 1 hora de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,01$; C e D $p < 0,05$; C e E $p < 0,001$; D e E $p < 0,05$.

O índice fagocítico dos hemócitos em conjunto após 3 horas de fagocitose dos animais de água clara é de $1,41 \pm 0,3$ no 2º, de $1,33 \pm 0,2$ no 4º mês de cultivo e de $1,22 \pm 0,1$ no 6º mês, só havendo uma queda significativa do 2º para o 6º mês de cultivo, enquanto que nos animais criados em bioflocos ele cai de $1,48 \pm 0,2$ no 2º mês, para $1,29 \pm 0,1$ no 4º mês e se mantém em $1,21 \pm 0,1$ no 6º mês de cultivo. Quando comparamos os sistemas de cultivo observamos que não há diferença significativa entre eles. Na figura 27, pode-se observar o índice fagocítico dos hemócitos após 3 horas de fagocitose nos diferentes sistemas e períodos.

Figura 27 - Gráfico do índice fagocítico de hemócitos após 3 horas de fagocitose.

Índice fagocítico dos hemócitos após 3 horas de fagocitose dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período.. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,05$; C e D $p < 0,01$.

4.6 Produção de Ânion Superóxido

Nesse ensaio quanto maior a absorbância maior a produção de ânion superóxido. Observamos uma queda da produção de ânion superóxido de 2 para 4 meses de cultivo e depois um aumento no 6º mês de cultivo nos animais criados em água clara, enquanto que nos animais criados em bioflocos há uma queda da produção entre o 2º e o 4º mês de cultivo não havendo diferença na produção entre o 2º e o 6º mês ou entre o 4 e o 6º mês de cultivo. Ao compararmos os sistemas de cultivo não observamos nenhuma diferença significativa entre eles. Na figura 28, pode-se observar a produção de ânion superóxido nos diferentes sistemas e períodos observados.

Figura 28 - Gráfico da produção de ânion superóxido nos diferentes sistemas.

Produção de ânion superóxido dos camarões criados nos diferentes sistemas, nos diferentes períodos. Letras iguais: não há diferença significativa, letras diferentes: há diferença significativa; letras maiúsculas são referentes à diferença entre os períodos no mesmo tratamento, enquanto letras minúsculas são referentes às diferenças entre tratamentos no mesmo período. Diferença significativa entre: A e B $p < 0,0002$; C e D $p < 0,0075$.

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na microscopia eletrônica de transmissão não foi observada nenhuma alteração na ultraestrutura dos hemócitos dos animais criados em bioflocos ao compararmos com os hemócitos dos animais criados em água clara. Na figura 29, é possível ver eletromicrografias de hemócitos de animais criados em água clara e bioflocos.

Figura 29 - Eletromicrografia dos hemócitos.

Eletromicrografia obtida em microscopia de transmissão, A: células hialina de animais criados em água clara, B: célula hialina de animais criados em biofloco, C: célula semigranular de animais criados em água clara, D: célula semigranular de animais criados em biofloco. Barras de escala = 1 Micrometro.

5 DISCUSSÃO

5.1 Qualidade da Água

Todos os parâmetros observados estavam dentro da faixa ótima para a espécie nos dois sistemas e não houve diferença significativa entre eles, com exceção da amônia dissolvida nos 2 primeiros meses, que estava em maior quantidade nos tanques de biofloco, provavelmente porque biofloco ainda estava sendo estabelecido. Nos dias em que os níveis de amônia chegavam próximos ao crítico 5% da água do tanque era trocada.

A quantidade de biofloco foi crescendo ao longo do tempo como era esperado, porém, no último mês de experimento houve uma grande variação na quantidade, devido à diminuição do número de animais no tanque já que os indivíduos que eram retirados para o experimento não eram repostos.

5.2 Isolamento e Identificação das Bactérias

Dos isolados, 3 foram identificados como do gênero *citrobacter*, que são cocos ou cocobacillus gram-negativos da família *enterobacteriaceae* encontrados no solo, na água e no trato gastrointestinal de mamíferos. (Gordon, FitzGibbon, 1999). Segundo a organização mundial da saúde (Lightfoot, 2003), existe a suspeita de envolvimento de bactérias desse gênero em alguns surtos de doenças humanas, porém, nada conclusivo; elas estão associadas com meningite em neonatos. Jaffrès et al. (2009) encontrou bactérias do gênero *citrobacter* em camarões tropicais pré-cozidos, pelo fato de serem associadas com doenças em neonatos, isso implica em risco à saúde pública. Porém, quando nos referimos à manutenção da qualidade da água nos tanques, essa é uma bactéria benéfica já que ela ajuda na remoção de dejetos da água (Finlay et al., 1999).

Dois isolados foram identificados como do gênero *Klebsiella* e um deles, até a espécie *K. oxytoca*, que é um coco Gram-negativo, da família da *enterobacteriaceae* pode ser encontrado no ambiente e a *K. oxytoca* pode causar infecção do trato urinário em humanos e já foi associada com colite e diarreia hemorrágica (Hoffmann et al., 2010; Hogenauer et al., 2006), é a causa de septicemia em crianças (Reiss et al., 2000), sendo assim de importância em saúde pública. Não encontramos nenhum

relato de bactérias do gênero *Klebsiella* sendo encontradas em camarões, mas foi descrito em abalones por Cai et al. (2008) sugerindo que também poderiam ser encontradas nos camarões.

Um isolado foi identificado como de bactérias da espécie *Morganella morganii*, que é um bacilo Gram-negativo encontrado no meio ambiente e no trato gastrointestinal de mamíferos e répteis, a *M. morganii* produz histamina que é uma toxina associada à intoxicação alimentar. Essa bactéria já foi descrita nos peixes *Pagellus bogaraveo* e *Psetta máxima* (Fernández-No et al., 2011) em atum defumado (Benner et al., 2004) e em cavala (Kim et al., 2001), onde também foi encontrado espécies de *Citrobacter* e *Klebsiella*.

Embora nenhuma das bactérias encontradas tenha sido associada com doenças causadas por ingestão de camarões, já foram associadas a intoxicações alimentares por outros produtos de origem animal. Nesse trabalho não foi analisada a presença de bactérias na carne dos animais, portanto não podemos descartar sua presença nela fazendo com que seja um potencial risco à saúde pública, por isso sugerimos que os animais sejam testados para a presença destas bactérias, que os mesmo sejam higienizados após a despesca e que na embalagem do produto venha um aviso que só deve ser consumido bem cozido.

Quanto à questão de manter a qualidade da água todas as bactérias identificadas são bactérias heterotróficas que diretamente transformam a amônia em nitrogênio e proteína. Não encontramos nenhum outro relato que identificasse essas bactérias no biofloco, porém, segundo Ray et al. (2009) a composição do biofloco varia de acordo com a localização e a época do ano.

5.3 Tamanho e Peso dos Animais

Como esperado nos 4 primeiros meses, os animais criados em biofloco tiveram um maior comprimento e um maior ganho de peso (Emerenciano, Wasielesky, 2009; Zhao et al., 2012). Após 6 meses de cultivo, os camarões criados em biofloco eram menores dos que os criados em água clara porque camarões encontrados perto dos tanques de biofloco eram repostos com camarões do tanque estoque, porém, esses animais embora fossem do mesmo lote e o tanque estoque também fosse mantido em sistemas de biofloco eram menores, fazendo então com que os

últimos animais coletados nesse sistema fossem menores que os criados em água clara, após 6 meses.

5.4 Contagem Total e Relativa de Hemócitos

Não encontramos na literatura nada que justifique a queda na contagem total de hemócitos entre os 2º e 4º meses, ou o aumento entre os 4º e 6º meses de criação dos animais criados em água clara. Nos trabalhos encontrados observamos que há uma oscilação quanto ao número total de hemócitos, que pode aumentar ou diminuir ao longo do tempo nos indivíduos mantidos como controle, porém, os autores não fazem essa comparação entre indivíduos tratados da mesma maneira ao longo do tempo, mas apenas entre os tratamentos do mesmo período.

A criação em biofloco estimula a produção de hemócitos em camarões já que há um aumento da contagem total dos hemócitos criados nesse sistema ao longo do tempo. Os relatos encontrados com imunoestimulantes mostram um aumento da contagem para depois haver uma diminuição da mesma, porém, todos esses estudos não são de longa duração, sendo no máximo de 6 dias, assim como ocorre no controle, os autores desses estudos não fazem uma comparação ao longo do tempo, portanto, não temos como saber se essa alteração é significativa ou não (Fu et al., 2007; Ji et al., 2009; Montero-Rocha et al., 2006; Tseng, Chen, 2004; Wang, Chen, 2005). Os dados desses estudos sugerem que há uma ciclicidade na produção de células hialinas totais nesses animais.

Quando comparamos as contagens de hemócitos totais nos animais criados nos diferentes sistemas no mesmo período, observamos que no 2º mês após cultivo, os animais mantidos em água clara possuem uma contagem total de hemócitos maior que dos animais criados em biofloco, assim como ocorre após 10 horas da administração de LPS (Ji et al., 2009; Rodriguez-ramos et al., 2008), ao se mergulhar os camarões em extrato de *Gracilaria tenuistipitata* e *Gelidium amansii* (Fu et al., 2007; Yeh et al., 2010).

Ao compararmos a contagem total de hemócitos dos camarões criados nos diferentes sistemas, observamos que no 2º mês de criação a contagem foi maior nos animais criados em água clara, assim como ocorre 48 horas após administração de poly I:C (Ji et al., 2009) e após 24 horas da injeção de LPS (Rodriguez-ramos et al., 2008). No 4º mês de cultivo, a contagem total de hemócito é maior nos animais

criados em bioflocos; Ji et al. (2009) observaram o mesmo fenômeno 6 e 12 horas após injetar laminarina, assim como Fu et al. (2007) após 6 dias da injeção de extrato de *Gelidium amansii* e após 28 dias alimentando os animais com ração contendo o mesmo extrato, Tayang et al. (2010) observaram o mesmo fenômeno de 12 a 48 horas, após injetar extrato de *Spirulina platensis*; o mesmo ocorre após 1 e 12 dias de administração de quitina e quitosano (Wang, Chen, 2005). Já no 6º mês de cultivo, não há diferença entre os animais criados em água clara e bioflocos, assim como observado com a administração de ergosan (Montero-Rocha et al., 2006) e probiótico (Tseng et al., 2009) onde os autores não encontraram diferença nas contagens de hemócitos totais entre o controle e os tratamentos. Já outros autores mostram que após um tempo de administração de imunostimulantes, que varia de horas a dias, o número total de hemócitos é igual a do controle (Fu et al., 2007; Rodriguez-Ramos et al., 2008; Tayag et al., 2010; Wang, Chen, 2005; Yeh et al., 2010).

Ao contrário do que ocorre com a contagem total de hemócitos, no 2º mês de cultivo a contagem diferencial não apresenta diferença significativa. Tayag (2010) observa o mesmo 72 e 96 horas após banho com extrato de *S. platensis*, e Yeh (2010) também observa esse fenômeno após 96 horas após banho com extrato de *G. tenuistipitata*, porém, o primeiro conta células semigranulares e granulares juntas, enquanto que o segundo conta as células semigranulares junto com as células hialinas. Já no 4º mês de cultivo, as células hialinas dos animais criados em bioflocos estão em maior número, o mesmo ocorre após a injeção de ergosan (Montero-Rocha et al., 2006), após 6, 12, 24 e 48 horas após banho em extrato de *G. tenuistipitata* (Yeh et al., 2010) e após 48 horas de banho com extrato de *S. platensis* (Tayag et al., 2010). Já no 6º mês de cultivo, não houve diferença no número total de células hialinas dos animais criados nos diferentes sistemas de cultivo, como ocorre com a contagem total assim como Yeh et al. (2010) e Tayag et al. (2010) observaram 96 horas após banho nos extratos de plantas.

Só houve diferença significativa na porcentagem de células granulares no 4º mês de cultivo quando a porcentagem era maior nos animais mantidos em água clara, (Montero-Rocha et al., 2006) observaram que a porcentagem de células granulares é maior no controle após 15 dias de administração de ergosan junto da dieta, enquanto que Tayag et al. (2010) observaram que 12, 72 e 96 horas após

mergulhar os animais em extrato de *S. platensis*, a porcentagem de células granulares era igual nos animais controles e tratados, enquanto que 24 e 48 horas após o tratamento a porcentagem era maior nos tratados; Yeh et al. (2010) observaram que 6, 12, 24 e 48 horas após banho com extrato de *G. tenuistipitata* a porcentagem de células granulares era maior nos animais tratados, e 96 horas após o tratamento não houve diferença.

A porcentagem de células semigranulares, assim como ocorre com as de células granulares, só tem diferença significativa no 4º mês de cultivo e as células dos animais criados em água clara têm uma porcentagem maior que as dos animais criados em biofoco. O único trabalho que encontramos sobre imunoestimulação e que conta as células semigranulares separadamente foi o de Montero-Rocha et al. (2006) onde eles observaram que a porcentagem de células granulares é maior nos animais alimentados com ergosan, ao contrário do que observamos.

Embora Bachère (2000) proponha que a análise quantitativa e qualitativa dos hemócitos seja usada para medir a resposta imunológica de crustáceo, percebemos que diferentes autores (Fu et al., 2007; Ji et al., 2009; Montero-Rocha et al., 2006; Tseng, Chen, 2004; Wang, Chen, 2005) observaram números diferente tanto na contagem diferencial quanto na total dos hemócitos de camarões considerados saudáveis, o que sugere uma grande variedade entre indivíduos, como observamos em nossos dados, que não possuem distribuição normal, pondo em dúvida a confiabilidade dessa análise quanto à sanidade dos animais ou sua resposta imunológica.

5.5 Índices Fagocíticos

Como citado anteriormente, a célula fagocítica varia com a espécie (Gargioni, Barracco, 1998; Rodriguez et al., 1995). Nos nossos estudos, observamos 2 células fagocitando a hialina e a semigranular. A maioria dos relatos de fagocitose em *Litopenaeus vannamei* é feito com ensaios *in vivo* enquanto nossos ensaios foram feitos *in vitro*. Outra diferença é que os autores relatam os resultados como atividade fagocítica dos hemócitos, sugerindo que eles consideraram que todos os hemócitos têm atividade fagocítica, embora eles não deixem isso claro nos artigos.

Não houve diferença significativa da capacidade fagocítica das células hialinas ou granulares após 1 hora de fagocitose ou da capacidade fagocítica das células

granulares após 3 horas de fagocitose entre os diferentes sistemas de criação, logo, o sistema de biofloco não modifica a capacidade fagocítica das células hialinas e granulares após 1 hora de fagocitose, assim como ocorre em animais após 2 dias de receberem quitina e após 4 dias de receberem quitosano em diferentes concentrações (Wang, Chen, 2005) e com extrato da folha de *Cinnamomum kanehirae* em diferentes concentrações (Yeh R-Y et al., 2009).

Em ambos os sistemas de criação, há um aumento da capacidade fagocítica das células hialinas após 1 hora de fagocitose entre o 2º e o 4º mês de criação. Isso talvez seja fisiológico sugerindo uma melhoria no sistema imune como ocorre em mamíferos onde os animais jovens e adultos possuem um sistema imune mais desenvolvido que os filhotes e os idosos. Observamos uma queda dessa capacidade entre o 4º e 6º meses de cultivo: os animais do 6º mês de cultivo estão com o peso onde eles atingem a maturidade sexual o que pode acarretar numa imunodepressão, como ocorre em trutas (Paiva et al., 1985; Tabata, 1995). Isso é apenas uma suposição, já que não encontramos nenhum relato sobre isso em camarões. Já a capacidade fagocítica das células granulares após 1 hora de fagocitose não se modifica ao longo dos meses nos animais criados em água clara, enquanto há uma queda na capacidade fagocítica das células hialinas, após 1 hora de fagocitose entre o 2º e o 4º mês de cultivo, nos animais criados em biofloco que retorna aos níveis iniciais no 6º mês, sugerindo que houve uma imunodepressão e depois uma recuperação do sistema imune. Não encontramos nenhum relato que mostre uma queda na capacidade fagocítica após a utilização de um imunoestimulante.

Houve diferença significativa da capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose entre os diferentes sistemas de criação, apenas no 2º mês de cultivo, sugerindo que o sistema de biofloco de alguma maneira estimula o sistema imune de animais. O mesmo ocorre com animais alimentados com dietas contendo extrato de *Gelidium amansii* (Fu et al., 2007), com extrato do galho de *Cinnamomum kanehirae* em diferentes concentrações (Yeh R-Y et al., 2009) e com o probiótico *Bacillus subtilis* E20 (Tseng et al., 2009). Ao longo do tempo, podemos observar uma queda na capacidade fagocítica das células hialinas após 3 horas de fagocitose, sugerindo uma imunodepressão dos animais, porém, não houve variação na capacidade fagocítica das células granulares após 3 horas de fagocitose ao longo do tempo.

Para facilitar a comparação também calculamos a capacidade e o índice fagocítico juntando as duas células e chamamos de capacidade ou índice fagocítico dos hemócitos. Quando fizemos isso observamos que a Capacidade fagocítica é maior nos animais criados em bioflocos após 2 meses de cultivo, não importando o tempo de fagocitose. O mesmo ocorre com animais alimentados com dietas contendo extrato de *Gelidium amansii* (Fu et al., 2007), com extrato do galho de *Cinnamomum kanehirae* em diferentes concentrações (Yeh et al., 2009) e com o probiótico *Bacillus subtilis* E20 (Tseng et al., 2009). Já após 4 e 6 meses de cultivo, não existe diferença entre os sistemas de cultivo, sugerindo que o sistema de bioflocos não interfere no sistema imune desses animais. Observamos que, ao longo do tempo, o índice fagocítico dos animais criados em bioflocos caem sugerindo que eles estariam voltando aos níveis de normalidade já que são próximos aos animais criados em água clara. Já os índices dos animais criados em água clara aumentam entre o 2º e o 4º mês de cultivo sugerindo uma melhoria no sistema imune. Como já citado anteriormente, pode ser devido à maturação do sistema imune.

Observamos que diferentes autores encontraram diferentes resultados com diferentes imunoestimulantes. Powell et al. (2011) observaram que após a administração de uma vacina de vibrio a capacidade fagocítica dos camarões aumentou para vibrios, porém, se manteve igual para bacilos. Esses achados sugerem que os imunoestimulantes proporcionaram proteção para alguns agentes, enquanto para outros não. Logo os testes devem ser feitos utilizando agentes específicos.

Os índices fagocíticos das células hialinas após 1 e 3 horas de fagocitose não variaram entre os sistemas de criação, logo, o sistema de bioflocos não estimula as células hialinas a ingerirem mais partículas. O índice fagocítico das células hialinas após 1 hora de fagocitose só apresentou diferença ao longo do tempo, no sistema de bioflocos, no 6º mês de cultivo ficando entre o índice do 2º e 4º mês de cultivo. Já o índice fagocítico das células hialinas após 3 horas de fagocitose caiu entre o 2º e 6º mês nos animais de água clara sugerindo uma queda na eficiência de fagocitose, enquanto que em animais criados em bioflocos ele aumenta entre o 2º e o 4º mês sugerindo uma melhoria na eficiência fagocítica.

Os índices fagocíticos das células granulares após 1 e 3 horas de fagocitose não variam entre os diferentes sistemas de cultivo. Porém, quando comparamos os

índices ao longo do tempo, percebemos que após 1 hora de fagocitose esses índices caem do 2º para o 4º mês de cultivo em ambos os sistemas, mantendo-se iguais no restante do período, sugerindo uma queda na eficiência fagocítica; já após 3 horas de fagocitose, essa queda só é observada para os animais criados em biofloco.

Quando juntamos as duas células para fazermos o índice fagocítico dos hemócitos, notamos que não há diferença significativa entre os sistemas novamente, sugerindo que o biofloco não interfere no sistema imune dos animais, independente do tempo de fagocitose. Quando comparamos ao longo do tempo, observamos que há uma queda dos índices nos dois sistemas, sugerindo que seria alguma mudança fisiológica, já que ocorre nos animais criados em água clara.

Sendo assim a utilização do biofloco, sob o ponto de vista imunológico, é altamente recomendável, uma vez que elimina a troca de água, dificultando a introdução de patógenos, e não interfere nas características estudadas do sistema imunológico.

5.6 Produção de Ânion Superóxido

A produção de ânion superóxido não mostra diferença entre os diferentes sistemas de cultivo em nenhum período observado, assim como observado por Tseng, Chen (2004) ao utilizar o probiótico *Bacillus subtilis* E20, como 3 e 48 horas a injeção de laminarina e LPS (Ji et al., 2009), e 96 e 120 horas após inoculação de *Vibrio alginolyticus*, depois de 3 horas de imersão em extrato de *Gracilaria tenuistipitata* (Yeh S-T, Chen, 2009).

Nos animais criados em água clara observamos que há uma queda entre o 2º e 4º mês de cultivo para haver uma recuperação aos níveis iniciais no 6º mês. Sugerindo uma queda na eficiência da produção de ânion superóxido para posterior recuperação. Já nos animais criados em biofloco essa queda é mais acentuada e embora haja uma recuperação ela é menos evidente.

6 CONCLUSÕES

Encontramos no biofloco, bactérias que podem causar problemas de saúde pública, porém, não sabemos se essas bactérias se encontram na carne. Aconselha-se então a fazer uma análise microbiológica da carne e se colocar na embalagem que o produto deve ser consumido bem cozido.

Observamos que o biofloco não interfere nos parâmetros imunológicos que observamos, porém, vimos que existe uma grande variação individual quanto ao número total de hemócitos, assim como o diferencial não só nos nossos animais como entre diferentes autores o que sugere que a contagem de hemócitos não seria uma maneira eficaz de se avaliar a resposta imune desses animais.

Também podemos observar que há diferença na resposta dependendo do imunoestimulante que se usa e o agente utilizado para analisar a resposta imune. Então, seria interessante fazer esses mesmos testes utilizando outros agentes como vírios e bacilos. Também seria interessante analisar se o sistema de biofloco não confere uma resistência a patógenos que vem causando prejuízos nas carcinoculturas, com testes de inoculação destes agentes. Porém, com a estrutura que temos hoje tanto no ICB como no Instituto Oceanográfico esses experimentos são inviáveis.

Embora aparentemente o sistema de biofloco não apresente características imunoestimulantes, ele ainda é um sistema válido por proporcionar um crescimento mais rápido dos animais, diminuir os custos com a ração e minimizar as chances de um patógeno ser introduzido no cultivo, e segundo nossos dados, ele também não imunossuprime os animais. Como demonstrado muitas vezes, um imunoestimulante é especificado para determinado patógeno. Como só testamos a levedura, não podemos afirmar que esse animal não foi imunoestimulado para algum patógeno em potencial, já que outros autores demonstram que há um aumento da expressão de determinados genes imunes em animais criados em biofloco.

Sendo assim do ponto de vista imunológico é recomendável o uso do biofloco dados os outros benefícios que ele traz ao meio ambiente e ao cultivo.

REFERÊNCIAS*

- Alpuche J, Rosas C., Vázquez L., Guevara J, Pereyra A, Agundis C, Pascual C, Zenteno E. Activation of immunological responses in *Litopenaeus setiferus* hemocytes by a hemocyanin like-lectin. *Aquaculture*. 2009;292:11–5.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(17):7915–22.
- Avnimelech Y. Carbon:nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*. 1999;176:227–35.
- . BIO-FLOCS TECHNOLOGY: Basics and new developments. In: *World Aquaculture*; 2011; Natal. [acesso em 6 jun 2011]. Disponível em: <https://www.was.org/WASMeetings/meetings/SessionAbstracts.aspx?Code=WA2011&Session=39>.
- Bachère E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 2000;191:3–11.
- Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*. 2004;198:149–68.
- Beck G, Ellis TW, Habicht GS, Schluter SF, Marchalonis JJ. Evolution of the acute phase response : iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes , and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Developmental and Comparative Immunology*. 2002;26:11-26.
- Bell KL, Smith VJ. In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 1993;17:211–9.
- Belp JG, Ashton I, Secombes CJ, Weitzel BR, Dick JR. Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions , eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 1996;54:173–82.
- Benner Jr RA, Staruszkiewicz WF, Otwell WS. Putrescine, cadaverine, and indole production by bacteria isolated from wild and aquacultured penaeid shrimp stored at 0, 12, 24, and 36 degrees C. *Journal of Food Protection*. 2004;67(1):124–33.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001;25(8-9):853–73.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Borges JCS, Porto-Neto LR, Mangiaterra MBBCD, Jensch BE, Silva JRMC. Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0 ° C. Polar Biology. 2002;25(12):891-7.

Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasília, 2012. 129 p.

Browdy CL, Bratvold D, Stokes AD, McIntosh RP. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: World Aquaculture Society; 2011; Baton Rouge. p. 20–30.

Burford MA, ThompsonPJ, McIntosh RP, Bauman RH, Pearson DC. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture. 2003;219(1-4):393–411.

_____. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. Aquaculture. 2004;232:525–37.

Cai J, Wang Z, Cai C, Zhou Y. Characterization and identification of virulent *Klebsiella oxytoca* isolated from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) postlarvae with mass mortality in Fujian, China. Journal of Invertebrate Pathology. 2008;97(1):70–5.

Cardelli J. Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. Traffic (Copenhagen, Denmark). 200;2(5):311–20.

Chang M, Wang W-N, Wang A-L, Tian T-T, Wang P, Zheng Y, Liu Y. Effects of cadmium on respiratory burst, intracellular Ca²⁺ and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology. 2009;149(4):581–6.

Chanockf SJ, El Bennas J. Minireview the respiratory burst oxidase. The Journal of Biological Chemistry .1994;269(15):24519–22.

Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science (New York, N.Y.). 2004;304(5668):242–8.

Ellist T M, Barrett JT. Characterization of opsonins for bacteroides fragilis in immune sera collected from experimentally infected mice. Infection and Immunity. 1982;35(3):929–36.

Emerenciano M, Wasielesky W. Tecnologia de bioflocos. Panorama da Aquicultura. 2009:2009–10.

Emerenciano MGC, Wasielesky W, Soares RB, Ballester EC, Izeppi EM, Cavalli RO. Crescimento e sobrevivência do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na fase de berçário em meio heterotrófico. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 2007;29(1):1–7.

Food Agriculture Organization. Global aquaculture outlook in the next decades : an analysis of national aquaculture production forecasts to 2030. Fisheries Circular No . 1001. Roma: FAO; 2004. 47 p.

———. Use of Fishery Resources as Feed Inputs to aquaculture development: trends and policy implications. Fisheries Circular No . 1018. Roma: FAO; 2006. 99p.

———. FAO yearbook. fishery and aquaculture statistics. 2007/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture. 2007/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura. 2007. Roma: FAO; 2007.72p.

———. The state of world fisheries and aquaculture 2010. Roma: FAO; 2010. 218 p.

———. the state of world fisheries and aquaculture 2012. Roma: FAO; 2012. 230 p.

Fernández-No IC, Böhme K, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. Characterisation of histamine-producing bacteria from farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) and turbot (*Psetta maxima*). International Journal of Food Microbiology. 2011;151(2):182–9.

Finlay JA, AllanVJ, Conner A, Callow ME, Basnakova G, Macaskie LE. Phosphate release and heavy metal accumulation by biofilm-immobilized and chemically-coupled cells of a *Citrobacter* sp. pre-grown in continuous culture. Biotechnology and Bioengineering. 1999; 63(1): 87–97.

Fu Y-W, Hou W-Y, Yeh S-T, Li C-H, Chen J-C. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 2007;22(6):673–85.

Gargion R, Barracco MA. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. Journal of Morphology. 1998;236(3):209–21.

Gordon DM, FitzGibbon F. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. Microbiology (*Reading, England*). 1999;145 (Pt 1):2663–71.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. Journal of Neurochemistry. 1997;69(3):1330–1.

Hari B, Kurup BM, Varghese JT, Schrama JW, Verdegem MCJ. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. Aquaculture. 2004;241:179 –94.

Hauton C, Brockton V, Smith VJ. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. Molecular Immunology. 2006;43(9):1490–6.

Heng L, Lei W. On the ultrastructure and classification of the hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 1998;16(4) 333–8.

Hoffmann KM, Deutschmann A, Weitzer C, Joainig M, Zechner E, Högenauer C, Hauer AC. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*. 2010;125(4):960–3.

Hogenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G, Krause R, Gerstgrasser N, Krejs GJ, Hinterleitner TA. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. The New England Journal of Medicine. 2006;355:2418–26.

Holmblan T, Soderhall K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean , possible role in immunity. *Aquaculture*. 1999;172:111–23.

Hopkins JS, Sandifer PA, Browdy CL, Holloway JD. Comparison of exchange and no-exchange water management for the intensive pond culture of marine shrimp. *Journal of Shellfish Research*. 1996;15(2):441–5.

Hopkins JS, Sandifer PA, Browdy CL. Effect of two feed protein levels and feed rate combinations on water quality and production of intensive shrimp ponds operated without water exchange. *Journal of the World Aquaculture Society* 1995;26(1):93–7.

Hose JE, Martin GG. Defense functions of granulocytes sicyonia in the ridgeback prawn *ingentis* on morphological. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011;346(1989):335–46.

Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;38(2):128–50.

Jaffrès E, Sohier D, Leroi F, Pilet MF, Prévost H, Joffraud JJ, Dousset X. Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology* 2009;131(1):20–9.

Jang I-K. Biofloc-based super-intensive shrimp production in commercial scale with an emphasis of biofloc effects on shrimp immunity. In: *Aqua 2012 - Global Aquaculture Securing our Future*; 2012; Praga. [acesso em 1 set 2012]. Disponível em: <https://www.was.org/WasMeetings/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=26080>.

Jayasree S. Identification of immune cells interacting with *Vibrio* spp. and its in vitro post-phagocytic killing mechanism of haemocytes in the penaeid shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Journal of Fish Diseases*. 2009;32(4):359–65.

Jensch-Junior BE, Pressinotti LN, Borges JCS, Silva JRMC. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Aquaculture*. 2006;251(2-4):509–15.

Ji P-F, Yao C-L, Wang Z-Y. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish & Shellfish Immunology*. 2009;27(4):563–70.

Kim S-h, Field KG, Chang D-s, Wei C-i, An H. Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in pacific mackerel during storage. *Journal of Food Protection*. 2001 64(10):1556–64.

Kim S-K, Seo H-C, Cho Y-R, Pang Z, Jang I-K. Biofloc effect on immune activity between three species of farmed shrimp. In: *Aqua 2012 - Global Aquaculture Securing our Future*; 2012; Praga. [acesso em 1 set 2012]. Disponível em: <https://www.was.org/WasMeetings/meetings/SessionAbstracts.aspx?Code=AQUA2012&Session=14>.

Lee SY, Söderhäll K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 2002;12(5):421–37.

Lightfoot, NF. Bacteria of potential health concern. In: Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A. *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. Londres: IWA Publishing; 2003. Cap.5, p.61-79.

Lin Y-C, Vaseeharan B, Chen J-C. Identification of the extracellular copper-zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following beta-glucan and peptidoglycan injections. *Molecular Immunology*. 2008;45(5):1346–55.

Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Induced inflammatory process in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Invertebrate Biology*. 2001;120(2):178–84.

Martin GG, Graves BL. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology*. 1985;185(3):339–48.

Martin GG, Hose JE, Kim JJ. Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*: Light and electron microscopic observations. *Journal of Morphology*. 1987;192(3):193–204.

McDowell EM, Trump BF. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1976;100:405-14.

Megahed ME. The effect of microbial biofloc on water quality , survival and growth of the green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) fed with different crude protein levels i: sustainable solution to the dependency on fish oil , fishmeal and environmental problems. *Journal of Arabian Aquaculture Society*. 2010;5(2):119–42.

Montero-Rocha A, McIntosh D, Sánchez-Merino R, Flores I. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006;91(3):188–94.

Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, van der Knaap WPW, Mialhe E, Bachère E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 2000;191(1-3):89–107.

Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature. 2000;405(6790):1017–24.

Ostrensky A, Borghetti JR, Soto D. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. Brasília: SEAP; 2008. 276p.

Paiva P, Godinho HM, Manardes-Pinto CSR, Tabata YA, Leite RG. Comportamento reprodutivo de truta-arco-íris *Salmo irideus* Gibbons (*Osteichthyes salmonidae*) em cultivo intensivo. Boletim do instituto de Pesca. 1985;12(4):61–70.

Powell A, Pope EC, Eddy FE, Roberts EC, Shields RJ, Francis MJ, Smith P, Topps S, Reid J, and Rowley AF. Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. Journal of Invertebrate Pathology. 2011;107(2):95–9.

Ray AJ, Shuler AJ, Leffler JW, Browdy CL. Microbial ecology and management of biofloc systems. In: The Rising Tide - World Aquaculture; 2009; Baton Rouge. p. 255–66.

Reiss I, Borkhardt A, Füssle R, Sziegoleit A, Gortner L. Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies Myocardial blood-flow response during mental stress in patients with coronary artery disease. The Lancet. 2000;356:2000.

Rodriguez J, Boulo V, Mialhe E, Bachere E. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. Journal of Cell Science. 1995;108 (Pt 3):1043–50.

Rodriguez-ramos T, Espinosa G, Hernandez-Lopez J, Gollasgalvan T, Marrero J, Borrell Y, Alonso M, Becquer U. Effects of *Echerichia coli* lipopolysaccharides and dissolved ammonia on immune response in southern white shrimp *Litopenaeus schmitti*. Aquaculture. 2008;274(1):118–25.

Schneider O, Sereti V, Eding E, Verreth JAJ. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. Aquacultural Engineering. 2005;32 (3-4):379-401.

Schryver PD, Crab R, Defoirdt T, Boon N, Verstraete W. The basics of bio-flocs technology : The added value for aquaculture. Microbial Ecology. 2008;277:125–37.

Silva, JR. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. Developmental and Comparative Immunology. 2000 ;24(8):733–9.

Sung HH, Sun R. Use of monoclonal antibodies to classify hemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Journal of Crustacean Biology. 2002; 22(2):337-44.

Tabata YA. Sobrevivência, crescimento e desenvolvimento gonadal em lotes monosssexos femininos e de sexos mistos de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, diplóides e triplóides. [dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 1995.

Tacon A. Aquafeeds and the environment: policy implications. *Aquaculture*. 2003;226:181–9.

Tayag CM, Lin Y-C, Li C-C, Liou C-H, Chen J-C. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2010;28(5-6):764–73.

Tseng D-Y, Ho P-L, Huang S-Y, Cheng S-C, Shiu Y-L, Chiu C-S, Liu C-H. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology*. 2009;26(2):339–44.

Tseng I-T, Chen J-C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 2004;17(4):325–33.

van de Braak CBT, Botterblom MHA, Liu W, Taverne N, van der Knaap WPW, Rombout JHWM. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2002;12(3):253–72.

Van Harreveld A. A Physiological for freshwater crustaceans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1936;34:428-32

Wang S-H, Chen J-C. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2005;19(3):191–204.

Wasielesky W, Atwood H, Stokes A, Browdy CL. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2006;258:396 – 403.

Wu W, Zong R, Xu J, Zhang X. Antiviral phagocytosis is regulated by a novel Rab-dependent complex in shrimp *penaeus japonicus* *Journal of Proteome Research*. 2008;7(1):424–31.

Yeh R-Y, Shiu Y-L, Shei S-C, Cheng S-C, Huang S-Y, Lin J-C, Liu C-H. Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2009;27(1):26–32.

Yeh S-T, Chen J-C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2009;26(5):724–30.

Yeh S-T, Lin Y-C, Huang C-L, Chen J-C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 2010;28(5-6):887–94.

Zhao P, Huang J, Wang X-H, Song X-L, Yang C-H, Zhang X-G, Wang G-C. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*. 2012;354-355:97–106.

Zong R, Wu W, Xu J, Zhang X. Regulation of phagocytosis against bacterium by Rab GTPase in shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008;25(3):258–63.

Site:

Associação Brasileira de Criadores de Camarões (ABCC). Balança comercial [homepage na internet]. Natal [acesso em 1 ago 2012]. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/abcc/images/stories/balana%20comercial%20maio%202012%20-%2016-07.pdf>.

Guabi [acesso em 1 jan 2011]. Disponível em: <http://www.guabi.com.br/2011/produto.asp?ch=6&id=123#produto>.

ANEXO A – Relatório da Identificação das bactérias

UNICAMP

**CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS,
BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS**

Paulinia - SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Reitor

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Coordenador Geral da Universidade

Prof. Dr. Edgar Salvadori de Decca

Pró-Reitor de Desenvolvimento Universitário

Prof. Dr. Paulo Eduardo Moreira Rodrigues da Silva

Pró-Reitor de Extensão e Assuntos Comunitários

Prof. Dr. Mohamed Ezz El Din Mostafa Habib

Pró-Reitor de Pesquisas

Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Dr. Euclides de Mesquita Neto

Pró-Reitor de Graduação

Prof. Dr. Marcelo Knobel

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA

Diretor

Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Junior

Diretor Associado

Prof. Dr. Sérgio Pérsio Ravagnani

Assistente Técnico de Direção

Rita de Cássia V. P. Biancalana

UNICAMP FMS-27 Versão: 000	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	INSTITUTO DE QUÍMICA Subsetor: 04

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 0001/08M	PÁGINA: 1 de 8
---------------------------------	----------------

1 - DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE

RAZÃO SOCIAL: FARMACIA SERRA LOPES		
ENDEREÇO: Av. Prof. Lúcio Prestes, 2415 - Jd. B1 sala 409 Cidade Universitária		
CIDADE: São Paulo	UF: SP	CEP: 05388-000
INSC. EST. 11.365.083/007	INSCRIÇÃO ESTADUAL: ...	

2 - DADOS DAS AMOSTRAS

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: 06 amostras de bactérias em meio de cultura NA inoculadas: (1) Remota 1; (2) Remota 2; (3) Remota 3; (4) Remota 4; (5) Remota 5; (6) Remota 6		No. CPS: 148/2011
TOTAL DE AMOSTRAS: 6	LOCAL DE PRODUÇÃO: não se aplica	
LOTE:	VALORADO:	

3 - ENSAIOS

ENSAIOS REALIZADOS: Identificação de bactérias
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (S/R)
PTMORM-05 (8181)

4 - EXECUÇÃO DOS ENSAIOS

DIVISÃO Reagentes Microbianas CPQBA - UNICAMP AV. Alexandre Cavalcanti, 999 - Vila Belas - Pindamonhanga - SP - CEP: 13140-000	
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Fabiana Pastreutti Garboggini	
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA	09/08/2011
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS	DE: 15/08/2011 A: 15/09/2011
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO	13/10/2011

CPQBA - UNICAMP, quinta-feira, 13 de outubro de 2011.

Fabiana Pastreutti Garboggini	Valéria Maria Músel	Ivo Milton Balmaceda Jr.
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO	COORDENADOR DA DIVISÃO	DIRETOR DO CPQBA

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo válido somente para o propósito para o qual foi elaborado e as amostras aqui apresentadas sob de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a administração. O uso do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (019) 310-3800

FAX: (019) 310-3802

e-mail: responsa@cpqba.unicamp.br

UNICAMP FMO-CT E-mail: 666	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	CPQBA E-mail: 294
---	--	---

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 169-11 DRM	PÁGINA: 3 de 8
-----------------------------------	----------------

- A árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e das amostras CPQBA 169-11 DRM 01, CPQBA 169-11 DRM 02, CPQBA 169-11 DRM 03, CPQBA 169-11 DRM 04, CPQBA 169-11 DRM 05 e CPQBA 169-11 DRM 06 está apresentada na Figura 1. Os resultados de identificação são apresentados abaixo:

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 169-11 DRM - 01	Remota 1	<i>Citrobacter</i> sp. Winkman and Gillen 1932
CPQBA 169-11 DRM - 02	Remota 2	<i>Klebsiella oxytoca</i> (Flißge 1888) Lautrop 1956
CPQBA 169-11 DRM - 03	Remota 3	<i>Citrobacter</i> sp. Winkman and Gillen 1932
CPQBA 169-11 DRM - 04	Remota 4	<i>Klebsiella</i> sp. Trevisan, 1885.
CPQBA 169-11 DRM - 05	Remota 5	<i>Morganella morganii</i> (Winslow et al. 1919) Feltus 1943
CPQBA 169-11 DRM - 06	Remota 6	<i>Citrobacter</i> sp. Winkman and Gillen 1932

4. Comentários

- As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S das amostras CPQBA 169-11 DRM 01, DRM 03 e DRM 06 apresentaram entre 97 e 99% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Citrobacter marshallii*, *C. freundii* e *C. braconii*, e com várias linhagens de *Citrobacter* sp. contidas nas bases de dados consultadas Genbank e RDP.

A análise filogenética (Figura 1) recuperou as amostras CPQBA 169-11 DRM 01, DRM 03 e DRM 06 em um mesmo agrupamento como é distinto dos demais, demonstrando que são muito próximas entre si. Entretanto, não foi possível observar uma relação evolutiva mais próxima destas amostras com qualquer das espécies de *Citrobacter* incluídas na análise. Portanto, não foi possível concluir a identificação das amostras em nível de espécie.

- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra CPQBA 169-11 DRM 02 apresentou 99% de similaridade com a sequência do gene RNA ribossomal 16S da linhagem tipo *Klebsiella oxytoca* e isolados de *Klebsiella* sp. presentes nas bases de dados consultadas Genbank e RDP.

A análise filogenética (Figura 1) confirmou os resultados das buscas nas bases de dados e recuperou a amostra CPQBA 169-11 DRM 02 em um agrupamento como é suportado por valores de re-amostragem (100%) com a linhagem tipo de *Klebsiella oxytoca*, consolidando a identificação da amostra em nível de espécie.

118

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de coleta e produção analisadas, sendo válido em abrangência parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a organização. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicação de produtos ou serviços sob qualquer forma.

FOFIE: 119/2009 2009 FAX: 019/3139-2892 e-mail: cnpqba@cpqba.unicamp.br

FAPESP
Fim de 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO

Edição/Revisão: 2/04

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 169/11 DRM

PÁGINA: 2 de 8

1. Identificação de Bactérias

1. Objetivos

- Identificação molecular de seis isolados bacterianos utilizando sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S.

2. Metodologia utilizada

- **Amplificação do gene RNA ribossomal 16S.** A metodologia utilizada na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da cultura, segundo protocolo descrito por Van Soestling *et al.* (1993). Os primers (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p18f e p110r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.
- **Sequenciamento.** Os produtos das amplificações foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). Os primers utilizados para o sequenciamento foram o 18 f e o 110r.
- **Análise filogenética.** As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes primers foram montadas em um contig (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao micro-organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A matriz de distâncias evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Nelson & Nei, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0.

3. Resultados

- As colônias isoladas obtidas em cultivo apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação. A análise microscópica revelou a presença de cocos bacilos com coloração Gram negativa para as amostras CPQBA 169-11 DRM 01, CPQBA 169-11 DRM 02, CPQBA 169-11 DRM 03, CPQBA 169-11 DRM 04, CPQBA 169-11 DRM 05 e CPQBA 169-11 DRM 06.
- Os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. Os produtos das amplificações foram purificados em coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento usando o sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystems).
- As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas para as amostras CPQBA 169-11 DRM 01, CPQBA 169-11 DRM 02, CPQBA 169-11 DRM 03, CPQBA 169-11 DRM 04, CPQBA 169-11 DRM 05 e CPQBA 169-11 DRM 06 estão apresentadas no Anexo I.

Os resultados e conclusões deste relatório são estritamente confidenciais e não devem ser divulgados sem a autorização expressa da Universidade Estadual de Campinas nem a seus funcionários. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicação de produtos ou serviços sob qualquer forma.

FOFME: (11) 2108 2000

FAX: (11) 2108 2002

e-mail: cpqba@cpqba.unicamp.br

FAC-ET
Bairro: 13083

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURI-DISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO

Av. dos Gladiadores, 294

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 169-11 DRM

PÁGINA: 4 de 8

- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra CPQBA 169-11 DRM 04 apresentou 97% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Klebsiella pneumoniae* e *K. variicola*, além de vários isolados de *Klebsiella* sp. contidas nas bases de dados consultadas Genbank e RDP.

A análise filogenética (Figura 1) recuperou a amostra CPQBA 169-11 DRM 04 em um mesmo agrupamento coeso com várias espécies tipo de *Klebsiella*, entretanto, não foi possível observar uma relação exclusiva mais próxima destas amostras com qualquer das espécies de *Klebsiella* incluídas na análise. Portanto, não foi possível concluir a identificação das amostras em nível de espécie.

- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra CPQBA 169-11 DRM 05 apresentou entre 97 e 98% de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Morganella morganii*, além de vários isolados de *Morganella* sp. contidas nas bases de dados consultadas Genbank e RDP.

A análise filogenética (Figura 1) recuperou a amostra CPQBA 169-11 DRM 05 em um agrupamento suportado por alto valor de re-amostragem (98%) juntamente com a linhagem tipo de *Morganella morganii*, definindo a identificação da amostra em nível de espécie.

5. Referências Bibliográficas

- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEI4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEI4) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:6876-6882.
- Van Soolingen D., De Haan Pw., Hermans Pwm, Groenen P., Van Embden Jda. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J Clin. Microbiol.* 31:1987-95.

HY

O conteúdo e conclusões deste relatório se limitam exclusivamente às condições de coleta e produção analisadas, sendo vedada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comissão. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicação de produtos ou serviços sob qualquer forma.

PHONE: (051) 3159 2809

FAX: (051) 3159 3881

e-mail: cnpqba@cpqba.unicamp.br