



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**EFEITOS DO USO DA TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS EM CAMARÃO
MARINHO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE PELOS VÍRUS DA MANCHA
BRANCA E MIONECROSE INFECCIOSA**

Leandro Cavalcanti Souza de Melo

**Recife,
Junho/2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**EFEITOS DO USO DA TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS EM CAMARÃO
MARINHO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE PELOS VÍRUS DA MANCHA
BRANCA E MIONECROSE INFECCIOSA**

Leandro Cavalcanti Souza de Melo

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

**Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Moura
Coimbra
Orientador**

**Prof^ª. Dr^ª. Suzianny Maria
Bezerra Cabral da Silva
Co-orientador**

**Recife,
Junho/2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M528e Melo, Leandro Cavalcanti Souza de
 Efeitos do uso da tecnologia de bioflocos em camarão
 marinho infectado experimentalmente pelos vírus da mancha
branca e mionecrose infecciosa/ Leandro Cavalcanti Souza de
 Melo. – 2017.

52 f. : il.

Orientadora: Maria Raquel Moura Coimbra.
Coorientadora: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos
Pesqueiro e Aquicultura, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. *Litopenaeus vannamei* 2. Bioflocos 3. Co-infecção
I. Coimbra, Maria Raquel Moura, orient. II. Silva, Suzianny Maria
Bezerra Cabral da, coorient. III. Título

CDD 639

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

**EFEITOS DO USO DA TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS EM CAMARÃO
MARINHO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE PELOS VÍRUS DA MANCHA
BRANCA E MIONECROSE INFECCIOSA**

Leandro Cavalcanti Souza de Melo

Dissertação julgada adequada para obtenção
do título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
05/06/2017 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof.ª. Dr.ª. MARIA RAQUEL MOURA COIMBRA

(Orientadora)

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.ª. Dr.ª. EMIKO SHINOZAKI MENDES

Departamento de Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS

Departamento de Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, luz que ilumina meu caminho, que me ampara em toda e qualquer dificuldade, e a meu pai (*in memoriam*) que sempre foi meu maior fã.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado concedida;

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura por abrir as portas da casa;

À professora Raquel Coimbra por todo conhecimento, orientação, paciência e disponibilidade, além do encorajamento que me deu força para continuar;

À professora Suzianny Cabral pela disponibilidade, pela solicitude em passar seu conhecimento em diversas áreas, pela paciência e pela perseverança;

Aos professores Luís Otávio Brito, Emiko Shinozaki Mendes e Fernando Leandro dos Santos pela disponibilidade e conhecimentos passados durante este período;

Aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada Larissa Monteiro, Patrícia Lima, Raquel Ventura, Manuella Luna, Sandra da Luz, Mondrian Sales, Larissa Malheiros, Karine Cavalcanti e Hozana Dantas por todo o conhecimento, ajuda, alegria, disponibilidade e risadas, vocês foram fundamentais neste período;

Aos estagiários do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos Tainan Araújo, Álvaro Cirino e Paulo Henrique que me ajudaram em todo o experimento, vocês foram parte vital disto;

À Camanor e funcionários da fazenda Cana Brava, por ceder os camarões e organizar toda a logística para a coleta deles;

Aos colegas do Laboratório de Maricultura Sustentável e do Laboratório de Produção de Alimento Vivo e ao professor Alfredo Gálvez; aos estagiários e ao próprio professor Eudes Correia; além de tantas outras pessoas que, nominalmente, não caberia nestes agradecimentos, por ceder espaço e insumos e por toda ajuda logística;

Aos funcionários do Departamento de Pesca e da Base por toda ajuda prestada e a todos os professores do programa que sempre se mostraram solícitos em esclarecer dúvidas e problemas;

À minha irmã Cibele, minha mãe Ana e minha namorada Maria por acreditarem em mim. A todos, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

A tecnologia de criação de camarões em sistema fechado com bioflocos (BFT) vem se mostrando uma alternativa para evitar surtos recorrentes de doenças infecciosas exóticas. O papel imunestimulante dele já foi comprovado em vários estudos, protegendo o camarão por meio da ativação de diversos fatores presentes em seu sistema imune e conferindo uma maior resistência à infecção. Dentre estes agentes, os vírus da Síndrome da mancha branca (WSSV) e da Mionecrose infecciosa (IMNV) historicamente já causaram perdas na casa dos bilhões de dólares e hoje estão difundidos em todo o mundo, incluindo os estados brasileiros produtores de camarão. Nosso objetivo foi avaliar o efeito do uso da tecnologia de bioflocos em camarão marinho infectado experimentalmente pelo WSSV e IMNV. Os animais foram distribuídos em três tratamentos, sendo um com infecção por imersão pelo WSSV (W), um segundo com infecção via ingestão pelo IMNV (I), um terceiro pelas duas vias anteriores (IW), além do controle negativo (C), sem desafio viral. Ao final do experimento (dia 20), a taxa de mortalidade não diferiu estatisticamente entre nenhum grupo. A análise por PCR não acusou positividade para WSSV em nenhuma amostra, porém houve animais positivos para IMNV nos tratamentos C (23,8%) e W (8,7%). No entanto, nenhum animal apresentou alterações macro e microscópicas, o que indica o não desenvolvimento da infecção. Estes resultados apontam uma resistência à infecção por parte dos animais, sugerindo que os bioflocos podem agir como barreira contra a infecção.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*; bioflocos; co-infecção.

Abstract

Shrimp farming on no water exchange systems with bioflocs (BFT) has been shown an alternative to avoid recurrent outbreaks of exotic infectious diseases. Its immunostimulatory role has already been proven in several studies, protecting shrimp by activating several factors present in its immune system and conferring greater resistance to infection. Among these agents, White spot syndrome (WSSV) and Infectious myonecrosis (IMNV) viruses have historically already caused billionnaire losses and are still widespread worldwide, including Brazilian shrimp-producing states. Our objective was to evaluate the effect of the use of biofloc technology on experimentally infected marine shrimp by WSSV and IMNV. The animals were divided into three treatments, one with WSSV (W) immersion infection, another with infection by IMNV contaminated tissue (I), a third by the two anterior (IW) and the negative control (C), without viral challenge. At the end of the experiment (day 20), the mortality rate did not differ statistically between any groups. PCR analysis showed no positivity for WSSV in any sample, but there were positive animals for IMNV in treatments C (23.8%) and W (8.7%). However, no animal presented macro and microscopic alterations, indicating the non-development of the infection. These results point to a resistance to infection by the animals, suggesting that bioflocs can act as a barrier against infection.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; biofloc; co-infection.

Lista de figuras

	Página
Figura 1- Camarões <i>L. vannamei</i> com sinais clínicos de Mionecrose Infecciosa. Há uma coloração leitosa no último segmento dos animais, evidenciando a fase aguda da infecção (pontas das setas). Fonte: Melena et al., 2012.	15
Figura 2 - Camarão <i>P. monodon</i> com sinais de infecção por WSSV, evidenciada pela presença de pontos brancos aderidos à carapaça do animal. Fonte: Gopalakrishman et al., 2013.	17

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Resumos dos parâmetros (média e desvio padrão) obtidos nos grupos durante o experimento.	39
Tabela 2. Comparação entre a taxa de sobrevivência final média dos grupos (dia 20).	40
Tabela 3. Análise de associação dos resultados obtidos na PCR para IMNV.	42

MELO, L.C.S. Efeitos do uso da tecnologia de bioflocos em camarão...	11
--	----

Sumário

	Página
Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	9
1. Introdução	11
1.1. Contextualização da pesquisa	12
1.2. Objetivos	19
2. Referências bibliográficas	19
3. Artigo científico	29

1. Introdução

Com 73,8 milhões de toneladas produzidas em 2014, a aquicultura vem se aproximando do volume total da pesca, sendo a carcinicultura responsável por quase 7% desta produção, a qual deteve em 2015 o faturamento de 25 bilhões de dólares (FAO, 2017). Contudo, o aparecimento de surtos de doenças – principalmente àquelas de etiologia viral – vêm sendo um fator determinante para a queda de produção destas espécies.

Dentre as principais espécies, destacam-se o *Litopenaeus vannamei* (3,8 milhões de toneladas em 2015) – conhecido como camarão branco do pacífico – e o camarão tigre asiático, o *Penaeus monodon* (713 mil toneladas no mesmo ano) (FAO, 2017). No Brasil, predomina o cultivo do *L. vannamei* que registrou recorde de produção no ano de 2003, momento em que o país atingiu 90.190 toneladas, tornando-se assim o líder das Américas (ROCHA, 2005). No entanto, o surgimento da doença de origem exótica, causada pelo vírus da Mionecrose infecciosa (*Infectious Myonecrosis Virus* – IMNV), foi determinante para a redução nas taxas de sobrevivência e consequente queda na produção nacional (SILVA, 2010). O primeiro registro de surto de IMNV ocorreu no estado do Piauí, em 2002, em *L. vannamei* cultivado (LIGHTNER et al, 2004).

Além do IMNV, a carcinicultura brasileira vem sofrendo com constantes surtos de outra enfermidade viral, conhecida por Síndrome da mancha branca (WSD), causada pelo vírus da Síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV).

A WSD é caracterizada pela presença de manchas brancas na cutícula e alta mortalidade, chegando a 100% do lote dentro de três a 10 dias após a infecção (DURAND et al, 1997; NAKANO et al, 1994; WANG et al, 1995). A doença está disseminada em todo território brasileiro. O episódio mais recente ocorreu no Ceará em 2017, estado responsável por 58% da produção nacional de camarão (ROCHA, 2016; IBGE, 2017).

Os camarões, bem como outros invertebrados, possuem apenas a imunidade inata, ou seja, não possuem memória imunológica e a consequente produção de anticorpos específicos para combate à infecção (WU et al., 2002 apud SILVA, 2010). Como não é viável a vacinação dos plantéis, o desenvolvimento de ferramentas para

diagnóstico precoce e de linhagens resistentes ao patógeno específico (*Specific Pathogen Resistant* – SPR), além de implantação de programas de biossegurança, são as medidas que podem ser tomadas para atenuação do problema (SILVA, 2010).

Uma outra alternativa à limitação imunológica do camarão, é o cultivo em circuito fechado com bioflocos (*Biofloc Technology* – BFT) que vem se mostrando viável para controle das afecções na aquicultura (AVNIMELECH, 2012). O princípio básico é transformar nutrientes residuais, especialmente o nitrogênio, em biomassa microbiana que pode ser usada no próprio sistema. Este método contribui principalmente para a manutenção da boa qualidade da água – tendo em vista a necessidade de controlar os níveis de compostos nitrogenados – bem como para a nutrição dos animais cultivados (AVNIMELECH, 1999).

Além disso, já vem sendo demonstrada a ação estimulante do BFT sobre o sistema imune do camarão. Em experimento realizado com *L. vannamei*, foi demonstrado que os níveis da profenoloxidase (proPO) – principal mecanismo de defesa de camarões – foram maiores em animais produzidos em BFT quando comparados ao grupo controle (EKASARI, 2014). Kim et al. (2013) comprovaram um acréscimo na expressão de seis genes envolvidos na cascata da proPO, sendo significativamente mais alta no tratamento com bioflocos. Entretanto, não há trabalhos que avaliem o efeito do cultivo em BFT quando há co-infecção viral.

Objetivou-se avaliar o efeito do uso da tecnologia de bioflocos sobre a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente pelo vírus da Síndrome da mancha branca, vírus da Mionecrose infecciosa e co-infecção entre estes dois agentes.

1.1. Contextualização da pesquisa

1.1.1. Panorama da carcinicultura marinha mundial

A carcinicultura corresponde a 59,8% (8,3 milhões de toneladas) do total de crustáceos produzidos, sendo o continente Asiático responsável por 85,36% de todo camarão marinho cultivado no planeta, seguido pelas Américas (14,25%) e o resto do mundo (0,4%), em 2014 (FAO, 2017).

As espécies mais cultivadas mundialmente são o *Litopenaeus vannamei*, conhecido como camarão branco do pacífico, com um total de 3,8 milhões de toneladas em 2015; e o *Penaeus monodon*, o camarão tigre asiático, com 950 mil toneladas de animais despescados no mesmo ano (FAO, 2017).

Atualmente, a China é o maior produtor de camarões do mundo (38,2%). Nas Américas, o Equador lidera o *ranking*, já que em 2015 produziu um total de 412 mil toneladas de camarão, ~~seguido por México e Estados Unidos, com 223 e 150 mil toneladas, respectivamente.~~ O Brasil produziu aproximadamente 70403 mil toneladas no mesmo ano, ~~o que corresponde a 5,5% do total produzido nas Américas~~ (FAO, 2017).

Dentre os estados brasileiros, destacam-se Ceará e Rio Grande do Norte, detentores da maior parte da produção nacional, que juntos produziram 83,8% dos camarões cultivados em 2015 (IBGE, 2017). Além destes estados, Piauí, Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba e Alagoas constituem outros produtores nacionais, com menor expressão em relação aos dois maiores. Em comum, todos estes estados se localizam no ~~nordeste~~ Nordeste, região que dispõe de grandes laboratórios de produção de larvas e unidades de beneficiamento (ABCC, 2013). Além disso, as características edafoclimáticas, topográficas e hidrobiológicas permitem que a produção de camarão ocorra durante o ano todo (FIGUEIREDO et al., 2003; CAMPOS e CAMPOS, 2006 apud BANDEIRA, 2016).

1.1.2. Mionecrose infecciosa

Inicialmente conhecida como Mionecrose idiopática, a Mionecrose infecciosa é causada pelo IMNV (*Infectious myonecrosis virus* ou vírus da Mionecrose infecciosa). A doença, na fase aguda, é caracterizada por vastas áreas de necrose nos tecidos dos músculos estriados, principalmente, no terço final do corpo do camarão (últimos segmentos abdominais, telso e urópodos) (Figura 1). Na fase crônica, as áreas afetadas apresentam aspecto de “camarão cozido”, assumindo uma coloração avermelhada (LIGHTNER et al., 2004; NUNES et al., 2004).

O agente causal é um Totivirus, cujas partículas têm formato icosaédrico com cerca de 40 nm de diâmetro e densidade de 1,366 g/ml em cloreto de césio. Seu genoma

consiste de uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) com 7560 pares de base de tamanho, com duas regiões de leitura aberta: ORF 1 (59 ORF) e ORF 2 (39 ORF). A primeira codifica principalmente uma proteína de capsídeo com uma massa molecular de 106 kDa, enquanto que a ORF 2 codifica uma enzima RNA-polimerase RNA-dependente (OIE, 2007).

Em infecções experimentais foi demonstrado que o IMNV possui uma menor virulência quando comparado a outros vírus, como o da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus* – TSV), da Síndrome da mancha branca (WSSV) e da Cabeça amarela (*Yellow Head Virus* – YHV). Em termos de hospedeiros, foi demonstrado que, além do *L. vannamei*, espécies como *P.monodon* e *L. stylirostris* são também susceptíveis a infecção por IMNV, além de outros camarões peneídeos (TANG et al., 2005).

No Brasil, os primeiros surtos para a doença apareceram em uma fazenda no município de Parnaíba, localizado no estado do Piauí, em setembro de 2002 (LIGHTNER et al., 2004), cujos prejuízos foram estimados em cerca de US\$20 milhões (NUNES et al., 2004). Entre 2003 e 2005, período em que ocorreu a maior propagação do vírus nas fazendas do Nordeste, tendo sido estimada uma queda de 150.000 toneladas na produção (NUNES, 2005 apud SILVA, 2010).

No continente asiático, os primeiros registros de surtos de IMN ocorreram em 2006, na Indonésia (SENAPIN et al., 2007), tendo o vírus apresentado uma identidade de 99,6% com o IMNV primeiramente reportado no Brasil (FLEGEL, 2009).

Quanto ao diagnóstico, a Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health* – OIE) (2007) recomenda: 1) a observação de sinais clínicos externos característicos; 2) a histopatologia utilizando secções de tecido em parafina corados com hematoxilina e eosina (BELL e LIGHTNER, 1988), para a observação de necrose muscular coagulativa, infiltração hemocítica, fibrose muscular e o aparecimento de esferoides do órgão linfóide (TANG et al., 2005 apud SILVA, 2010); e 3) métodos de biologia molecular, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* ou RT-PCR) descrito por Poulos et al. 2006).



Figura 1. Camarões *L. vannamei* com sinais clínicos de Mionecrose infecciosa. Há uma coloração leitosa nos últimos segmentos dos animais, evidenciando a fase aguda da infecção (pontas das setas). Fonte: Melena et al., 2012.

1.1.3. Síndrome da mancha branca

Estima-se que desde o primeiro relato de casos de mortalidade pela Síndrome da mancha branca (*White Spot Disease* - WSD) em camarões em 1992 na China, houve perdas de aproximadamente um bilhão de dólares por ano associadas ao vírus. O vírus da Síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus* – WSSV) se tornou o agente infeccioso mais danoso, em termos econômicos, para a carcinicultura marinha mundial (FLEGEL et al., 2008; ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

Pertencente à família *Nimaviridae* e gênero *Whispovirus*, este vírus envelopado é formado por DNA de fita dupla e um genoma com cerca de 305.000 pares de bases. Suas partículas virais têm formato ovóide ou elipsoides (formato de anzol), com uma simetria regular, além de possuir envelope e medir de 80 a 120 nm de diâmetro e de 250 a 380 nm de comprimento. Atualmente, embora vários isolados geográficos com variabilidade genética tenham sido identificados, todos ainda são classificados como uma única espécie do gênero *Whispovirus* (LO et al., 2012).

Em termos biológicos, o agente é viável por até 30 dias a 30°C em água do mar sob condições de laboratório (MOMOYAMA et al., 1998) e, em tanques e viveiros, por cerca de 4 dias (NAKANO et al., 1998). Outros estudos *in vitro* mostraram que o ciclo de replicação é de aproximadamente 20 horas a 25°C (CHANG et al., 1996; CHEN et al., 2011; WANG et al., 2000).

Todos os crustáceos da ordem *Decapoda*, seja de água doce ou marinha, são susceptíveis ao WSSV (FLEGEL, 1997; LIGHTNER, 1996; LO e KOU, 1998; MAEDA et al., 2000; STENTIFORD et al., 2009), independentemente do estágio de

desenvolvimento, de ovos a reprodutores (LIGHTNER, 1996; VENEGAS et al., 1999). Porém, a probabilidade de detecção é maior quando em estágios mais avançados de desenvolvimento, isto é, pós-larvas, juvenis e adultos, provavelmente como consequência da exposição a fatores estressantes, tais como mudas, alterações de salinidade, de temperatura e de pH, além da desova e ablação do pedúnculo ocular. O agente pode ser transmitido verticalmente, por via transovariana, e horizontalmente, por meio da ingestão de tecido infectado (como canibalismo, predação, etc.) e por imersão (carreado pela água) (OIE, 2016).

Já foi comprovado que vários vetores podem carrear o WSSV, tais como rotíferos, moluscos marinhos, poliquetas, crustáceos não decápodos, entre outros. Todas estas espécies podem acumular maiores concentrações de vírus viável (OIE, 2016).

O WSSV está presente em todos os continentes (GLANVILLE, NEVILLE e WALKER, 2017). No Brasil, a primeira notificação de WSSV ocorreu em 2005 em Laguna, no estado de Santa Catarina. Na ocasião, a doença afetou mais de 1400 ha de viveiros, causando um declínio na produção de quase 98% nos três anos seguintes (SEIFFERT et al., 2006; MULLER et al., 2010). Atualmente, todos os estados brasileiros produtores de camarão já registraram casos de WSD, podendo haver variação de cepas do vírus entre os estados (MULLER et al., 2010).

A infecção pode ou não levar à doença a depender de fatores não muito bem esclarecidos relacionados à espécie e/ou ambiente. Em pouco tempo os animais infectados apresentam grandes quantidades de partículas virais na hemolinfa, porém isto não significa que a WSD irá ocorrer. Caso a doença inicie seu curso, o aparecimento de pontos brancos aderidos à carapaça é o sinal clínico mais comum. No entanto, isto não é patognomônico, visto que infecções bacterianas e fatores de estresse como alta alcalinidade também podem gerar estas manchas. O comportamento do animal pode alterar e este se apresentar letárgico, com inapetência, migrar para as bordas do viveiro ou subir à superfície, podendo haver também mudança de sua coloração para rosa ou marrom avermelhada. Estes sinais geralmente evoluem para uma mortalidade massiva, podendo chegar a 100% do plantel em poucas horas ou dias (OIE, 2016).

Em caso de suspeita de infecção, os camarões podem ser investigados quanto aos sinais clínicos de WSD, além de submetidos a histopatologia e às análises moleculares como PCR; *Loop-mediated Isothermal Amplification* (ou Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* – LAMP) e hibridização *in situ* (OIE, 2016). Em regiões livres do vírus, o sequenciamento deve ser utilizado comoconfirmatório (LIGHTNER, 2011).



Figura 2. Camarão *P. monodon* com sinais de infecção por WSSV, evidenciada pela presença de pontos brancos aderidos à carapaça do animal. Fonte: Gopalakrishman et al., 2013.

1.1.4. Cultivo de camarões em sistema de bioflocos

Com a rápida expansão e intensificação do cultivo de camarão, o impacto ambiental de compostos nitrogenados inorgânicos se tornou uma grande preocupação (COWEY e CHO, 1991).

A piora na qualidade da água é alvo de críticas de órgãos voltados à conservação do meio ambiente que, em conjunto com agências governamentais estabeleceram regulamentos com valores limitantes para despejo de dejetos e qualidade de água, além de resultar em surto de doença e prejuízo econômico (HOPKINS e VILLALON, 1992; BOYD e YOO, 1994; SAMOCHA et al., 2004).

Assim, há necessidade de cultura de camarões produtiva, eficiente e sustentável que minimize o impacto ambiental, além de possuir biosseguridade que impossibilite ou reduza a ocorrência de surtos de doenças. Deste modo, criar os animais em um ambiente sob mínima/limitada troca de água tem se demonstrado uma alternativa viável (HOROWITZ e HOROWITZ, 2003).

Nos últimos anos, fontes de carbono têm sido utilizadas para reciclar os compostos nitrogenados (AVNIMELECH, 2009). Várias fontes já foram testadas para este fim tais como melaço, farinha de tapioca, farinha de arroz, açúcar, acetato e glicerol

(ANAND et al., 2013; ASADUZZAMAN et al., 2010; CRAB et al., 2010; EKASARI et al., 2010; GAO et al., 2012; MAIA et al., 2012; MEGAHED et al., 2010). Estes compostos contribuem para a formação de agregados com densas comunidades microbianas ideais para a nutrição dos camarões: o biofloco (AVNIMELECH, 2007). O melão da cana-de-açúcar é o mais utilizado no nordeste brasileiro por ser menos oneroso e bastante efetivo.

A tecnologia de bioflocos (*Biofloc technology* – BFT) é uma técnica ambientalmente “amigável” baseada na produção de microrganismos *in situ*. Em linhas gerais, a amônia é absorvida por microalgas e bactérias heterotróficas ou pode ser transformada por bactérias nitrificantes (EBELING et al., 2006). Ocorre crescimento desses microrganismos principalmente na forma de flocos microbianos (bioflocos) que podem servir de alimento para diversos tipos de animais (SCHRYVER et al., 2008). O BFT é, portanto, uma fonte natural rica em proteínas e lipídeos disponível *in situ* 24 horas por dia por sua complexa interação entre matéria orgânica, substrato e a diferentes microrganismos. Esta produtividade natural desempenha papel importante na manutenção da boa qualidade da água (EMERENCIANO et al., 2012).

Com a adoção deste método de cultivo também é possível aumentar a densidade de estocagem significativamente, sendo recomendados, 300 gramas de biomassa por metro quadrado, o que permite maior produção em áreas menores (EMERENCIANO et al., 2012). Estudos realizados indicam que estocagens de até 450 camarões/m² ainda resultam em boa sobrevivência e produtividade ao final do ciclo (SILVA et al., 2013).

Além disso, já foi comprovado que o consumo do bioflocos pelos animais traz benefícios nutricionais e/ou imunológicos. Foi evidenciado que a parede celular das bactérias formada por lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e β -1,3-glicanos, ativam o sistema imune de peixes e crustáceos e aumentam a resistência a infecções bacterinas e virais em camarões peneídeos (ITAMI et al., 1994; SONG et al., 1997; CHANG et al., 1999). Kim et al. (2014) provaram que o BFT confere proteção contra doenças em camarões cultivados, já que os bioflocos induzem ao desenvolvimento e manutenção do sistema imune do animal, construindo uma barreira de defesa para a população.

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

Avaliar o efeito do uso da tecnologia de bioflocos sobre a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente pelo vírus da Síndrome da mancha branca, vírus da Mionecrose infecciosa e co-infecção.

1.2.2. Específicos

- Sugerir um protocolo de infecção experimental com WSSV e IMNV para juvenis de *L. vannamei* cultivados em sistema de bioflocos;
- Determinar, por meio de PCR, o percentual de camarões infectados;
- Avaliar a sobrevivência dos animais infectados.

2. Referências bibliográficas

ANAND, P.S.S; KUMAR, S.; PANIGRAHI, A.;GHOSHAL, T.K.;DAYAL, J.S.;BISWAS, G.;SUNDARAY, J.K.; DE, D.;ANANDA, R.R.;DEO, A.D.;PILLAI, S.M.;RAVICHANDRAN, P. Effects of C:N ratio and substrate integration on periphyton biomass, microbial dynamics and growth of *Penaeus monodon* juveniles. **Aquaculture International**,v.21, p.511-524, 2013.

ASADUZZAMAN, M.; RAHMAN, S.M.S.; AZIM, M.E.; ISLAM, M.A.; WAHAB, M.A.; VERDEGEM, M.C.J.; VERRETH, J.A.J. Effects of C/N ratio and substrate addition on natural food communities in freshwater prawn monoculture ponds. **Aquaculture**, v.306(1-4), p.127-136, 2010.

AVNIMELECH, Y. BioFLOC Technology – A practical Guide Book, 2nd edition. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, United States, 2012.

AVNIMELECH, Y. Tilapia production using biofloc technology, saving water, waste recycling improves economics. **Global Aquaculture Advocate**, v.may/june, p.66-69, 2011.

AVINIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v.35, p.176-227, 1999.

BANDEIRA, J.T. Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) em crustáceos e moluscos nativos no Rio Paraíba – PB. 2016. 53p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology, **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Los Angeles, United States, 1998.

BOYD, C.E.; YOO, K.H. Hydrology and Water Supply for Pond Aquaculture, Chapman and Hall, New York, United States, p.439-449, 1994.

CAMPOS, K.C.; CAMPOS, R.T. Alternativa Econômica para o Novo Rural do Nordeste do Brasileiro: O Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Água Doce. **Revista GEPEC**, v.10, n° 02, p. 40-53, 2006.

CHANG, C.F.; SU, M.S.; CHEN, H.Y.; LO, C.F.; KOU, G.H.; LIAO, I.C. Effect of dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v.36, p.163–168, 1999.

CHANG, P.S.; LO, C.F.; WANG, Y.C.; KOU, G.H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, p.131–139, 1996.

CHEN, I.T.; AOKI, T.; HUANG, Y.T.; HIRONO, I.; CHEN, T.C.; HUANG, J.Y.; CHANG, G.D.; LO, C.F.; WANG, H.C. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. **Journal of Virology**, v.85, p.12919–12928, 2011.

CRAB, R., LAMBERT, A., DEFOIRDT, T., BOSSIER, P., VERSTRAETE, W. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **Journal of Applied Microbiology**, v.109 (5), pp.1643-1649, 2010.

COWEY, C.B.; CHO, C.Y. Nutritional strategies & aquaculture waste. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste. **University of Guelph**, Guelph, Ontario, 1991.

DURAND, S.V.; LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BONAMI, J.R. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.29, p.205–211, 1997.

EBELING, J.M.; TIMMONS, M.B.; BISOGNI, J.J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems, **Aquaculture** v.257, p.346-358, 2006.

EKASARI, J.; HANIF AZHAN, M.; SURAWIDJAJA, E.H.; NURYATI, S.; DE SCHRYVER, P.; BOSSIER, P. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish Shellfish Immunology**, v.41(2), p.332-339, 2014.

EKASARI, J.; CRAB, R.; VERSTRAETE, W. Primary nutritional content of bioflocs cultures with different organic carbon sources and salinity. **Hayati Journal Bioscience**, v.17(3): p.125- 130, 2010.

EMERENCIANO, M.G.C.; MARTINEZ-CORDOVA, L.R.; MARTINEZ-PORCHAS, M.; MIRANDA-BAEZA, A. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In: TUTU, H. Water Quality. 2017, p.91-109.

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; GOGUENHEIM, J.; GAXIOLA, G. Aquacop. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture Research**, v.44, p.75–85, 2012.

EMERENCIANO, M.; BALLESTER, E.L.C.; CAVALLI, R.O.; WASIELESKY, W. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp

Farfantepenaeus paulensis: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. **Aquaculture International**, v.19(5), p.891-901, 2011.

ESCOBEDO-BONILLA C.M.; ALDAY-SANZA V.; VILLE M.; SORGELOOS P.; PENSAERT M.B.; NAUWYNCK H.J. A review on the morphology, molecular characterization, mophogenesis and pathogenesis of White spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.31, p.1–18, 2008.

FAO. Fisheries Global Information System. Fisheries and Aquaculture Department, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/figis/en>>. Acesso em 3 abril 2017.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Fisheries and Aquaculture Department, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em 3 abril 2017.

FIGUEIREDO, M.C.B.; ROSA, M.F.; GONDIM, R.S. Sustentabilidade Ambiental da Carcinicultura no Brasil: Desafios para a Pesquisa. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v.34, 2003.

FLEGEL, T.W. Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and insects. **Biol Direct**, v.4, p.32, 2009.

FLEGEL, T.W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.433–442, 1997.

FLEGEL, T.W.; LIGHTNER, D.V.; LO, C.F.; OWENS, L.; BONDAD-REANTASO, M.G.; MOHAN, C.V.; CRUMLISH, M.; SUBASINGHE, R.P. Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, **Asian Fisheries Society**. Philippines: Manila; Shrimp disease control: past, present and future; pp. 355–378, 2008.

GAO, L.; SHAN, H.W.; ZHANG, T.W.; BAO, W.Y.; MA, S. 2012. Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange systems. **Aquaculture**, v.342- 343, p.89-96, 2012.

GLANVILLE, R.; NEVILLE, P.; WALKER, P. White Spot Disease of Prawns: Queensland Response 2016-2017 Scenario Planning Advisory Panel Report. 2017. Disponível em:

<https://www.daf.qld.gov.au/_data/assets/pdf_file/0010/1237285/WSSV-advisory-panel-report.pdf>. Acesso em 20 abril 2017.

HOPKINS, J.S.; VILLALON, J. Synopsis of industrial panel input on shrimp pond management, in: Wyban, J.A. (ed.), Proceedings of the special session on shrimp farming. May 22–25. **World Aquaculture Society**, Batson Ridge, Louisiana, USA, p. 138–143, 1992.

HOROWITZ, A.; HOROWITZ, S. Biosecurity, biofiltration and microbiological community role in sustainable shrimp farming, in: Jory, D.E. (ed.), Proceedings of a Special Session on Shrimp Farming. Responsible Aquaculture for a Secure Future. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, USA, p. 157–165, 2003.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA), Produção da Aquicultura por tipo de produto. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>>. Acesso em 3 abril 2017.

ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; TSUCHIHARA, E.; IGUSA, H.; KONDO, M. Enhancement of disease resistance of Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of B 1-3 glucan (Schizophyllan) In: CHOU, L.M.; MUNRO, A.D.; LAM, T.T.; CHEN, T.W.; LEONG, L.K.K.; DING, J.K.; HOOI, K.K.; KHOO, H.W.; PHANG, V.P.E.; SHIM, K.F.; C.H.TAN (eds) The Third Asian Fisheries Forum, Asian Fish.Soc. Manila, 1994. p.375-378.

KIM, S.K.; PANG, Z.; SEO, H.C.; CHO, Y.R.; SAMOCHA, T.; JANG, I.K. Effect of bioflocos on growth and immune activity of Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**, v.45, p.362-371, 2014.

LIGHTNER, D.V. Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. In: BONDAD-REANTASO, M.G.; JONES, J.B.; CORSIN, F.; AOKI, T. **Diseases in Asian AquacultureVII**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 2011. P.121-134.

LIGHTNER, D.V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1996. 304p.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R. Bioseguridad En El Cultivo De Camarones. Departamento de Ciencias Veterinarias y Microbiología - **Universidad de Arizona, Tucson**, U.S.A. p.123 – 166, 2001.

LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; TANG, K.F.J.; REDMAN, R.M.; ANDREAS, T.; BONAMI, J.R. Infectious myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. In Aquaculture 2004 Book of Abstracts, Baton Rouge, LA: **World Aquaculture Society**, p. 353, 2004.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, K.M. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.38, p.299-302, 1981.

LO, C.F.; KOU, G.H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. **Fish Pathology**, v.33, p.365–371, 1998.

LO, C.F.; LEU, J.H.; HO, C.H.; CHEN, C.H.; PENG, S.E.; CHEN, Y.T.; CHOU, C.M.; YEH, P.Y.; HUANG, C.J.; CHOU, H.Y.; WANG, C.H.; KOU, G.H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.25, p.133-141, 1996.

LU, Y.; TAPAY, L.M.; BROCK, J.A.; LOH, P.C. Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). **Journal of Fish Diseases**, v.17, p.649-656, 1994.

MAEDA, M.; ITAMI, T.; MIZUKI, E.; TANAKA, R.; YOSHIZU, Y.; DOI, K.; YASUNAGA-AOKI, C.; TAKAHASHI, Y.; KAWARABATA, T. Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. **Acta Virology**, v.44, p.371–374, 2000.

MAIA, E.P.; MODESTO, G.A.; BRITO, L.O.; GALVEZ, A.O. 2012. Crescimento, sobrevivência e produção de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema intensivo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.17(1), p.15-19, 2012

MEGAHED, M.E. The effect of microbial biofloc on water quality, survival and growth of the green tiger (*Penaeus semisulcatus*) fed with different crude protein levels. **Journal of the Arabian Aquaculture Society**, v.5(2): p.119-142, 2010.

MELINA, J.; TOMALÁ, J.; PANCHANA, F.; BETANCOURT, I.; GONZABAY, C.; SONNENHOLZNER, S.; AMANO, Y.; BONAMI, J.R. Infectious muscle necrosis etiology in the Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Ecuador. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5(1), p.31-36. 2012.

MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; NAKANO, H.; SAMESHIMA, M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. **Fish Pathology**, v.33, p.95–96, 1998.

MULLER, I.C.; ANDRADE, T.P.D.; TANG-NELSON, K.F.J.; MARQUES, M.R.F.; LIGHTNER, D.V. Genotyping of White Spot Syndrome Virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 91-98, 2010.

NAKANO, H.; HIRAOKA, M.; SAMESHIMA, M.; KIMURA, T.; MOMOYAMA, K. Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. **Fish Pathology**, v.33, p.65–71, 1998.

NAKANO, H.; HIRAOKA, M.; UMEZAWA, S.; MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; INOUE, K.; OSEKO, N. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. **Fish Pathology**, v.29, p.135-139, 1994.

NUNES, A.J.P. Um ano de mudanças, perdas e ganhos. **Panorama da Aquicultura**, v.92, p.26–33, 2005.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V. 2004. Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura** v.83, p.37–51, 2004.

OIE. White Spot Disease. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2016. Capítulo 2.2.7. p. 1-14. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_wsd.pdf> Acesso em 3 abril 2017.

PÉREZ, F., VOLCKAERT, F.A.M., CALDERÓN, J. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v.250 (3-4), p.586-591, 2005.

PINHEIRO, A.C.A.S.; LIMA, A.P.S.; SOUZA, M.E.; NETO, E.C.L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES, S.P.; COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v.262, p.17-22, 2007.

POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.73, p.69-72. 2006.

ROCHA, I. P. **A carcinicultura brasileira em 2003, 2004**. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em 4 abril 2017.

ROCHA, I.P. Cultivo do Camarão Marinho: Atividade Socialmente Justa, Ambientalmente Responsável e, Economicamente Importante, de Forma Especial para o Meio Rural da Região Nordeste. **Carcinicultura Marinha Brasileira – Artigo Executivo**. Postado em 21/05/2015 por ABCCAM. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2015/05/Carcinicultura-Marinha-Brasileira-Artigo-Executivo.pdf>>. Acesso em: 21/02/2016.

SAMOCHA, T.M.; LAWRENCE, A.L.; COLLINS, C.A.; CASTILLE, F.L.; BRAY, W.A.; DAVIES, C.J.; LEE, P.G.; WOOD, G.F. Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. **Journal of Applied Aquaculture**, v.15 (3/4), p.1-19, 2004.

SCHRYVER, P.D.; CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. The basics of bioflocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, v.277, p.125-137, 2008.

SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E.R.; MAGGIONI, D.S. (2006) Enfermidades, uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura** v.97, p.32–38, 2006.

SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T.W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v.266, p.32–38, 2007.

SILVA, S.M.B.C. Análise quantitativa da carga viral do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) em diferentes tecidos do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* naturalmente infectado. 2010. 81p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, S.M.B.C.; LAVANDER, H.D.; SANTANA, M.M.L.; SILVA, A.O.M.E.; GÁLVEZ, A.O.; COIMBRA, M.R.M. *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology** v.126 p.1–5, 2015.

SILVA, K.R., WASIELESKY JR, W., ABREU, P.C. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.44 (1), p.30-41, 2013.

SONG, Y.L.; LIU, J.J.; CHAN, L.C.; SUNG, H.H. Glucan induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Developments in Biological Standardization**, v.90, p.413–421, 1997.

STENTIFORD, G.D.; BONAMI, J.R.; ALDAY-SANZ, V. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellow head disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. **Aquaculture**, v.291, p.1–17, 2009.

TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.63, p.261–265, 2005.

VAN HULTEN, M.C.W.; VLAK, J.M. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of White Spot Syndrome Virus. **Virus Genes**, v.22, p.201-207, 2001.

VENEGAS, C.A.; NONAKA, L.; MUSHIAKE, K.; SHIMIZU, K.; NISHIZAWA, T.; MUROGA, K. Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. **Fish Pathology**, v.34, p.19-23, 1999.

WANG, C.H.; YANG, H.N.; TANG, C.Y.; LU, C.H.; KOU, G.H.; LO, C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.41, p.91-104, 2000.

WU, J.L.; NISHIOKA, T.; MORI, K.; NISHIZAWA, T.; MOROGA, K. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v.13, p.391-403, 2002.

3. Artigo Científico

Efeitos do uso da tecnologia de bioflocos em camarão marinho infectado experimentalmente pelos vírus da Mancha branca e Mionecrose infecciosa

Resumo

A tecnologia de criação de camarões em sistema fechado com bioflocos (BFT) vem se mostrando uma alternativa para evitar surtos recorrentes de doenças infecciosas exóticas. O papel imunestimulante dele já foi comprovado em vários estudos, protegendo o camarão por meio da ativação de diversos fatores presentes em seu sistema imune e conferindo uma maior resistência à infecção. Dentre estes agentes, os vírus da Síndrome da mancha branca (WSSV) e da Mionecrose infecciosa (IMNV) historicamente já causaram perdas na casa dos bilhões de dólares e hoje estão difundidos em todo o mundo, incluindo os estados brasileiros produtores de camarão. Nosso objetivo foi avaliar o efeito do uso da tecnologia de bioflocos em camarão marinho infectado experimentalmente pelo WSSV e IMNV. Os animais foram distribuídos em três tratamentos, sendo um com infecção por imersão pelo WSSV (W), um segundo com infecção via ingestão pelo IMNV (I), um terceiro pelas duas vias anteriores (IW), além do controle negativo (C), sem desafio viral. Ao final do experimento (dia 20), a taxa de mortalidade não diferiu estatisticamente entre nenhum grupo. A análise por PCR não acusou positividade para WSSV em nenhuma amostra, porém houve animais positivos para IMNV nos tratamentos C (23,8%) e W (8,7%). No entanto, nenhum animal apresentou alterações macro e microscópicas, o que indica o não desenvolvimento da infecção. Estes resultados apontam uma resistência à infecção por parte dos animais, sugerindo que os bioflocos podem agir como barreira contra a infecção.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*; bioflocos; co-infecção.

Introdução

A emergência de novas doenças virais no Brasil tem sido a principal causa de perdas da produção na carcinicultura nos últimos anos (CUÉLLAR-ANJEL et al., 2012, LIGHTNER et al., 2012). Dentre estas, podemos citar a infecção causada pelo vírus da Mionecrose infecciosa (*Infectious myonecrosis virus* – IMNV), que foi apontado como um dos principais fatores para a redução nas taxas de sobrevivência e consequente queda na produção no Brasil em meados de 2003, com perdas estimadas em 20 milhões de dólares naquele ano. (SILVA, 2010).

Outro vírus e também o de maior impacto para carcinicultura mundial é o responsável pela Síndrome da mancha branca (*White spot syndrome virus* ou WSSV), ~~que pode causar mortalidade de até 100% dentro de 7 a 10 dias em indivíduos susceptíveis (LIGHTNER, 1996).~~ No Brasil, a primeira notificação de WSSV ocorreu em 2005 em Laguna, no estado de Santa Catarina. Na ocasião, a doença afetou mais de 1400 ha de viveiros, causando um declínio na produção de quase 98% em três anos (SEIFFERT et al., 2006; MULLER et al., 2010). Estas doenças estão disseminadas em todo o Brasil, tendo ocorrências recentes registradas nos maiores estados brasileiros produtores de camarão (ROCHA, 2016; IBGE, 2017).

Os camarões, bem como outros invertebrados, possuem apenas a imunidade inata, ou seja, não possuem memória imunológica e a consequente produção de anticorpos específicos para combate à infecção (WU et al., 2002 apud SILVA, 2010). Como não é viável a vacinação dos plantéis, o desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico precoce e de linhagens resistentes ao patógeno específico (*Specific Pathogen Resistant* – SPR), além de implantação de programas de biossegurança, são as medidas que podem ser tomadas para atenuação do problema (SILVA, 2010).

Dentre esses programas, Uma alternativa que vem se mostrando interessante para o controle das infecções virais na aquicultura é o cultivo em sistema fechado com bioflocos (*BioFLOC technology* – BFT) (AVNIMELECH, 2012). Seu princípio básico é transformar nutrientes residuais, especialmente o nitrogênio, em biomassa microbiana que pode ser usada no próprio sistema (AVNIMELECH, 1999). Já foi demonstrado que o cultivo de camarões *L. vannamei* em sistema de bioflocos pode induzir a uma

expressão de genes responsáveis pela cascata de profenoloxidase (proPO), uma das principais respostas imunes inatas dos crustáceos (KIM et al., 2013). Assim, o cultivo em sistemas de bioflocos pode estar relacionado com uma melhor eficiência da imunidade inata do camarão, ou até mesmo com uma atenuação das características patogênicas do agente causador de uma determinada doença (KIM et al., 2014).

Objetivou-se avaliar o efeito do uso da tecnologia de bioflocos sobre a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente pelo vírus da Síndrome da mancha branca, vírus da Mionecrose infecciosa e co-infecção entre estes dois agentes.

Material e métodos

a) Aquisição dos animais:

Foram utilizados 1200 indivíduos juvenis de *L. vannamei* com peso médio de 2,15 g, coletados em tanques com bioflocos de fazenda comercial de engorda, localizada no município de Canguaretama, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil (16°18'06" S; 35°02'26" W). Por ocasião da coleta, os animais foram avaliados quanto a possíveis alterações macroscópicas, segundo Cuéllar-Anjel (2008), sendo selecionados apenas os aparentemente hígidos.

Cerca de 1000 L de água com bioflocos também foram coletados da mesma propriedade, e apresentava-se com sólidos sedimentáveis de 5 ml/L e salinidade de 16 g/L. Os camarões e a água foram transferidos para o Laboratório de Maricultura Sustentável (LAMARSU) e mantidos em tanque de fibra de vidro com capacidade de 1000 L (800 L de volume útil) até a realização dos desafios.

No intuito de detectar a presença de WSSV, análises de PCR foram conduzidas, considerando uma prevalência mínima estimada de 10% (CANNON e ROE, 1982), segundo protocolo de Lo et al. (1996). Todas as amostras analisadas foram negativas e os animais usados nos desafios. Estas mesmas amostras não foram submetidas à análise prévia para IMNV, devido à inexistência de histórico de infecção por este vírus na propriedade.

b) Inóculos virais

A preparação do inóculo para infecção experimental por WSSV foi realizada no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) na Universidade Federal do Ceará, seguindo o protocolo descrito por Pérez et al. (2005), com algumas modificações. Resumidamente, animais provenientes de uma fazenda de engorda de *L. vannamei* do Nordeste do Brasil foram coletados durante um surto de Síndrome da mancha branca, sendo estes triados por *nested*-PCR (Lo et al., 1996) para confirmação da presença deste patógeno. O tecido contaminado foi macerado e homogeneizado em PBS 1X em concentração de 95% (p:v) a 4°C e, em seguida, centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então removido e filtrado através de dois filtros com membrana polietersulfônica (PES) (0,45 e 0,22µm) (Biosystems). A carga viral do filtrado (inóculo viral - 10⁴ cópias virais/µg de DNA) foi quantificada via PCR em tempo real (FEIJÓ et al., 2013) e este material foi dividido em alíquotas de 1,5 ml para posterior armazenamento a -80°C até a sua utilização nos desafios virais.

Para o IMNV, foi utilizado músculo abdominal de reprodutores de *L. vannamei* previamente analisado por PCR em tempo real (Silva et al., 2015) com carga viral de 10⁶ cópias por µg⁻¹ de RNA total e armazenado a -80°C.

c) Desafios virais:

Os animais selecionados foram distribuídos aleatoriamente em unidades experimentais de policloreto de polivinila (PVC) opacas com 15 litros de água com bioflocos cada, submetido a aeração forte e constante.

Para a manutenção do BFT foi utilizada água do mar (16 g/L de salinidade) previamente clorada a 20 ppm por 24 horas, no intuito de repor perdas por evaporação ou diluir os sedimentos. Como fonte de carbono orgânico utilizou-se melão de cana-de-açúcar (40% de carbono), e de nitrogênio, ração comercial (40% de proteína bruta), visando uma relação de carbono:nitrogênio (C:N) de 12:1, calculada segundo Samocha et al. (2007) e Avnimelech et al. (2009). Para a manutenção do pH acima de 7,3 e alcalinidade acima de 100 mgL⁻¹, foi adicionada cal hidratada (Ca(OH)₂) como sugerido por Furtado et al. (2011).

Os animais foram alimentados com ração comercial (40% de proteína bruta) quatro vezes ao dia (8h, 11h, 14h e 17h) e a quantidade de alimento ofertada era

ajustada de acordo com a estimativa de consumo, mortalidades e sobras, segundo a metodologia descrita por Van Wyk e Scarpa (1999). A cada semana, eram verificadas diversas variáveis de qualidade da água tais como: amônia total, amônia tóxica, nitrito, alcalinidade e pH (todos via testes colorimétricos); salinidade (via refratômetro) e a quantidade de sólidos (via cone de Imhoff). A temperatura foi aferida todos os dias, duas vezes ao dia, com termômetro de mercúrio.

O desafio viral foi dividido em três tratamentos mais um grupo controle: a) tratamento com animais submetidos à infecção experimental através da ingestão de tecido contaminado por IMNV (tratamento I); b) animais submetidos à infecção experimental através da imersão de inóculo viral de WSSV (tratamento W); e c) animais submetidos à co-infecção através dos dois métodos anteriores (tratamento IW). O grupo controle foi submetido à ingestão de tecido não contaminado (negativo para WSSV e IMNV). Para cada tratamento e controle foram usadas três repetições. Em cada unidade foram distribuídos 10 camarões, perfazendo uma densidade de 1 animal/1,5 L.

Para a infecção experimental com IMNV (tratamentos I e IW), utilizou-se o método de ingestão de tecido contaminado, conforme Silva et al. (2015). Segundo este protocolo, os animais foram alimentados com músculo abdominal a 10% da biomassa/dia através da oferta de 5% de biomassa por duas vezes ao dia, durante sete dias. Do 8º dia até o final do experimento (20º dia), os camarões foram alimentados com ração comercial à mesma biomassa, com observação diária para determinação de sinais clínicos de infecção por IMNV e de mortalidade.

O tratamento W (animais submetidos à infecção experimental através da imersão de inóculo viral de WSSV) foi efetuado via imersão, através da adição de inóculo viral preparado (carga viral de 10^4 cópias virais/ μg de DNA), segundo protocolo descrito por Pérez et al. (2005) para estudos de patogenicidade do vírus em *L. vannamei* cultivado em águas claras.

Inicialmente, o inóculo foi submetido a uma diluição de 1:100 e um volume de 30 mL foi administrado em cada unidade experimental dos tratamentos com WSSV (W) e co-infecção (IW) duas vezes ao dia, com intervalo de três horas entre as inoculações, por um único dia. Após este período, os animais foram alimentados com ração comercial e observados por 20 dias para visualização de sinais clínicos e mortalidade.

Para o tratamento controle administrou-se tecido negativo para IMNV e WSSV na mesma proporção e condições dos tratamentos I e IW. Durante todo o experimento, os animais mortos e sobreviventes (ao final do experimento) foram coletados, pesados, sacrificados em gelo e armazenados a -80°C para análise molecular via PCR. Vinte por cento dos animais sobreviventes foram destinados ao exame histopatológico.

d) Extração do DNA

O DNA foi extraído conforme o protocolo de Sambrook et al. (1989), com base em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, com algumas modificações. Em cada amostra foram adicionados 700 μL de tampão de extração (10 mMNaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 25 mM EDTA pH 7,5) com uma concentração final de 1% de SDS e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Proteinase K. Em seguida, a purificação do DNA foi efetuada através da adição de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O sobrenadante foi então precipitado com etanol e o DNA ressuspensionado em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado a -20°C até a sua utilização, sendo quantificado em fluorômetro QuantusTM através do QuantiFluorTM ONE dsDNA System, da Promega (USA).

e) Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído segundo protocolo de Pinheiro et al. (2007). O tecido foi macerado e, posteriormente digerido em 1 mL de Trizol (Invitrogen). O RNA foi precipitado com álcool isopropílico, na proporção de 1:1 e, lavado com etanol a 75%, para ser ressuspensionado em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -80°C .

A síntese de cDNA foi realizado em um volume final de 20 μL , conforme as instruções do fabricante Promega (USA). Inicialmente, para um volume final de 5 μL foram adicionados 2 μL de RNA total e 0,5 μg de oligo(dT)₁₅. Esta mistura foi aquecida a 70°C por 5 minutos, e então, imediatamente resfriada em gelo por 5 minutos. Posteriormente foram acrescentados a cada 5 μL desta mistura, um segundo mix composto por 1X tampão da enzima Improm-II, 3mM de MgCl_2 , 0,5mM de cada dNTP, e 1 μL da enzima transcriptase reversa Improm-II (Promega, USA). Todo o volume foi

incubado a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA foi diretamente usado na PCR ou armazenado a -20°C até posterior utilização.

f) PCR

A detecção do IMNV foi realizada segundo o protocolo descrito por Pinheiro et al. (2007). As amplificações foram conduzidas em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de cDNA, 1U de *Taq*polimerase, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 5 pmol dos primers específicos para IMNV (IMNV-F 5'-CGACGCTGCTAACCATACAA-3' e IMNV-R 5'-ACTCGCCTGTTTCGATCAAGT-3') e 1X tampão de PCR (50 mM KCL; 10 mM Tris pH 9; Triton X-100 0,1%). Para esta reação foram usados como amostra o cDNA sintetizado, sendo adicionado a cada reação um controle positivo para o vírus da Mionecrose infecciosa e um controle negativo contendo apenas água ultra-pura. O ciclo térmico consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 39 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos primers a 60°C por 45 segundos e, extensão a 72°C por 45 segundos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e o tamanho do fragmento (328pb), determinado através de um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, USA), sendo foto-documentado e analisado através do KODAK *Gel Logic 100 Imaging System*.

Para o WSSV, utilizou-se uma *nested*-PCR de acordo com Lo et al. (1996) para um volume final de 50 µl. Na primeira reação, utilizou-se 1 µl de DNA total com concentração aproximada de 50 ng e um *mix* contendo 10 mM Tris-HCl, pH 9 a 25°C, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada primer (146F1 5'-ACTACTAACTTCGCCTATCTAG-3' e 146R1 5'-TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA-3'). Similarmente, as condições de amplificação da 2ª reação foram conduzidas, mas aplicando-se 1 µl do produto da 1ª reação e os primers 146F2 5'-GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA-3' e 146R2 5'-TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT-3'. Em todas as reações (1ª e 2ª PCRs) foram inseridos controles positivos para WSSV e negativos (água ultra-pura). As amplificações ocorreram na seguinte ciclagem de temperatura: 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos; seguidos de 39 ciclos de 94°C por 1

minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos; além de uma extensão final de 72°C por 5 minutos após os 40 ciclos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio e o amplicon de 848 pb foi determinado através de um marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen), sendo fotodocumentado através do *software* KODAK *Gel Logic 100 Imaging System*.

g) Histopatológico

As análises foram conduzidas no Laboratório Maria Ignez Cavalcante, na Área de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural de Pernambuco. As amostras submetidas ao exame histopatológico foram fixadas em solução de Davidson, segundo Bell e Lightner (1988). Para a fixação, os animais foram infiltrados e imersos em Davidson por 24 horas e, em seguida, lavados em água e transferidos para uma solução de etanol a 70%.

Após isto, as amostras foram submetidas à desidratação por etanol, diafanização por xilol e emblocamento com parafina, e cortadas em micrótomo. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983) e submetidas à análise de patologia de crustáceos de acordo com a literatura específica (LIGHTNER, 1996).

h) Análise estatística

Os dados foram expressos através da média, desvio padrão e frequências (absolutas e relativas). Inicialmente, avaliou-se a distribuição dos valores (normalidade) utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis para a comparação dos resultados obtidos nos grupos (Controle, I, W e IW). Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (Teste F) e, para a comparação entre grupos (Controle, I, W e IW) empregou-se o teste de Tukey. A comparação entre o peso inicial e final de cada grupo foi realizada através do teste t de Student. Além disso, realizou-se uma análise de associação entre os resultados da PCR nos grupos empregando-se o teste do Qui-quadrado (X^2) (SAMPAIO, 1998). O

programa IBM SPSS Statistics 23.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

Resultados e discussão

Os dados das variáveis de qualidade de água encontram-se resumidos na tabela 1. Os valores de pH, amônia total e amônia tóxica diferiram estatisticamente ao longo das semanas para os grupos controle (C), IMNV (I) e co-infecção (IW). Segundo Kim et al. (2014), os mais altos valores de amônia total (3 mg/L) encontraram-se fora dos níveis considerados adequados para o *L. vannamei* cultivado em sistema de bioflocos. No tratamento W a amônia total estava bem abaixo do em relação aos outros tratamentos na primeira semana, provavelmente devido ao fato de não haver oferta de tecido nestas unidades, já que seria uma fonte adicional de matéria orgânica. Os valores de pH mantiveram-se, por quase todo o tempo, numa faixa em que possibilita o melhor desenvolvimento de camarões e bactérias nitrificantes, mesmo próximo ao limite mínimo ideal (7) (Furtado et al., 2011).

Apesar de ter havido diferenças estatísticas significativas entre as semanas para os tratamentos C, W e IW, a temperatura manteve-se dentro de uma faixa apropriada para a criação de camarões, ainda que, para animais com este tamanho (aproximadamente 2 gramas), a temperatura ideal para que se possa alcançar uma maior taxa de crescimento esteja acima de 30°C (PONCE-PALAFOX et al., 1997; WYBAN et al., 1995).

O nitrito diferiu no tratamento controle na primeira semana se comparado às outras três seguintes. Os níveis deste composto em todos os tratamentos mantiveram-se dentro da faixa considerada segura para *L. vannamei* (abaixo de 6,1 mg/L de nitrito) para a salinidade utilizada em nosso experimento (16 g/L) (GROSS et al., 2004). Na quarta semana, o nitrito aumentou em relação a terceira semana, ao passo que a amônia total reduziu entre as duas últimas semanas. Isto indica o início de uma rota de nitrificação, característica dos sistemas com bioflocos (AZIM e LITTLE, 2008; SCHRYVER et al., 2008). Em sistemas heterotróficos, há a conversão de amônia a nitrito e, deste, a nitrato e posteriormente a nitrogênio por meio da comunidade bacteriana (HARGREAVES, 2006).

Tabela 1. Resumos dos parâmetros (média e desvio padrão) obtidos nos grupos durante o experimento

Semana	Grupo	pH	Amônia Total (mg/L)	Amônia Tóxica	Nitrito	Temperatura	Sólidos sedimentáveis
1	Controle	7,0±0,0 ^B	3,00±0,00 ^a	0,051±0,000 ^a	1,25±0,43^A	28,0±0,0 ^A	
	I	7,0±0,0 ^B	3,00±0,00 ^{aA}	0,051±0,000 ^a	0,66±0,29	28,0±0,0	
	W	7,6±0,0	0,16±0,29^{bB}	0,004±0,008^b	1,33±0,72	28,0±0,0^A	
	IW	6,8±0,0 ^B	3,00±0,00 ^{aA}	0,051±0,000 ^a	1,00±0,00	28,0±0,0^A	
2	Controle	7,3±0,0 ^B	3,00±0,00	0,051±0,000 ^a	0,00±0,00 ^B	27,0±1,0 ^{AB}	
	I	7,3±0,0 ^{AB}	3,00±0,00 ^A	0,051±0,000 ^a	0,50±0,43	26,0±0,0	
	W	7,3±0,0	3,00±0,00^A	0,004±0,008^b	0,08±0,14	26,0±0,0 ^B	
	IW	7,3±0,0 ^{AB}	3,00±0,00 ^A	0,051±0,000 ^a	0,33±0,29	26,7±0,8 ^B	
3	Controle	7,3±0,0 ^B	3,00±0,00	0,051±0,000	0,00±0,00 ^B	28,3±0,6 ^A	21,3±1,1 ^B
	I	7,3±0,0 ^{AB}	3,00±0,00 ^A	0,051±0,000	0,08±0,14	28,0±0,0	29,0±3,6
	W	7,3±0,0	3,00±0,00^A	0,051±0,000	0,16±0,14	28,0±0,0^A	34,0±8,5
	IW	7,3±0,0 ^{AB}	3,00±0,00 ^A	0,051±0,000	0,08±0,14	28,0±0,0^A	29,3±3,1
4	Controle	7,7±0,3^A	0,00±0,00		0,08±0,14 ^B	26,0±0,0^B	47,3±11,0^A
	I	7,4±0,3^A	0,08±0,14^B		0,25±0,25	26,0±0,0	42,3±2,5
	W	7,4±0,3	1,08±0,14 ^B		0,41±0,52	25,7±0,6 ^B	44,0±2,0
	IW	7,5±0,4^A	0,16±0,29^B		0,33±0,57	26,0±0,6 ^B	45,6±0,6

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos para uma mesma semana. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre semanas para um mesmo grupo. Colunas em branco indicam que os parâmetros não foram aferidos naquela semana.

Os sólidos sedimentáveis diferiram significativamente para o tratamento controle, nas duas semanas em que foram aferidos (semanas 3 e 4). Recomenda-se um valor máximo de 15 mL/L de sólidos sedimentáveis em sistemas com BFT para camarões (TAW, 2010; EMERENCIANO et al., 2012) valor bem abaixo do que foi encontrado no nosso trabalho. Vários fatores podem levar a um aumento dos sólidos, incluindo a composição da água ou efluente, o manejo, processos biológicos e o formato do tanque (PRESTON et al., 2000). Os níveis mantiveram-se altos ainda que houvesse a tentativa de diluí-los por meio de adição de água. A alta concentração de sólidos deve ser evitada por ser uma fonte adicional de amônia, por provocar um aumento na demanda bioquímica por oxigênio, além de causar danos severos às brânquias por obstrução, levando ao estresse e ao aumento à susceptibilidade a doenças (BAKHSH e CHOPIN, 2011). Ebeling et al. (2006) apontaram que a elevada produção de bactérias em sistemas heterotróficos, comparada à biomassa de fitoplâncton produzida na cultura autotrófica, leva a um conseqüente aumento de sólidos sedimentáveis.

Em termos de taxa de sobrevivência final média foram obtidos os valores mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Comparação entre a taxa de sobrevivência final média dos grupos (dia 20).

GRUPOS				Valor P ^(A)
Controle	I	W	IW	
90,0%	76,7%	90,0%	80,0%	0,452

(A) Teste de Kruskal Wallis

A sobrevivência final média dos tratamentos foi de 90% para C, 76,6% para o tratamento com I, 90% para o tratamento W e 56,7% para IW. Tais resultados podem estar associados à via de desafio, que pode ter sido ineficiente para que ocorresse a infecção, diferentemente de Escobedo-Bonilla et al. (2008) que observaram uma sobrevivência de 0% dos animais após cinco dias de infecção por WSSV através de ingestão de tecido contaminado. Similarmente, Pérez et al. (2005) em um estudo sobre a patogenicidade do WSSV em pós-larvas de *L. vannamei* cultivado em águas claras, verificaram duas vias de infecção, a oral (por ingestão de tecido contaminado) e a por imersão de inóculo viral e registraram menores taxas médias de sobrevivência no

tratamento desafiados pela via oral com 0% de sobrevivência ao 7º dia em comparação com a via de imersão, que exibiu quase 50% de sobrevivência para o mesmo período.

Em estudo realizado por Arts et al. (2007) exemplares de *Penaeus monodon* foram desafiados com inóculo de WSSV por quatro horas e transferidos para outro recipiente onde ficaram por 72 horas. À análise imuno-histoquímica foi observado que havia sinais de desenvolvimento da doença como infiltração hemocítica e adsorção do vírus no epitélio de brânquias e intestino.

Supamattaya et al. (1998) infectaram experimentalmente o camarão *Acetes* sp. Com WSSV pela via de imersão de inóculo e obtiveram mortalidade total em cinco dias pós-infecção (DPI). Em experimento conduzido por Hameed et al. (2003) foi revelado que caranguejos de 16 espécies diferentes apresentaram desenvolvimento da WSD e sobrevivências entre 10% e 40% após 30 dias pós-infecção por meio de imersão de inóculo, confirmados por PCR, indicando que a esta rota também pode levar a mortalidades mais tardias, dependendo da dose (PÉREZ et al., 2005; CASTILLO-JUÁREZ et al., 2015; SAULNIER et al., 2000).

Normalmente, a injeção intramuscular de qualquer vírus leva a uma mortalidade massiva pelo fato de atravessar as barreiras primárias de defesa do camarão, além de (SAULNIER et al., 2000). No caso da infecção por IMNV, um estudo anterior reportou a inexistência da resposta de camarões *L. vannamei* desafiados pelo método de imersão com inóculo viral (SILVA et al., 2015). A via de ingestão de tecido com WSSV foi descartada pelo fato de ser utilizada para o IMNV, uma vez que haveria incerteza acerca do consumo de ambos os materiais por parte dos camarões, o que comprometeria a infecção. Desta forma, adotamos a imersão do inóculo viral como via de desafio para o vírus da Síndrome da mancha branca.

Existe ainda a possibilidade de uma interferência de um vírus com relação à infecção do outro, em caso de co-infecção. Isto foi comprovado por Bonnichon et al. (2006), quando camarões *L. vannamei* foram desafiados com o vírus da Necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (*Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* – IHNV) e WSSV e foi observado um aumento no tempo para a morte pela infecção com mancha branca. Mais ainda, pela PCR em tempo real foi

[R1] Comentário: Explicar a via natural de infecção e quais defesas do animal são desprezadas na via intramuscular

verificada uma redução na carga de IHNV nos animais desafiados com WSSV, sugerindo um tipo de competição entre os dois vírus.

Feijó et al. (2013) confirmaram que *L. vannamei* pode desenvolver a co-infecção por IMNV mais WSSV em cativeiro. Na ocasião, 66% das amostras de *L. vannamei* foram positivas por PCR em tempo real, apresentando também lesões microscópicas – indicativo de que o curso da infecção ocorreu, tais como infiltração muscular hemocítica, necrose muscular coagulativa, fibrose muscular, presença de esferoides (IMNV) e presença de corpúsculos de inclusão e Cowdry tipo A (WSSV). Neste trabalho, nenhum destes sinais microscópicos foi encontrado na análise histopatológica em nenhuma amostra, confirmando que não houve desenvolvimento da doença.

A inibição de um vírus em relação ao outro pode ser explicada pelo fato de haver a produção de moléculas antivirais associada com a resposta inespecífica do sistema imune inato do camarão, além de haver redução da produção de receptores celulares (YAN et al., 2016). Já foi comprovado, por exemplo, que a correlação entre IHNV e WSSV provocou um retardo na mortalidade pela Mancha branca em *L. vannamei* (BONNICHON et al., 2006) ou uma resistência ao WSSV em *L. stylirostris* (TANG et al., 2003), sugerindo que houve um acréscimo dessas moléculas em proporção à carga de IHNV.

Os resultados da PCR para WSSV não revelaram amostras positivas, tanto para camarões testados na pré-infecção (triagem) quanto para os indivíduos desafiados. Para IMNV houve positividade em 23,8% das amostras do Controle e 8,7% das amostras do grupo W (tabela 3), tratamentos que não foram desafiados com IMNV. O fato de haver positividade nestes tratamentos sugere que os animais já estivessem infectados pelo IMNV previamente aos desafios. Para os tratamentos I e IW não houve nenhuma amostra positiva, o que pode sugerir que o biofloco sirva como uma barreira contra a infecção.

Tabela 3. Análise de associação dos resultados obtidos na PCR.

Tratamento	N	PCR	Valor P
		Positivas (IMNV)	
Controle	21	5 (23,8%)	0,038*
I	17	0 (0,0%)	
W	23	2 (8,7%)	
IW	14	0 (0,0%)	

N – Total de amostras testadas; * Associação estatística significativa ($p < 0,05$) no teste de χ^2 .

Em termos de resposta imunológica, os efeitos positivos do BFT são conhecidos, devido à ativação do sistema imunológico decorrente do reconhecimento de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e β -1,3-glicanos encontrados na superfície das bactérias presentes no sistema que, quando ingeridas, atuam como uma espécie de imunostimulante (CRAB et al., 2012; WANG et al., 2008; ITAMI et al., 1994; SONG et al., 1997; CHANG et al., 1999).

O BFT também pode causar o aumento nos níveis de profenoloxidase (PPO), principal enzima da imunidade inata do camarão. Ekasari et al. (2014) obtiveram resultados com maior atividade de PPO em camarões cultivados em BFT, quando comparados com os animais criados em água clara.

Outro aspecto dos bioflocos é a sua capacidade de acumular o complexo de armazenamento bacteriano poli- β -hidroxibutirato (PHB), que tem se mostrado como protetor a infecções bacterianas em diversos animais aquáticos (DE SCHRYVER et al., 2010; DEFOIRDT et al., 2007; DINH et al., 2010). O biofoco possui níveis de PHB suficientes para proteger os animais cultivados contra infecção por bactérias patogênicas (HALET et al., 2007).

Em nosso experimento nenhuma amostra desafiada com WSSV foi positiva para este vírus, comprovando a eficácia da proteção dos bioflocos em algum ponto da infecção para o camarão. Este trabalho também indica que na presença de estresse químico e biológico (alta amônia, alta densidade e sólidos em suspensão) o BFT constitui um tipo de barreira contra a infecção em juvenis de *L. vannamei*.

Além de ser uma alternativa que permite o cultivo de camarões em alta densidade e sem renovação de água ao longo de todo ciclo de produção, tem sido cada vez mais comprovado que esta tecnologia possibilita uma maior biossegurança ao cultivo, devido ao fato de ser um sistema fechado, reduzindo a introdução de novos agentes etiológicos. Com este trabalho espera-se reforçar o potencial da segurança contra patógenos e de ganhos de produtividade que tem este sistema de produção.

Referências Bibliográficas

ARTS, J.A.J.; TAVERNE-THIELE, A.J.; SAVELKOUL, H.F.J.; ROMBOUT, J.H.W.M. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.164-170, 2007.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc technology**: a practical guide book. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2009. 182p.

AVNIMELECH, Y., KOCHBA, M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by *tilapia* in bio floc tanks, using ¹⁵N tracing. **Aquaculture**, v.287 (1-2), p.163-168, 2009.

AVNIMELECH, Y. Tilapia production using biofloc technology, saving water, waste recycling improves economics. **Global aquaculture Advocate**, p. 66–68, 2011.

AZIM, M.E.; LITTLE, D.C. The biofloc technology (BFT) in indoors tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.283, p.29-35, 2008.

BAKHSH, H.K.; CHOPIN, T. Water quality and nutrient aspects in recirculating aquaponic production of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and the Lettuce, *Lactuca sativa*. **International Journal of Recirculating Aquaculture**, v.12, p.13-34, 2011.

BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1988.

BONNICHON, V.; LIGHTNER, D.V.; BONAMI, J.R. Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.72, p.179-184, 2006.

BURFORD, M.A., THOMPSON, P.J., MCINTOSH, R.P., BAUMAN, R.H., PEARSON, D.C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**, v.219 (1-4), pp.393-411, 2003.

CANNON, R. M., ROE, R. T. **Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians**. Australian Bureau of Animal Health. Canberra, p. 14-17. 1982.

CHANG, C.F.; SU, M.S.; CHEN, H.Y.; LO, C.F.; KOU, G.H.; LIAO, I.C. Effect of dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v.36, p.163–168, 1999.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VESTRAETE, W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v.356-357, p.351-356, 2012.

CRAB, R., LAMBERT, A., DEFOIRDT, T., BOSSIER, P., VERSTRAETE, W. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*, v.109 (5), pp.1643-1649, 2010.

CUÉLLAR-ANJEL, J., WHITE-NOBLE, B., SCHOFIELD, P., CHAMORRO, R., LIGHTNER, D.V. 2012. Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. **Aquaculture**, v.368-369, p.36-39, 2012.

CUÉLLAR-ANJEL, J. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL (Ed.). **Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos: programa CYTED Red II-D Vannamei**. Panamá: New Concept Publications, 2008. p.15-54.

DE SCHRYVER, P.; SINHA, A.K.; BARUAH, K.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; DE BOECK, G.; BOSSIER, P. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1535–1541, 2010.

DEFOIRDT, T.; HALET, D.; VERVAEREN, H.; BOON, N.; VAN DE WIELE, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. **Environmental Microbiology**, v.9, p.445–452, 2007.

DINH, T.N.; WILLE, M.; DE SCHRYVER, P.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; SORGELOOS, P. The effect of poly- β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Aquaculture**, v.302, p.76–81, 2010.

DURAND, S.V.; LIGHTNER, D.V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.381-389, 2002.

EKASARI, J.; HANIF AZHAN, M.; SURAWIDJAJA, E.H.; NURYATI, S.; DE SCHRYVER, P.; BOSSIER, P. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish Shellfish Immunology**, v.41(2), p.332-339, 2014.

EMERENCIANO, M., BALLESTER, E.L.C., CAVALLI, R.O., WASIELESKY, W. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition and salinity stress tolerance. **Aquaculture International**, v.19, p.891-901, 2011.

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; PAREDES, A.; GAXIOLA, G. Biofloc technology applied to intensive broodstock farming of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Part I): grow-out, water quality, microorganisms profile and proximate analysis of biofloc. **Aquaculture Research**, 2012.

ESCOBEDO-BONILLA C.M.; ALDAY-SANZA V.; VILLE M.; SORGELOOS P.; PENSAERT M.B.; NAUWYNCK H.J. A review on the morphology, molecular characterization, mophogenesis and pathogenesis of White spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.31, p.1–18, 2008.

FAO. **Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service**, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_8056030480788557303.xml&outtype=html> . Acesso em 23/04/2017.

FEIJÓ, R.G., KAMIMURA, M.T., OLIVEIRA-NETO, J.M., VILA-NOVA, C.M.V.M., GOMES, A.C.S., COELHO, M.G.L., VASCONCELOS, R.F., GESTEIRA, T.C.V., MARINS, L.F., MAGGIONI, R. Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome

virus co-infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v.380-383, p.1-5, 2013.

FURTADO, P.S., POERCH, L.H., WASIELESKY JR, W. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. **Aquaculture**, v.321 (1-2), p.130-135, 2011.

GROSS, A.; ABUTBUL, S.; ZILBERG, D. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in-low salinity brackish water. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.35, p.315-321, 2004.

HALET, D., DEFOIRDT, T., VAN DAMME, P., VERVAEREN, H., FORREZ, I., VAN DEWIELE, T., BOON, N., SORGELOOS, P., BOSSIER, P., VERSTRAETE, W., 2007. Poly- β -hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.60, p.363–369, 2007.

HAMEED, A.S.S.; BALASUBRAMANIAN, G.; MUSTHAQ, S.S.; YOGANANDHAN, K. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.57, p.157-161, 2003.

HARGREAVES, J. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v.34, p.344-363, 2006.

ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; TSUCHIHARA, E.; IGUSA, H.; KONDO, M. Enhancement of disease resistance of Kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of B 1-3 glucan (Schizophyllan) In: CHOU, L.M.; MUNRO, A.D.; LAM, T.T.; CHEN, T.W.; LEONG, L.K.K.; DING, J.K.; HOOI, K.K.; KHOO, H.W.; PHANG, V.P.E.; SHIM, K.F.; C.H.TAN (eds) The Third Asian Fisheries Forum, Asian Fish.Soc. Manila, 1994. p.375-378.

JORY, D. **Status, issues and perspectives of the global shrimp farming industry: opportunities for U.S. shrimp producers.** Indiana indoor shrimp production

brainstorming session. Comercial Aquaculture. Disponível em: <<http://indianasoybean.com/shrimp2014/Status,%20Issues%20&%20Perspectives%20of%20the%20global%20Shrimp%20Farming%20Industry%20-%20Darryl%20Joy.pdf>>. Acesso em 21 de julho de 2015.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos Editora, 1983.

KIM, S.K., PANG, Z., SEO, H.C., CHO, Y.R., SAMOCHA, T., JANG, I.K.. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Research*, v. 45 (2), p.362-371, 2014.

KRUMMENAUER, D., PEIXOTO, S., CAVALLI, R.O., POERSCH, L.U., WASIELESKY JR, W. Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.42 (5), pp.726-733, 2011.

LIGHTNER, D.V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1996. 304 p.

LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M., PANTOJA, C.R., TANG, K.F.J., NOBLE, B.L., SCHOFIELD, P., MOHNEY, L.L., NUNAN, L.M., NAVARRO, S.A.. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.110, p.174-183, 2012

LO, C.F., LEU, J.H., HO, C.H., CHEN, C.H., PENG, S.E., CHEN, Y.T., CHOU, C.H., YEH, P.Y., HUANG, C.J., CHOU, H.Y., WANG, C.H., KOU, G.H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.25, p.133-141, 1996.

OIE. **White Spot Disease**. Aquatic Animal Health Code, chapter 9.7, 2010. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/2010/en_chapitre_wsd.html> Acesso em 21 de julho de 2016.

PÉREZ, F., VOLCKAERT, F.A.M., CALDERÓN, J. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v.250 (3-4), p.586-591, 2005. [raja](#)

PINHEIRO, A.C.A.S., LIMA, A.P.S., SOUZA, M.E., NETO, E.C.L., ADRIÃO, M., GONÇALVES, V.S.P., COIMBRA, M.R.M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v.262 (1), p.17-22, 2007.

PONCE-PALAFIX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C.A.; ROSS, L.G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v.157, p.107-115, 1997.

PRESTON, N.P.; JACKSON, C.J.; THOMPSON, P.J.; AUSTIN, M.; BURFORD, M.A. Prawn Farm Effluent: Origin, Composition and Treatment. Final Report, **Fishing Industry Research and Development Corporation**, Canberra, Australia, 2000, 71p.

[ROCHA, I.P. Cultivo do Camarão Marinho: Atividade Socialmente Justa, Ambientalmente Responsável e, Economicamente Importante, de Forma Especial para o Meio Rural da Região Nordeste. **Carcinicultura Marinha Brasileira – Artigo Executivo**. Postado em 21/05/2015 por ABCCAM. Disponível em: <<http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2015/05/Carcinicultura-Marinha-Brasileira-Artigo-Executivo.pdf>>. Acesso em: 21/02/2016.](#)

Formatado: Não ajustar espaço entre o texto latino e asiático, Não ajustar espaço entre o texto asiático e números

Formatado: Português (Brasil)

RODRIGUES, J., BORBA, M. Carcinicultura brasileira: estatísticas e revelações. **ABCC News. Feed & Food**, 2013.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**. V. 2. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SAMOCHA, T.M., PATNAIK, S., SPEED, M., ALI, A., BURGER, J.M., ALMEIDA, R.V., AYUB, Z., HARISANTO, M., HOROWITZ, A., BROCK, D.L. Use of molasses

as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquacultural Engineering**, v.36, p. 184-191, 2007.

[SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v.19, p.133-144, 2000.](#)

SCHRYVER, P.D.; CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. The basics of bioflocos technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**, v.277, p.125-137, 2008.

SILVA, S.M.B.C. Análise quantitativa da carga viral do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) em diferentes tecidos do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* naturalmente infectado. 2010. 81p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, S.M.B.C.; LAVANDER, H.D.; SANTANA, M.M.L.; SILVA, A.O.M.E.; GÁLVEZ, A.O.; COIMBRA, M.R.M. *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology** v.126 p.1–5, 2015.

SILVA, K.R., WASIELESKY JR, W., ABREU, P.C. Nitrogen and Phosphorus Dynamics in the Biofloc Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.44 (1), p.30-41, 2013.

SONG, Y.L.; LIU, J.J.; CHAN, L.C.; SUNG, H.H. Glucan induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Developments in Biological Standardization**, v.90, p.413–421, 1997.

SUPAMATTAYA, K.; HOFFMAN, R.W.; BOONYARATPALIN, S.; KANCHANAPHUM, P. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.32, p.79-85, 1998.

TAW, N. Biofloc technology expanding at white shrimp farms. **Global Advocate**, 2010, p.24-26.

VAN WYK, P., SCARPA, J. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, P.128-138, 1999.

WANG, J.-C.; CHANG, P.-S.; CHEN, H.-Y. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1,3-glucan. **Fish & Shellfish Immunology**, v.24, p.113–121, 2008.

WYBAN, J.; WALSH, W.A.; GODIN, D.M. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.138, p.267-279, 1995.

YAN, D.C.; HUANG, J.; YANG, B.; SUN, H.S.; WANG, Y.Y.; LIU, X. Competition of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) with white spot syndrome virus (WSSV) for binding to shrimp cellular membrane. **Journal of Fish Diseases**, v.39 (10), p.1225-1229, 2016.