

CAROLINA NOTARO DE BARROS

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DO INTESTINO DO
BEIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766).**

RECIFE

2012



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

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DO INTESTINO DO
BEIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766).**

Carolina Notaro de Barros

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.

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Orientadora

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes
Co-orientador

Prof. Dr. Rodrigo Otávio de Almeida Ozório
Co-orientador

Recife
Fevereiro/2012

FICHA CATALOGRÁFICA

B277 b Barros, Carolina Notaro de
 Bactérias com potencial probiótico isoladas do
 intestino do beijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus,
 1766). / Carolina Notaro de Barros. -- Recife, 2012.
 58 f.: il.

 Orientadora: Emiko Shinozaki Mendes.
 Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
 Aquicultura). – Departamento de Pesca e Aquicultura,
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
 Inclui referências e anexo.

 1. Peixe marinho 2. Bactéria Probiótica 3. Bacteriose
 4. Antagonismo I. Mendes, Emiko Shinozaki, Orientadora
 II. Título

CDD 639.3

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

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DO INTESTINO DO
BEIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766).**

Carolina Notaro de Barros

Dissertação julgada adequada para obtenção do
título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
07/02/2012 pela seguinte Banca Examinadora.

Profa. Dra. EMIKO SHINOZAKI MENDES
(Orientadora)

Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. PAULO DE PAULA MENDES
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. RONALDO OLIVERA CAVALLI
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. FERNANDA SILVA DE MEIRELLES
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Campus Vitória de Santo Antão

DEDICATÓRIA

Às duas mulheres responsáveis pela construção do meu caráter, dignas do meu eterno respeito e admiração: minha mãe, Vera Lúcia e a minha Tia Josélia (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento do projeto de pesquisa.

À minha orientadora Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes, pelo exemplo de profissional, pela oportunidade oferecida e confiança em mim depositada.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes, pelo auxílio no delineamento experimental e análise estatística e Prof. Dr. Rodrigo Otávio de Almeida Ozório que ao participar da elaboração e envio do projeto ao Edital Ciências do Mar/Capes, possibilitou o seu financiamento.

Ao professor Dr. Ronaldo Olivera Cavalli e sua equipe, pela parceria e concessão dos animais requeridos para realização desta pesquisa.

A todos os professores da Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura que passaram seus conhecimentos e contribuíram para minha formação.

A toda equipe que constitui o Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) e Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) da UFRPE, pessoas que ajudaram direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa.

A equipe de embarque responsável por coletar os animais nas gaiolas em alto mar, Alexandre Duarte, João Menezes, Ana Theodora e Valéria Rosa.

A Fernanda Meirelles e Renata Valença, por sempre me inspirarem disciplina, dedicação e companheirismo no ambiente de trabalho.

A Wandemberg Rocha por todo incentivo, ajuda, paciência e companheirismo.

A família e amigos principalmente pelo suporte emocional durante os dois anos, em especial para minha mãe, Vera Lúcia, meu irmão, Lucas Notaro, avó Josilda Notaro, Sarah Galvão, Rejane Luna, Fabíola Carneiro, Juliana Carvalho, Héliida Mélo, Amância Patriota, Juliana Moraes, Virgínia Pedrosa, Andrea Barretto, Talita Camila, Eduardo Melo, Juliana Aguiar e Rodrigo Zeymer.

À banca examinadora pelas sugestões formuladas para melhoria do trabalho ora apresentado.

RESUMO

O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas na aquicultura pode contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos, o que torna esses micro-organismos mais difíceis de serem controlados e eliminados. Probióticos podem representar uma alternativa profilática no controle de doenças, em substituição ao uso de antibióticos. Neste contexto, o estudo foi realizado com o objetivo de isolar, testar e identificar bactérias com potencial probiótico do beijupirá, *Rachycentron canadum*, potencial candidato para a piscicultura marinha. Foram coletados 40 animais, 10 na fase de berçário e 30 na fase de engorda em sistema *offshore* (PE, Brasil), no período de novembro de 2010 a julho de 2011. Os peixes coletados do berçário apresentaram peso de $139,30 \pm 31,52$ g e comprimento de $27,13 \pm 1,46$ cm, enquanto os animais provenientes do sistema *offshore* apresentaram peso de $456,77 \pm 264,46$ g e comprimento de $37,29 \pm 6,05$ cm. Foram obtidos 45 isolados bacterianos testados *in vitro* frente a cinco espécies patogênicas conhecidas, *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442); *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813); *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Quinze isolados (33,33%) apresentaram atividade antibacteriana a pelo menos um patógeno e oito (17,77%) inibiram todos os patógenos testados. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na proporção de isolados potenciais probióticos obtidos nas distintas épocas do ano, chuvosa e seca. Os isolados que apresentaram os melhores resultados no teste de antagonismo *in vitro* foram identificados como *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans*, *Klebsiella* spp., *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Bacillus firmus*. O maior halo de inibição observado no teste de antagonismo foi produzido por *B. circulans* frente ao *V. vulnificus*. Algumas espécies potenciais probióticas identificadas já foram caracterizadas por outros autores, porém isoladas de intestino de outras espécies de peixes. Sugere-se a realização de testes de antagonismo *in vivo* para que seja comprovada a efetividade das bactérias como probióticas para o beijupirá.

Palavras-chave: Peixe marinho, bactéria probiótica, bacteriose, antagonismo.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobial drugs in aquaculture may cause development of drug-resistant bacteria, which become more difficult to be controlled and eliminated. Probiotics may represent an alternative prophylactic disease control, replacing the use of antibiotics. In this respect, this study isolated, tested and identified potential probiotic bacteria from the gut of cobia, *Rachycentron canadum*, a potential candidate for marine aquaculture. 40 animals were captured, 10 from a private hatchery and 30 from an offshore culture system (PE, Brazil) between November 2010 and July 2011. Fishes from the hatchery had weight of 139.30 ± 31.52 g and length of 27.13 ± 1.46 cm, while those from offshore culture system weighed 456.77 ± 264.46 g and had length of 37.29 ± 6.05 cm. 45 bacterial were isolated and tested *in vitro* against five known pathogenic species, *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) and *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Fifteen strains (33.33%) had antibacterial activity to at least one pathogen, while eight (17.77%) were inhibited all pathogens tested. There was significant difference ($P < 0.05$) between percentage of potential probiotic obtained from different seasons, rainy and dry. Strains that presented the best results antagonism test *in vitro* were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans*, *Klebsiella* spp., *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Bacillus firmus*. The largest inhibition zone observed in the antagonism test was produced by *B. circulans* against *V. vulnificus*. Some potential probiotic species identified were characterized by others authors, but isolated from the intestine of other fish species. It is suggested *in vivo* antagonism tests are performed to prove the effectiveness of these bacteria as probiotic to cobia.

Keywords: marine fish, probiotic bacteria, bacterial disease, antagonism.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Exemplos do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , provenientes de berçário (Ipojuca, PE, Brasil).....	21

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Pesos e comprimentos médios de beijupirás provenientes de tanque berçário e sistema <i>offshore</i> coletados no período de novembro de 2010 a julho de 2011 (Recife, Brasil).....	48
Tabela 2. Diâmetros médios ($\pm$ DP) dos halos de inibição produzidos por isolados bacterianos do intestino de <i>Rachycentron canadum</i> no teste de antagonismo <i>in vitro</i> frente a cinco patógenos.....	49

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Doenças bacterianas de peixe marinho cultivado	13
2.2. Probiótico na aquicultura	17
2.3. Beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i>	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
4. ARTIGO CIENTÍFICO: Atividade antagônica <i>in vitro</i> de bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá	31
5. ANEXO (Normas para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)	50

1. INTRODUÇÃO

As doenças que acometem os organismos aquáticos representam uma das maiores restrições para a aquicultura. Imprevisíveis surtos de mortalidade ainda ocorrem em diferentes fases de vida dos animais, devido à ação de micro-organismos patogênicos nos animais em cultivo.

Na piscicultura, as infecções bacterianas são consideradas uma das principais causas de mortes e o controle dos patógenos é normalmente realizado através da administração de antibióticos. No entanto, o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas na aquicultura pode contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos, o que torna esses micro-organismos mais difíceis de serem controlados e eliminados (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Adicionado a isso, há uma preocupação acerca da saúde pública, já que o antibiótico residual pode persistir no produto final.

Neste contexto, a indústria da aquicultura tem o interesse de substituir as drogas antimicrobianas por profiláticos alternativos e a utilização de compostos à base de micro-organismos vivos tem sido adotada como prática sustentável, minimizando a utilização de produtos químicos e promovendo a sanidade dos animais cultivados.

Em aquicultura, o termo probiótico é definido como “um suplemento microbiano, formado por um cultivo de micro-organismos vivos selecionados, o qual é adicionado à dieta e/ou a água do cultivo com o propósito de melhorar o equilíbrio microbiano do trato gastrointestinal” (VERSCHUERE et al., 2000). De acordo com Balcázar et al. (2006), as bactérias probióticas podem reduzir ou eliminar a incidência de micro-organismos patogênicos no intestino, o que é extremamente importante para o sistema imunológico do animal, para o aumento da absorção dos nutrientes, e desta forma, para melhoria do seu desempenho.

O *Rachycentron canadum*, importante peixe marinho, conhecido popularmente como beijupirá, cação de escamas ou internacionalmente como cobia, é considerado um candidato em potencial para a aquicultura. Sua tecnologia de cultivo tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos, principalmente devido a sua rápida taxa de crescimento e seu alto valor de mercado (LIAO et al., 2004).

O cultivo de beijupirá apesar de representar uma indústria promissora no futuro próximo, por se tratar de um candidato recente, ainda possui significativas limitações na produção, como por exemplo, as doenças causadas por bactérias que são os principais patógenos que acometem o animal (LIN et al., 2006).

Pesquisas a respeito da sanidade, bactérias com potencial probiótico, e o seu uso no cultivo do beijupirá, ainda estão em fase inicial. Doenças mais comuns de peixes cultivados de águas tropicais já acometem o animal, e esse fato é restritivo à expansão do cultivo intensivo em gaiolas (MCLEAN et al., 2008).

É necessário que mais estudos sejam desenvolvidos no que diz respeito ao uso de alternativas profiláticas e terapêuticas no controle de doenças do peixe marinho. A utilização do probiótico, apesar de ser considerado um tema recente, é alvo de um considerável aumento de pesquisas, e pode representar uma escolha bem-sucedida e sustentável para indústria da aquicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doenças bacterianas de peixe marinho cultivado

O aparecimento e desenvolvimento da doença em um peixe é o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e meio ambiente. Como os peixes vivem em ambiente aquoso, suas superfícies externas estão regularmente expostas a agentes patogênicos. A pele, a linha

lateral, guelras, o trato gastrointestinal (TGI) ou uma combinação destes órgãos são sugeridos como vias de infecção (BIRKBECK e RINGØ, 2005; RINGØ et al., 2006).

A água que é levada ao TGI do peixe durante a alimentação pode carrear patógenos até as superfícies da mucosa do trato. Sendo o TGI uma via de absorção de nutrientes, qualquer perturbação por ação microbiana pode ser prejudicial. Uma série de bactérias podem causar danos ao intestino de peixes e isso pode ser uma via de infecção sistêmica em muitos casos (AUSTIN, 2006).

Após se aderirem ou colonizarem o hospedeiro, os patógenos podem causar alteração da coloração corporal normal do peixe, lesões e necroses cutâneas, exoftalmia ou endoftalmia, perda de escamas, ascite, dificuldade respiratória, letargia, natação irregular ou espiralada, dentre outras alterações comportamentais, além de reduzir a ingestão de alimentos, o que dificulta o tratamento da doença com o uso de antibióticos ou probióticos adicionados na ração (MUROGA, 2001; McLEAN et al., 2008).

Segundo Toranzo et al. (2005), sinais clínicos causados por cada patógeno dependem da espécie do hospedeiro, idade dos peixes e estágio da doença, não havendo, em alguns casos, relação entre as alterações externas e internas. Doenças sistêmicas têm altas taxas de mortalidade, as lesões são internas e normalmente, nesses casos, o peixe apresenta aparência externa saudável. Outros patógenos que causam doenças com taxas de mortalidade relativamente baixas ocasionam importantes lesões externas, o que torna os peixes não comercializáveis.

Entre as doenças bacterianas que mais ameaçam os peixes cultivados em águas marinhas estão as vibrioses (THOMPSON et al., 2004; OLIVER, 2005; AUSTIN, 2010) photobacterioses ou pasteureloses (MAGARIÑOS et al., 1996; ROMALDE, 2002; RAJAN et al., 2003), micobacterioses (RHODES et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2002), pseudomonoses (BERTHE et al., 1995; TORANZO et al., 2005), furunculoses (HINEY et

al.,1994; AUSTIN, 2006), edwardsieloses (YOSHIKOSHI et al., 1998; MUROGA, 2001) e estreptococoses (ROMALDE e TORANZO, 1999, 2002; TORANZO et al., 2005).

Mesmo as doenças classicamente consideradas como típicas de aquicultura de água doce, como furunculose, edwardsieloses e alguns tipos de estreptococoses, representam hoje problemas importantes também para maricultura (TORANZO et al., 2005).

Vibriose é uma das doenças infecciosas mais graves que afetam peixes marinhos em zonas tropicais e subtropicais. As espécies que causam septicemia, em geral provocam hemorragia na pele, cauda e barbatanas, ulceração da pele, hemorragia nos músculos e superfícies serosas. Encontrados em ambientes costeiros e estuarinos, espécies de víbrios, como *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* (= *V. carchariae*) e *V. vulnificus*, são as principais espécies isoladas de peixes doentes e muitas delas também podem acometer os humanos (THOMPSON et al., 2004; OLIVER, 2005; AUSTIN, 2010).

Photobacterium damsela ssp. *piscicida*, anteriormente conhecido como *Pasteurella piscicida*, é o agente causador da photobacteriose ou pasteurelose em peixe. Mortalidades elevadas foram observadas em infecção causada por esse patógeno, com grandes perdas para a indústria piscícola, principalmente no Japão, em países mediterrâneos da Europa e EUA. Há registros de isolamento do patógeno em espécies como *Morone americanus*, *M. saxatilis*, *M. chrysops*, *Solea solea*, *S. senegalensis*, *Rachycentron canadum*, *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* (MAGARIÑOS et al., 1996; MUROGA, 2001; ROMALDE, 2002; RAJAN et al., 2003).

Micobacteriose em peixes (ou pseudotuberculose) é uma doença causada principalmente pelo agente *Mycobacterium marinum*. Numerosos granulomas de dimensão variável são frequentemente observados em diversos órgãos do animal. Outras espécies como *M. fortuitum* e *M. chelonae* também podem estar associadas à doença, que já acometeu

espécies como *Scophthalmus maximus*, *Morone saxatilis* e *Rachycentron canadum* (RHODES et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2002; TORANZO et al., 2005).

Entre as espécies de pseudomonas recuperadas de peixes cultivados doentes, a *Pseudomonas anguilliseptica* é considerada o maior patógeno. Em 1995 foi considerado o agente responsável pela doença conhecida como “síndrome de inverno” em *Sparus aurata*, espécie cultivada na região do Mediterrâneo. Essa pseudomonas também pode causar septicemia em enguias japonesas, resultando em hemorragia em barbatanas, cauda e ulceração da pele (BERTHE et al., 1995; TORANZO et al., 2005).

A *Aeromonas salmonicida* é o agente etiológico da furunculose, infecção relevante em salmonídeos dulcícolas e marinhos. Hiney et al. (1994) isolaram *A. salmonicida* do trato gastrointestinal de salmão do atlântico que apresentavam furunculose assintomática e sugeriram ser o intestino, o órgão alvo para isolamento deste micro-organismo. A *Aeromonas hydrophila* também pode causar infecções em peixes e é geralmente associada com lesões superficiais de pequeno porte, hemorragias locais e septicemia. Esta doença é comum em todo o mundo e já produziu consideráveis perdas econômicas na aquicultura intensiva de trutas e salmões (AUSTIN, 2006).

Edwardsiellase, assim como a furunculose, é uma doença que pode acometer animais cultivados em água doce e marinha. Possui numerosos sorotipos, mas apenas um é descrito em peixes, a *Edwardsiella tarda*. Animais comprometidos podem apresentar lesões hemorrágicas externas, internas e lesões necróticas externas. As espécies marinhas mais acometidas são *Paralichthys olivaceus*, *Pagrus major* e *Evynnis japonica* (YOSHIKOSHI et al., 1998; MUROGA, 2001).

Estreptococoses em peixes devem ser consideradas como um complexo de doenças semelhantes, causadas por diferentes gêneros e espécies, capazes de induzir dano nervoso central, exoftalmia supurativa e meningoencefalite. Os agentes da doença são *Lactococcus*

garvieae, *Lactococcus piscium*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus parauberis* e *Vagococcus salmoninarum*. A espécie *S. iniae* é um problema principalmente em sistemas de cultivo fechado com recirculação, provavelmente associada com a qualidade da água e altas densidades (ROMALDE e TORANZO, 1999, 2002; TORANZO et al., 2005).

Os agentes patogênicos descritos nos animais cultivados estão normalmente presentes em populações de peixes selvagens. No entanto, em ambientes naturais, eles raramente causam morte devido à falta das condições estressantes que geralmente ocorrem nas instalações de cultivo (TORANZO et al., 2005).

Para aplicação de medidas alternativas adequadas para prevenir e controlar as principais doenças que limitam a produção de peixes marinhos são necessários estudos envolvendo as características dos micro-organismos patogênicos, a biologia dos hospedeiros e microbiota associada, bem como o entendimento dos fatores ambientais que afetam o cultivo (TORANZO et al., 2005).

2.2. Probiótico na aquicultura

A palavra probiótico é constituída de um termo latino “pro” (para) e de outro grego “bios” que significa vida. A primeira definição, geralmente aceita, foi proposta por Fuller (1989) que considerou probiótico como sendo: "... um suplemento à alimentação com microbiota viva a qual afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal".

O conceito de probiótico surgiu provavelmente a partir das observações do efeito da ingestão de micro-organismos benéficos no controle de micro-organismos patogênicos, sendo baseado no princípio de que a microbiota estável, que se desenvolve no intestino, ajuda o animal a resistir a infecções, especialmente as do trato gastrointestinal.

Em aquicultura, a definição de probiótico proposta por Fuller (1989) requer algumas considerações, já que nos animais aquáticos há uma constante interação entre microbiota intestinal e o ambiente aquático. As bactérias presentes no meio são continuamente ingeridas junto com a água e/ou alimento, o que demonstra tanto a influência do meio sobre o animal quanto do animal sobre o meio (GATESOUBE et al., 1999).

Portanto, a seguinte definição modificada por Verschuere et al. (2000) foi proposta e permite uma aplicação mais ampla do termo "probiótico" na aquicultura. O termo é definido como um complemento microbiano vivo que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, alterando a comunidade microbiana associada ao intestino do animal e ao seu ambiente, que garante uma melhor utilização do alimento e do seu valor nutricional, além de melhorar a resposta do hospedeiro a doenças e qualidade do ambiente em que ele vive.

Segundo Callaway et al. (2008), dentro do hospedeiro, a ação antagonista ou exclusão competitiva das bactérias probióticas frente aos patógenos pode ser: através da produção de compostos com atividade antimicrobiana; competição por nutrientes ou pelos mesmos sítios de adesão; através da alteração do metabolismo do patógeno, aumentando ou diminuindo a atividade enzimática; ou pelo estímulo da imunidade do hospedeiro, aumentando os seus níveis de anticorpos e atividade de macrófago.

Ao longo dos anos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram avaliadas como probióticas e conferiram proteção contra um importante número de patógenos. Os probióticos mais comuns utilizados na aquicultura são compostos de *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp., *Vibrio* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Saccharomyces* spp., os quais são administrados como alimentos vivos enriquecidos ou adicionados à dieta.

Silva et al. (2005) estudando a composição e atividade de componentes intestinais do peixe teleósteo, *Prochilodus argenteus* Agassiz, verificaram maior atividade antagonista das bactérias Gram-positivas frente as Gram-negativas e identificaram *Staphylococcus* spp.

(coagulase-negativa), *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* com amplas propriedades probióticas.

As bactérias formadoras de esporos, principalmente as do gênero *Bacillus*, constituem a maior parte dos produtos probióticos e tem recebido atenção de alguns pesquisadores (HONG et al., 2005). Wang (2007) observou o efeito de *Bacillus* spp. sobre o crescimento e a atividade de enzimas digestivas do camarão *Penaeus vannamei*, enquanto que Chu et al., (2010) isolaram *Bacillus* spp., do intestino do peixe *Carassius auratus gibelio*, com características de degradar moléculas produzidas por patógenos.

Através de trabalhos realizados com *Bacillus subtilis*, Mohamed e Refat (2011) observaram atividade antagonista produzida frente a *Flavobacterium columnare* em tilápia (*Oreochromis niloticus*), e Powedchagun et al., (2011) constatarem seu potencial probiótico para camarão, por aumentar a sobrevivência, crescimento e imunidade do *Penaeus monodon*, com a vantagem de ser inofensivo para animais e seres humanos.

Outro grupo de potenciais probióticos que tem sido bastante explorado é o das bactérias ácido lácticas. O efeito probiótico do *Lactococcus lactis* foi estudado, tanto como indutor da resposta humoral de peixe (BALCÁZAR et al., 2007), como inibidor de patógenos incluindo, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* (BALCÁZAR et al., 2008) e *Lactococcus garvieae* (SEQUEIROS et al., 2010).

Lactobacillus plantarum, outra bactéria ácido láctica com propriedades probióticas, mostrou ação antagonista contra *Aeromonas hydrophila* (BALCÁZAR et al., 2008; PARTHASARATHY e RAVI, 2011), *Aeromonas salmonicida* em peixes (BALCÁZAR et al., 2008) e *Vibrio harveyi* em camarão (VIEIRA et al., 2010).

Embora estudos relacionados ao gênero *Vibrio* spp. sejam, na maioria das vezes, associados as espécies responsáveis por enfermidades dos animais cultivados, Thompson et al., (2010) avaliaram a ação do *Vibrio gazogenes* sobre espécies patogênicas, observando seu

potencial probiótico no controle de infecções bacterianas em *Litopenaeus vannamei* e concluíram que o *V. gazogenes* pode melhorar a saúde e o bem-estar de camarões sob condições de cultivo.

Dentre outros potenciais probióticos isolados de peixe estão: *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens* (KIM e AUSTIN, 2008); *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* (BALCÁZAR et al., 2007) *Enterococcus faecium*, (WANG et al. 2008), *Lactobacillus fermentum* (BALCÁZAR et al., 2008), *Pseudomonas chlororaphis* (GOBELI et al., 2009), *Kocuria* SM1(SHARIFUZZAMAN e AUSTIN, 2010), *Enterobacter amnigenus* (BURBANK et al., 2011) e *Vagococcus fluvialis* (SORROZA et al., 2012).

Nos últimos anos, um número crescente de pesquisas a respeito de probióticos tem sido realizadas. O fato revela o interesse em compreender sua função, eficácia e os riscos do seu uso como alternativa profilática. Estudos são válidos para que o probiótico seja utilizado de forma adequada e segura na aquicultura.

2.3. Beijupirá, *Rachycentron canadum*

O *Rachycentron canadum*, mais conhecido no Brasil como bijupirá, na região nordeste como beijupirá ou cação de escamas e internacionalmente como cobia, é um peixe marinho, espécie pelágica, migratória e carnívora. Única espécie do gênero, pertencente à família Rachycentridae, ordem Perciformes, é comum em oceanos tropicais, subtropicais e sazonalmente em águas temperadas (SHAFFER e NAKAMURA, 1989).

Na maior parte do tempo são animais solitários, mas podem viver em pequenos grupos na época de desova ou associados a peixes maiores, raias, tubarões e tartarugas marinhas. Alimentam-se de invertebrados bentônicos, preferencialmente crustáceos, mas também de peixes ósseos menores. Pode ser encontrado tanto em alto mar, como em ambientes costeiros, junto a recifes de corais, estuários e baías (ARENDT et al., 2001; KAISER e HOLT, 2005).

Trata-se de uma espécie de corpo alongado, subcilíndrico, com escamas pequenas embutidas na pele grossa. Apresenta duas faixas prateadas ao longo do corpo, coloração marrom escuro na porção dorsal e marrom pálido ou amarelado no seu ventre (Figura 1). Possui cabeça larga e achatada, grande boca terminal com projeção maxilar inferior e olhos pequenos (HARDY, 1978 apud SHAFFER e NAKAMURA, 1989).



Figura 1. Exemplos de alevinos do beijupirá, *Rachycentron canadum*, provenientes de berçário (Ipojuca, PE, Brasil).

Na natureza, os adultos chegam a atingir até 2 m de comprimento e peso de 68 kg. As fêmeas costumam crescer mais que os machos, porém não é possível distingui-los visualmente, pois não possuem dimorfismo sexual externo. Vivem em média 12 anos, mas há registro de beijupirá com 15 anos de idade. São euritérmicos, toleram temperaturas entre 16-32 ° C, mas preferem águas acima de 20°C (KAISER e HOLT, 2005), e eurialinos com tolerância a salinidades de 22 a 44 (RESLEY et al., 2006).

A elevada taxa de crescimento do beijupirá o levou a ser considerado um candidato em potencial para a aquicultura, podendo alcançar de 4-8 kg no primeiro ano de cultivo. Além de apresentar, outras características desejáveis como, excelente qualidade da carne, alta fecundidade, facilidade de desova em cativeiro (FRANKS et al., 2001; ARNOLD et al., 2002) e adaptação ao confinamento em tanques e gaiolas (HOLT et al., 2007).

O beijupirá foi cultivado primeiramente em Taiwan em 1993, especialmente no sistema de gaiolas em alto mar (LIAO et al., 2004). A aquicultura fora das zonas costeiras terrestre, também conhecida como sistema *offshore* (mar aberto) é uma tendência mundial para o desenvolvimento da maricultura. A técnica utiliza tanques redes e jaulas destinadas a suportar condições adversas do mar para criação e manejo de algumas espécies.

Em 2009, 31.926 t de beijupirás foram recolhidos das principais fazendas aquícolas de criação do peixe. A China é o maior produtor de beijupirá, seguida de Taiwan e Vietnã (FAO, 2011). Nas águas costeiras do sul do Mar da China, o cultivo do beijupirá é de grande importância para a indústria da pesca e aquicultura.

Na Austrália e Ilhas Marshall o cultivo desse peixe já começou a ser desenvolvido e se expande pelas Américas e Caribe. Atualmente, há projetos comerciais nos Estados Unidos, Porto Rico, Bahamas, Belize, República Dominicana, México, Panamá e Brasil (HOLT et al., 2007; BENETTI et al., 2010).

No Brasil, o beijupirá está presente em todo o litoral e o país pode se beneficiar da tecnologia de cultivo utilizada no exterior. Há iniciativas por parte dos laboratórios de instituições públicas e adesão também de empresas privadas (SAMPAIO et al., 2010). Existem atualmente projetos nos estados de São Paulo, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro (CAVALLI e HAMILTON, 2009). No Nordeste, Pernambuco é pioneiro na criação do peixe em sistema *offshore* e há esforços para que essa tecnologia seja estabelecida, dada a necessidade de adequação as condições brasileiras.

O aumento da atividade aquícola do beijupirá tem sido acompanhado pela incidência de doenças emergentes, novas ou já existentes, as quais representam uma restrição à expansão do cultivo intensivo em gaiolas (McLEAN et al., 2008). Entretanto, pesquisas a respeito da sanidade, alternativas para controle de doenças, bem como o uso de probiótico no cultivo, ainda estão em fase inicial.

As principais doenças que afetam o beijupirá incluem as parasitárias (OGAWA et al., 2006; BUNKLEY-WILLIAMS e WILLIAMS, 2006; SANTOS, 2011), as virais (CHENG et al., 2009) e as bacterianas conhecidas como micobacteriose (*Mycobacterium marinum*), vibriose (*Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. Ordalii*), pasteurelose ou photobacterioses (*Pasteurella piscicida* e *Photobacterium damsela*), streptococcoses (*Streptococcus iniae*) e outras causadas por *Aeromonas hydrophila* e *Citrobacter* spp. (LIAO et al., 2004; LIU et al. a,b; 2004; LOWERY e SMITH, 2006; McLEAN et al., 2008; MACHEN, 2008).

As infecções bacterianas representam o maior problema encontrado em cultivo de beijupirá e novas estratégias para controlá-las e entender o funcionamento da resposta imunológica do animal foram estudadas por alguns autores (LIN et al., 2006; DEFOIRDT et al., 2007; SU et al., 2012).

Geng et al. (2011) realizaram estudo para analisar o efeito de vários níveis de *Bacillus subtilis* e quitosana na dieta de beijupirá, e concluíram que o probiótico e a quitosana podem ser administrados com êxito a longo prazo, melhorando o crescimento, imunidade inespecífica e proteção contra infecção por *Vibrio harveyi* no beijupirá.

Avanços com estudos de vacinas e dietas imunoestimulantes baseadas em probióticos, devem ser consideradas para o beijupirá. Tais ações devem levar em conta todas as fases do ciclo de produção, além da utilização de forma sustentável, das alternativas profiláticas e terapêuticas para aquicultura.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDT, M.D.; OLNEY, J.E.; LUCY, J.A. Stomach content analysis of cobia, *Rachycentron canadum*, from lower Chesapeake Bay. **Fishery Bulletin**, 99, 665-670, 2001.
- ARNOLD, C.R.; KAISER, J.B.; HOLT, G.J. Spawning of cobia *Rachycentron canadum* in captivity. **Journal of the World Aquaculture Society**, 33 (2), 205–208, 2002.
- AUSTIN, B. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. **The Scientific World Journal**, 6, 931–945, 2006.
- AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, 140, 310–317, 2010.
- BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, 14, 173–186, 2006.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A.C.; MÁRQUEZ, I.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). **British Journal of Nutrition**, 97, 522–527, 2007.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A.C.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, 278, 188–191, 2008.
- BENETTI, D.D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J.A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUN, M.R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**, 302, 195–201, 2010.
- BERTHE, F.C. J.; MICHEL, C.; BERNARDET, J.F. Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. **Diseases of Aquatic Organisms**, 21, 151-155, 1995.
- BIRKBECK, T.H.; RINGØ, E. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.), **Microbial Ecology in Growing Animals**. Elsevier, Edinburgh, 208–234, 2005.

BUNKLEY-WILLIAMS, L.; WILLIAMS, E.H. New records of parasites for culture Cobia, *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae) in Puerto Rico. **Revista de Biologia Tropical** (International Journal of Tropical Biology and Conservation), 54 (3), 1-7, 2006.

BURBANK, D.R.; SHAH, D.H.; LAPATRA, S.E.; FORNSHELL, G.; CAIN, K.D. Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 321, 185–190, 2011.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; HARVEY, R.B.; GENOVESE, K.J.; KENNEDY, C.N.; VENN, D.W.; NISBET, D.J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, 9(2), 217–225, 2008.

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 6, 64-69, 2009.

CHENG, T.C.; LAI, Y.S.; LIN, I.Y.; WU, C.P.; CHANG, S.L.; CHEN, T.I.; SU, M.S. Establishment, characterization, virus susceptibility and transfection of cell lines from cobia, *Rachycentron canadum* (L.), brain and fin. **Journal of Fish Diseases**, 33(2), 161-169, 2009.

CHU, W.; LU, F.; ZHU, W.; KANG, C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. **Journal of Applied Microbiology**, 110, 202–208, 2010.

DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. **Trends in Biotechnology**, 25 (10), 472-479, 2007.

DOS SANTOS, N.M.S.; DO VALE, A.; SOUSA, M.J.; SILVA, M.T. Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. **Disease of Aquatic Organisms**, 52, 87–91, 2002.

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit: **FishStat plus**: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3, Rome: FAO, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 2011.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 37, suplemento especial, 08-14, 2008.

FRANKS, J.S.; OGLE, J.T.; LOTZ, J.M.; NICHOLSON, L.C.; BARNES, D.N.; LARSEN, K.M. Spontaneous spawning of cobia, *Rachycentron canadum*, induced by human chorionic

gonadotropin (HCG), with comments on fertilization, hatching, and larval development. **Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 52, 598–609, 2001.

FULLER, R. Probiotics in man and animals, a review. **Journal of Applied Bacteriology**, 66, 365–378, 1989.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, 180, 147–165, 1999.

GENG, X.; DONG, X.H.; TAN, B.P.; YANG, Q.H.; CHI, S.Y.; LIU, H.Y.; LIU, X.Q. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish & Shellfish Immunology**, 31, 400–406, 2011.

GOBELI, S.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E.; FREY, J.; BURR, S.E. *Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*. **Journal of Fish Diseases**, 32, 597–602, 2009.

HINEY, M.P.; KILMARTIN, J. J.; SMITH, P.R. Detection of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon with asymptomatic furunculosis infections. **Disease of Aquatic Organisms**, 19, 161–167, 1994.

HOLT, G.J.; FAULK, C.K.; SCHWARZ, M.H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. **Aquaculture**, 268, 181–187, 2007.

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 813–835, 2005.

KAISER, J.B.; HOLT, G.J. Species Profile Cobia. Southern Regional. **Aquaculture Center Publication**, 7202. 6 p, 2005.

KIM, D.H.; AUSTIN, B. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. **Letters in Applied Microbiology**, 47, 141–147, 2008.

LIAO, I.C.; HUANG, T.S.; TSAI, W.S.; HSUEH, C.M.; CHANG, S.L.; LEAÑO, E.M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, 237, 155–165, 2004.

LIN, J.H.Y.; CHEN, T.Y.; CHEN, M.S.; CHEN, H.E.; CHOU, R.L.; CHEN, T.I.; SU, M.S.; YANG, H.L. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. **Aquaculture**, 255, 125–132, 2006.

LIU, P.C.; LIN, J.Y.; HSIAO, P.T.; LEE, K.K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. **Journal of Basic Microbiology**, 44 (1), 23-28, 2004a. (abstract)

LIU, P.C.; LIN, J.Y.; CHUANG, W.H.; LEE, K.K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 20 (5), 495–499, 2004b.

LOWRY, T.; SMITH, S.A. *Mycobacterium* sp. Infection in Cultured Cobia (*Rachycentron canadum*). **Bulletin European Association of Fish Pathology**. 26, 87-92, 2006.

MACHEN, J.W. *Vibrio* spp. disinfection and immunization of cobia (*Rachycentron canadum*) for the prevention of disease in aquaculture facilities. 2008. 98p. **Thesis** (Master) - faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, United States.

MAGARIÑOS, B.; TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.L. Phenotypic and Pathobiological Characteristics of *Pasteurella Piscicida*. **Annual Review of Fish Diseases**, 6, 41-64, 1996.

MCLEAN, E.; SALZE, G.; CRAIG, S.R. Parasites, diseases and deformities of cobia. Ribarstvo: **Croatian Journal of Fisheries**, 66 (1), 1-16, 2008.

MOHAMED, M.H.; REFAT, N. A.G. A. Pathological Evaluation of Probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in Tilapia Nilotica (*Oreochromis Niloticus*) Fish in Sharkia Governorate, Egypt. **Journal of American Science**, 7(2), 2011.

MUROGA, K. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. **Aquaculture**. 202, 23–44, 2001.

OGAWA, K.; MIYAMOTO, J.; WANG, H.C.; LO, C.F.; KOU, G.H. *Neobenedenia girellae* (Monogenea) Infection of Cultured Cobia *Rachycentron canadum* in Taiwan. **Fish Pathology**, 41 (2), 51–56, 2006.

OLIVER, J.D. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. **Epidemiology and Infection**, 133, 383–391, 2005.

PARTHASARATHY, R.; RAVI, D. Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Indian Journal of Fishery**, 58(3), 87-93, 2011.

POWEDCHAGUN P.; SUZUKI H.; RENGPIPAT S. Characterization of a probiotic *Bacillus* S11 bacterium of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Songklanakarin Journal Science Technology**. 33 (1), 1-8, 2011.

RAJAN, P.R.; LIN, J.H.-Y.; HO, M.-S.; YANG, H.-L. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. **Journal of Applied Microbiology**. 95, 1375–1380, 2003.

RESLEY, M.J.; WEBB JR., K.A.; HOLT, G.J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, 253, 398–407, 2006.

RHODES, M.W.; KATOR, H. KOTOB, S.; VAN BERKUM, P.; KAATTARI, I.; VOGELBEIN, W.; LOYD, M.M.; BUTLER, W.R.; QUINN, F.D.; OTTINGER, C.; SHOTTS, E.. A unique *Mycobacterium* species isolated from an epizootic of striped bass (*Morone saxatilis*). **Emerging Infectious Diseases**. 7(5), 896–899, 2001.

RINGØ, E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R.; REFSTIE, S.; KROGDAHL, Å. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, 261, 829–841, 2006.

ROMALDE, J.L.; TORANZO, A.E. Streptococcosis of marine fish. In: Olivier, G. (Ed.), **ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish**. International Council for the Exploration of the Sea. n.56, 1–8, 1999.

ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E. Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In: Cunningham Cunningham, C.O. (Ed.), **Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases**. Netherlands: Kluwer Academic Publ, 211–223. Chap. 8. 2002.

ROMALDE, J.L. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. **International Microbiology**, 5, 3–9, 2002.

SAMPAIO, L.A.; TESSER, M.B.; WASIELESKY JÚNIOR, W. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 102-111, 2010 (supl. especial).

SANTOS, B.G. Uso do medicamento homeopático Sulphur no controle do *Amyloodinium* sp Brown (1931) em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766). 2011. 101p. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal da Bahia.

SEQUEIROS, C.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.R.; OLIVERA, N.L. Inhibitory activity against the pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. **Archives of Microbiology**, 192, 237–245, 2010.

SHAFFER, R.V.; NAKAMURA, E.L. Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). FAO Fisheries Synopsis, 153, U.S. Dep. Commer., **NOAA Technical Report NMFS 82**, p.21, 1989.

SHARIFUZZAMAN, S.M.; AUSTIN, B. Kocuria SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, 108, 2162–2170, 2010.

SILVA, F. C. P.; BRITO, M. F. G.; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz **Journal of Fish Biology**. 67, 1686–1698. 2005.

SORROZA, L.; PADILLA, D.; ACOSTA, F.; ROMÁN, L.; GRASSO, V.; VEGA, J.; REAL, F. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. **Veterinary Microbiology**, 155, 369-373, 2012.

SU, Y.; GUO, Z.; XU, L.; JIANG, J.; WANG, J.; FENG, J. Identification of a cobia (*Rachycentron canadum*) CC chemokine gene and its involvement in the inflammatory response. **Fish & Shellfish Immunology**, 32, 204-210, 2012.

THOMPSON F.L.; IIDA T.; SWINGS J. Biodiversity of *Vibrios*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 68, 403-431, 2004.

THOMPSON, J.; GREGORY, S.; PLUMMER, S.; SHIELDS, R.J.; ROWLEY, A.F. An *in vitro* and *in vivo* assessment of the potential of *Vibrio spp.* as probiotics for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Applied Microbiology**, 109, 1177–1187, 2010.

TORANZO A.E.; MAGARINÕS, B.; ROMALDE, J.L.. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, 246, 37-61, 2005.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64 (4), 655-671, 2000.

VIEIRA, F.N. ; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.P.L.; JATOBÁ, A.; MARTINS, M.L.; SCHLEDER, D.D.; ANDREATTA, E.R.; BARRACO, M.A.; VINATEA, L.A. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62 (3), 631-638, 2010.

WANG, Y.B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 269, 259–264, 2007.

WANG, Y.B.; TIAN, Z.Q.; YAO, J.T.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, 277, 203-207, 2008.

YOSHIKOSHI, K.B.; COSTA, K.B.; KANAI, A.B.A.C. Serological characterization of atypical strains of *Edwardsiella tarda* isolated from sea breams. **Fish Pathology**. 33(4), 265-274, 1998.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico a ser submetido para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

Atividade antagônica *in vitro* de bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá

Carolina Notaro Barros⁽¹⁾, Dulcilene Lacerda Nascimento⁽¹⁾, João Menezes Guimarães⁽¹⁾, Virgínia Fonseca Pedrosa⁽¹⁾, Alexandre Duarte Rodrigues da Silva⁽¹⁾ e Emiko Shinozaki Mendes⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: carol_notaro@biologa.bio.br, dulanas1@hotmail.com, jmedvet@gmail.com, vikavet@yahoo.com.br, alexandredrs@yahoo.com, esmendes@yahoo.com.br

Resumo - Probióticos podem representar uma alternativa no controle de doenças em substituição ao uso de antibióticos na aquicultura. O estudo isolou, testou *in vitro* e identificou bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá, *Rachycentron canadum*. Foram coletados 40 animais, 10 alevinos de berçário e 30 juvenis de sistema *offshore*, no período de novembro de 2010 a julho de 2011. Os peixes do berçário apresentaram peso de $139,30 \pm 31,52$ g e comprimento de $27,13 \pm 1,46$ cm, enquanto os do sistema *offshore* apresentaram peso de $456,77 \pm 264,46$ g e comprimento de $37,29 \pm 6,05$ cm. Foram obtidos 45 isolados bacterianos testados frente

a cinco espécies patogênicas, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Streptococcus agalactiae*; *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. Quinze isolados (33,33%) apresentaram atividade antibacteriana a pelo menos um patógeno e oito (17,77%) inibiram todos os patógenos testados. Os isolados com melhores resultados no teste de antagonismo foram *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans*, *Klebsiella* spp., *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Bacillus firmus*. Os maiores halos de inibição observados foram produzidos por *B. circulans* frente ao *V. vulnificus*. Sugere-se a realização de testes de antagonismo *in vivo* para que seja comprovada a efetividade das bactérias como probióticas para o beijupirá.

Termos para indexação: *Rachycentron canadum*, peixe marinho, bactéria probiótica; bacteriose, antagonismo.

***In vitro* antagonistic activity of potential probiotic bacteria isolated from the intestine of cobia**

Carolina Notaro Barros⁽¹⁾, Dulcilene Lacerda Nascimento⁽¹⁾, João Menezes Guimarães⁽¹⁾, Virgínia Fonseca Pedrosa⁽¹⁾, Alexandre Duarte Rodrigues da Silva⁽¹⁾ e Emiko Shinozaki Mendes⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: carol_notaro@biologa.bio.br, dulanass1@hotmail.com, jmedvet@gmail.com, vikavet@yahoo.com.br, alexandredrs@yahoo.com, esmendes@yahoo.com.br

Abstract - Probiotics may represent an alternative prophylactic disease control, replacing the use of antibiotics in aquaculture. This study isolated, tested *in vitro* and identified potential probiotic bacteria from the gut of cobia, *Rachycentron canadum*. 40 animals were captured, 10 fingerlings from a hatchery and 30 juvenile from an offshore culture system between November 2010 and July 2011. Fishes from the hatchery had weight of 139.30 ± 31.52 g and length of 27.13 ± 1.46 cm, while those from offshore culture system weighed 456.77 ± 264.46 g and had length of 37.29 ± 6.05 cm. 45 bacterial were isolated and tested against five pathogenic species, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Fifteen strains (33.33%) had antibacterial activity to at least one pathogen, while eight (17.77%) were inhibited all pathogens tested. Strains that presented the best results in antagonism test were *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans*, *Klebsiella* spp., *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Bacillus firmus*. The largest inhibition zone observed in the antagonism test was produced by *B. circulans* against *V. vulnificus*. It is suggested *in vivo* antagonism tests are performed to prove the effectiveness of these bacteria as probiotic to cobia.

Index terms: *Rachycentron canadum*, marine fish, probiotic bacteria, bacterial disease, antagonism.

Introdução

Na piscicultura, as infecções bacterianas são consideradas uma das principais causas de mortes e o controle dos patógenos é normalmente realizado através da administração de antibióticos. No entanto, o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas na aquicultura pode contribuir para o desenvolvimento de bactérias

resistentes aos medicamentos, o que torna esses micro-organismos mais difíceis de serem controlados e eliminados (Figueiredo & Leal, 2008). Adicionado a isso, ainda há uma preocupação acerca da saúde pública, já que o antibiótico residual pode persistir no produto final.

Neste contexto, a indústria da aquicultura tem o interesse de substituir as drogas antimicrobianas por profiláticos alternativos e a utilização de compostos à base de micro-organismos vivos tem sido adotada como prática sustentável, minimizando a utilização de produtos químicos e promovendo a sanidade dos animais cultivados.

Em aquicultura, o termo probiótico é definido como um suplemento microbiano, formado por um cultivo de micro-organismos vivos selecionados, o qual é adicionado à dieta com o propósito de melhorar o equilíbrio microbiano do trato gastrointestinal (Verschuere et al., 2000). De acordo com Balcázar et al. (2006), as bactérias probióticas podem reduzir ou eliminar a incidência de micro-organismos patogênicos no intestino, o que é extremamente importante para o sistema imunológico do animal, para o aumento da absorção dos nutrientes, e desta forma, para melhoria do desempenho do animal.

O *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), conhecido popularmente como beijupirá, cação de escamas ou internacionalmente como cobia (Liao et al., 2004), é considerado um candidato em potencial para aquicultura, principalmente devido ao seu rápido crescimento, que pode alcançar 4-8 kg no primeiro ano de cultivo. Além de apresentar outras características desejáveis, como excelente qualidade da carne, alta fecundidade, facilidade de desova em cativeiro (Arnold et al., 2002) e adaptação ao confinamento em tanques e gaiolas (Benetti et al., 2010).

Pesquisas a respeito da sanidade do beijupirá, bactérias com potencial probiótico, bem como seu uso no cultivo da espécie, ainda estão em fase inicial. Doenças mais

comuns de peixes cultivados de águas tropicais já acometem este animal, e esse fato é restritivo à expansão do cultivo intensivo em gaiolas (McLean et al., 2008).

Testes de antagonismo *in vitro* são utilizados frequentemente para selecionar bactérias com potencial probiótico. O antagonismo é baseado na produção de compostos inibitórios ou na competição por nutrientes dos potenciais probióticos quando confrontados com micro-organismos patogênicos (Aly et al., 2008; Sorroza et al., 2012).

O estudo foi realizado com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento sustentável do cultivo do beijupirá, a partir do conhecimento de bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do peixe.

Material e Métodos

Local, coletas e amostras

O litoral de Pernambuco, Nordeste brasileiro, apresenta um clima tropical quente-úmido caracterizado por um período de estiagem, que se prolonga de setembro a fevereiro (primavera-verão), e um período chuvoso de março a agosto (outono-inverno).

Foram realizadas oito coletas de beijupirá, as duas primeiras de alevinos ($139,30 \pm 31,52$ g) na fase de berçário provenientes de laboratório privado (Ipojuca, PE, Brasil), em novembro e dezembro de 2010. As seis coletas seguintes foram de animais na fase de engorda ($456,77 \pm 264,46$ g) provenientes de sistema *offshore*, localizado a nove quilômetros da costa (Recife, PE, Brasil), no período de janeiro a julho de 2011. Os animais que povoaram o sistema *offshore* foram provenientes do mesmo lote de animais coletados no laboratório.

Em cada coleta, cinco peixes foram capturados totalizando quarenta animais, os quais foram transportados vivos, com aeração constante até o momento de realização

dos procedimentos iniciais de anestesia, pesagem, medida do comprimento, eutanásia, necropsia e coleta de forma asséptica do material biológico utilizado no estudo, amostras do intestino do beijupirá. Os animais foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína na concentração de 100 mg/L e a eutanásia foi realizada através de secção medular (Neiffer & Stamper, 2009).

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (Recife, PE, Brasil).

Isolamento e estocagem das bactérias do intestino

Cada intestino foi dissecado e dividido em três porções, as quais foram maceradas e inoculadas em Caldo Trypticase de Soja (TSB) para incubação a 36°C por 24 h. A partir das culturas em TSB, foram realizadas estrias em placas contendo meio ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS), para isolamento de bactérias potenciais probióticas, incubadas a 36°C por 24h (Balcázar et al., 2008).

Após o desenvolvimento das bactérias, os diferentes morfotipos foram descritos e purificados através de repicagens sucessivas em MRS. Os isolados puros foram estocados em criotubos com caldo glicerinado e armazenados em ultrafreezer à -80°C para as análises posteriores.

Testes de antagonismo *in vitro*

As bactérias isoladas foram confrontadas com cinco espécies patogênicas para peixes, *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). O teste de antagonismo se efetuou por meio do método “bloco de gelose” descrito por Stern et al. (2006).

De cada isolado foi realizada uma suspensão, referente à escala de MacFarland 0.5, em solução salina 0,85% (NCCLS, 2003). A suspensão foi semeada na superfície do ágar MRS, o qual foi incubado por 24 h a 36°C. Discos do ágar MRS (6 mm de diâmetro), impregnado pela bactéria testada, foram assepticamente retirados e colocados invertidos na superfície de ágar Mueller-Hinton recém semeado com o patógeno. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 36°C, com exceção do patógeno *A. hydrophila* que foi incubado a 28°C.

As zonas claras ao redor dos discos de ágar serviam para indicar atividade antibacteriana. Os diâmetros dos halos foram mensurados (mm) com o auxílio de paquímetro, subtraindo-se o diâmetro dos discos de ágar. Todos os testes foram realizados em triplicata com controle negativo do meio MRS.

As bactérias que apresentaram atividade antimicrobiana foram identificadas por testes bioquímicos, utilizando-se kits do sistema API, API50CHB/E e API50CHL (BioMérieux, França).

Análises estatísticas

Para averiguar se houve diferença na proporção de isolados com potencial probiótico nas distintas épocas do ano (estiagem e chuvosa) foi realizado o teste de proporção ($P < 0,05$). Para verificar a diferença da ação dos potenciais probióticos (tamanho dos halos de inibição) realizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa computacional SysEapro (V.2).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 45 isolados bacterianos do intestino dos 40 beijupirás adquiridos ao longo de oito meses de cultivo. Nos dois primeiros meses os animais estiveram em

tanques com sistema de recirculação, no período de estiagem. Nos seis meses seguintes, os animais estavam em sistema *offshore*, sob influência da época de estiagem, por dois meses, e chuvosa, nos últimos quatro meses.

Todos os animais foram alimentados com ração comercial e apresentaram os pesos e comprimentos médios apresentados na tabela 1.

Dos isolados obtidos, 14 foram dos peixes provenientes de berçários e 31 dos animais coletados de sistema *offshore*. Quanto à morfologia das bactérias, 23 (51%) foram bacilos Gram-positivos, 12 (27%) bacilos Gram-negativos, sete (15%) cocobacilos Gram-positivos e três (7%) cocos Gram positivos.

Um terço (15) dos 45 isolados apresentou atividade antibacteriana contra pelo menos um patógeno e oito dos 15 potenciais probióticos obtidos conferiram atividade antibacteriana frente a todos os patógenos testados. Os isolados que apresentaram os melhores resultados no teste de antagonismo, por produzirem maiores halos ou por inibirem todos os patógenos testados foram identificados como *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus coagulans*, *Klebsiella* spp., *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Bacillus firmus* (Tabela 2).

Seis (40%) dos 15 potenciais probióticos identificados foram obtidos no período de estiagem e nove (60%) no período chuvoso. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na proporção de isolados com potencial probiótico obtidos nas distintas épocas do ano.

Dentre os isolados obtidos no período chuvoso foram observados os potenciais probióticos com melhores desempenhos nos testes de antagonismo. Porém, não se pode afirmar que esse resultado se deve apenas a influência da época do ano, pois coincide também com o período em que os animais apresentavam maior estágio de

desenvolvimento, estavam mais adaptados ao ambiente de cultivo e possivelmente apresentavam o sistema imunológico mais fortalecido que no início do cultivo.

O isolado 37, identificado como *B. circulans*, conferiu melhor desempenho frente aos patógenos *V. vulnificus* (ATCC 27562) e *A. hydrophila* (IOC/FDA 110-36). A espécie foi responsável pelo maior halo de inibição observado nos testes de antagonismo ($23,13 \pm 0,23$ mm) contra *V. vulnificus*. Bandyopadhyay & Mohapatra (2009) avaliaram o uso do *B. circulans* como um suplemento probiótico na dieta de alevinos de *Catla catla* e apoiaram o uso da bactéria para melhorar o crescimento, absorção de nutrientes e como importante imunoestimulante, principalmente contra *A. hydrophila*.

O isolado 29, *B. coagulans*, espécie encontrada no início e no fim do cultivo apresentou os maiores halos quando confrontados com os patógenos *S. agalactiae* (ATCC 13813) e *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802). Em estudos, a bactéria foi adicionada à água de tanques contendo *Oreochromis niloticus* e foi capaz de melhorar o estado imunológico e o desempenho de crescimento do peixe (Zhou et al., 2009).

O isolado 31, identificado como uma bactéria da família Enterobacteriaceae do gênero *Klebsiella* spp., conferiu melhor desempenho frente a *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e ao *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802). Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os diâmetros dos halos de inibição produzidos pelos isolados 31 e 29 quando desafiados frente ao *V. parahaemolyticus*.

O meio MRS foi utilizado para selecionar e isolar, sobretudo, bactérias Gram-positivas e ácido lácticas. No entanto, os isolados 30 e 31 foram identificados como pertencendo à família Enterobacteriaceae, que inclui bactérias Gram-negativas patogênicas e ambientais. Não é comum relatos de bactérias dessa família capazes de

222 produzir substâncias inibitórias, as chamadas bacteriocinas, moléculas protéicas que
223 normalmente interferem no crescimento de outras bactérias em ágar (Jack et al., 1995).

224 Ringø et al. (2010), em estudo a respeito da ação de bactérias probióticas sobre
225 patógenos do trato gastrointestinal de peixe, citaram que bactérias dos gêneros
226 *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Bacillus* spp. estão entre os grupos de
227 probióticos mais indicados para aquicultura. No presente estudo, 86% (13) dos isolados
228 bacterianos identificados compõem espécies dos gêneros comuns encontrados e
229 indicados como potenciais probióticos.

230 O *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* foi isolado nas duas últimas coletas do estudo e
231 conferiu atividade antimicrobiana frente a todos os patógenos testados. Sua ação
232 antagonista frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas também foi observada
233 por outros autores, ao analisarem o antagonismo da espécie frente a bactérias como *V.*
234 *anguillarum* (Villamil et. al., 2002; Balcázar et al., 2007a), *V. parahaemolyticus*
235 (Balcázar et al., 2007b), *A. salmonicida* (Balcázar et al., 2007c), *A. hydrophila*
236 (Balcázar et al., 2008) e *L. garvieae* (Sequeiros et. al., 2010). Além da atividade
237 antimicrobiana, *L. lactis* ssp. *lactis* apresentou capacidade de modificar a microbiota
238 intestinal do *Oncorhynchus mykiss* (Balcázar et al., 2007c) e *Salmo trutta* (Balcázar et
239 al., 2007d), estimulando a resposta imune dos mesmos.

240 Espécies de *Lactobacillus* spp. foram anteriormente isoladas do trato digestivo de
241 peixe. Foi verificado que o *L. plantarum* é apropriado para utilização como probiótico
242 para fases larvais de peixes (Balcázar et al., 2007a,c,d; Michel et al., 2007). Essa
243 espécie apresentou a maior frequência entre os potenciais probióticos obtidos no atual
244 estudo, sendo isolada tanto de animais mais jovens, coletados no início do cultivo,
245 quanto de animais obtidos nas últimas coletas, além de conferir atividade antagônica
246 contra todos os patógenos testados.

Há registro de que *L. plantarum* inibiu o crescimento de *V. anguillarum* em experimentos *in vitro* com larvas de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), em trabalho desenvolvido por Vine et al. (2006), e Picchietti et al. (2007) observaram o efeito estimulante sobre o sistema imune de larvas do *Sparus aurata*, quando alimentadas via rotíferos enriquecidos pela mistura de *L. plantarum* e *L. fructivorans*.

Além do efeito probiótico do *L. plantarum* em larvas de peixe, sua ação também foi observada em adultos por Balcázar et al. (2008), que relataram ser a espécie capaz de reduzir a adesão de *A. hydrophila* e da *A. salmonicida* na mucosa intestinal de peixes. Parthasarathy e Ravi (2011) estudaram o efeito antagonista de *L. plantarum* e *Bacillus megaterium* frente a *A. hydrophila*, quando adicionadas à dietas de *Catla catla*, e verificaram que a combinação das espécies melhoraram significativamente a performance de crescimento do peixe e conferiram resistência contra infecção por *A. hydrophila*.

Segundo Hong et al. (2005), entre o grande número de produtos probióticos em uso hoje, estão os formadores de esporos, principalmente compostos por bactérias do gênero *Bacillus* spp.. Usados principalmente em sua forma de esporos, estes produtos podem evitar distúrbios gastrintestinais, além de imunomodulação e síntese de antimicrobianos.

B. cereus foi identificado duas vezes e apresentou atividade antimicrobiana a dois dos cinco patógenos testados no estudo, entretanto, em pesquisa *in vivo* e *in vitro* para avaliar a eficácia do *B. cereus* na inibição do crescimento de *A. hydrophila*, foi observado que apesar de não apresentar compostos inibitórios em testes de antagonismo, o agente foi capaz de atenuar o crescimento do patógeno por exclusão competitiva (Lallo et. al., 2007).

271 *B. firmus*, assim como *B. coagulans*, conseguiu inibir todos os patógenos testados
272 no presente estudo. A espécie é um probiótico conhecido na natureza e amplamente
273 utilizado na carcinicultura, demonstrou efeito inibitório contra *A. hydrophila*, quando
274 adicionados a ração de *O. niloticus*, não causando qualquer doença ou mortalidade
275 quando injetada no peixe (Aly et al., 2008).

276 Estudos relacionados ao uso do probiótico no cultivo de beijupirá estão em fase
277 inicial. Geng et al. (2011) observaram que níveis balanceados do probiótico comercial
278 *Bacillus subtilis* e da quitosana, suplementados a dieta do peixe, pode melhorar o
279 crescimento, imunidade inespecífica e sua proteção contra infecção por *V. harveyi*.

280 O uso de um potencial probiótico isolado do intestino do próprio animal, pode
281 representar maior segurança, já que as bactérias foram capazes anteriormente de aderir
282 e/ou colonizar o intestino do peixe em estudo. Os potenciais probióticos isolados neste
283 estudo podem representar parte da microbiota natural do beijupirá. Bactérias ácido
284 lácticas já foram descritas por constituírem parte da microbiota do intestino de diversas
285 espécies de peixes (Balcázar et al., 2007d; Michel et al., 2007) e muitas delas são
286 indicadas como probiótico no controle de patógenos (Gatesoupe, 2008; Kesarcodi-
287 Watson et al., 2008).

288 Algumas espécies potenciais probióticas identificadas no estudo já foram
289 caracterizadas por outros autores, porém isoladas de intestino de outras espécies de
290 peixes. Sugere-se a realização de testes de antagonismo *in vivo* para comprovação da
291 efetividade das bactérias isoladas do intestino do beijupirá como probióticas. Para que
292 desta forma, os potenciais isolados possam ser utilizados como alternativa profilática e
293 terapêutica no controle de doenças do beijupirá, substituindo os agentes
294 quimioterápicos, além da possibilidade de representarem melhoria no desempenho
295 zootécnico do animal.

296

297

Agradecimentos

298

299

300

301

302

303

304

Referências

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento do projeto “Probio-Cobia”. Ao Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) pelo financiamento do projeto “Cação de Escama” via Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Rede de Pesquisa e desenvolvimento em Piscicultura Marinha (REPIMAR).

ALY, S.M.; ABD-EL-RAHMAN, A. M.; JOHN, G; MOHAMED, M.F. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. **Aquaculture**. 277, 1–6, 2008.

ARNOLD, C.R.; KAISER, J.B.; HOLT, G.J. Spawning of cobia *Rachycentron canadum* in captivity. **J. World Aquac. Soc.** 33 (2), 205–208, 2002.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. Microb.** 14, 173–186, 2006.

BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; MÁRQUEZ, I.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Vet. Microb.** 122, 373–380, 2007a.

BALCÁZAR, J.L.; ROJAS-LUNA, T.; CUNNINGHAM, D.P. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **J. Invert. Path.** 96, 147–150, 2007b.

- 321 BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; MÁRQUEZ, I.;
322 GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Enhancement of the immune response and protection
323 induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout
324 (*Oncorhynchus mykiss*). **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 51, 185–193, 2007c.
- 325 BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; CALVO A.C.;
326 MÁRQUEZ, I.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Changes in intestinal microbiota and
327 humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo*
328 *trutta*). **Brit. J. Nutr.** 97, 522–527, 2007d.
- 329 BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; CALVO A.C.;
330 GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Characterization of probiotic properties of lactic acid
331 bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture.** 278, 188–191, 2008.
- 332 BANDYOPADHYAY, P.; DAS MOHAPATRA, P.K. Effect of a probiotic bacterium
333 *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and
334 immunity of *Catla catla* (Ham.). **Fish Physiol. Biochem.** 35, 467–478, 2009.
- 335 BENETTI, D.D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J.A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.;
336 ORHUN, M.R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean
337 submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture.** 302, 195–201, 2010.
- 338 FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes.
339 **Revista Brasileira de Zootecnia.** 37, suplemento especial, 08-14, 2008.
- 340 GENG, X.; DONG, X.H.; TAN, B.P.; YANG, Q.H.; CHI, S.Y.; LIU, H.Y.; LIU, X.Q.
341 Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-
342 specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish**
343 **Shellfish Immunol.** 31, 400-406, 2011.
- 344 HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as
345 probiotics. **FEMS Microbiol. Rev.** 29, 813–835, 2005.

- JACK, R.; TAGG, J.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** 59 (2), 171–200, 1995.
- KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M.J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**. 274, 1–14, 2008.
- LALLOO, R.; RAMCHURAN, S.; RAMDUTH, D.; GORGENS, J.; GARDINER, N. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. **J. Appl. Microbiol.** 103, 1471–1479, 2007.
- LIAO, I.C.; HUANG, T.S.; TSAI, W.S.; HSUEH, C.M.; CHANG, S.L.; LEAÑO, E.M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**. 237, 155-165, 2004.
- MCLEAN, E.; SALZE, G.; CRAIG, S.R. Parasites, diseases and deformities of cobia. **Ribarstvo: Croatian Journal of Fisheries**, 66 (1), 1-16, 2008.
- MICHEL, C.; PELLETIER, C.; BOUSSAHA, M.; DOUET, D.G.; LAUTRAITE, A.; TAILLIEZ, P. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 73 (9), 2947–2955, 2007.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard—Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6** (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NEIFFER D.L.; STAMPER M.A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. **ILAR J.** 50(4), 343-360, 2009.

- 370 PARTHASARATHY, R.; RAVI, D. Probiotic bacteria as growth promoter and
371 biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Indian**
372 **J. Fish.** 58(3), 87-93, 2011.
- 373 PICCHIETTI, S.; MAZZINI, M.; TADDEI, A.R.; RENNA, R.; FAUSTO, A.M.;
374 MULERO, V.; CARNEVALI, O.; CRESCI, A.; ABELLI, L. Effects of administration
375 of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and
376 ultrastructural studies. **Fish Shellfish Immunol.** 22, 57-67, 2007.
- 377 RINGØ, E.; LØVMO, L.S.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.;
378 MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; MAYHEW, T.M. Lactic acid bacteria vs. pathogens
379 in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Res.** 41, 451-467, 2010.
- 380 SEQUEIROS, C.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.R.; OLIVERA, N.L. Inhibitory
381 activity against the pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis*
382 TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish.
383 **Archives of Microbiology.** 192, 237-245, 2010.
- 384 SORROZA, L.; PADILLA, D.; ACOSTA, F.; ROMÁN, L.; GRASSO, V.; VEGA, J.;
385 REAL, F. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection
386 of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*.
387 **Vet. Microbiol.** 155, 369-373, 2012.
- 388 STERN, N.J.; SVETOCH, E.A.; ERUSLANOV, B.V.; PERELYGIN, V.V.;
389 MITSEVICH, E.V.; MITSEVICH, I. P.; POKHILENKO, V.D.; LEVCHUK, V.P.;
390 SVETOCH, O.E.; SEAL B. S. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and
391 purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the
392 chicken gastrointestinal system. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50(9), 3111-3116,
393 2006.

- 394 VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic
395 bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64 (4),
396 655-671, 2000.
- 397 VILLAMIL, L.; TAFALLA, C.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Evaluation of
398 immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*).
399 **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 9 (6), 1318–1323, 2002.
- 400 VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS**
401 **Microbiol. Rev.** 30, 404–427, 2006.
- 402 ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y.; LI, W. Effect of treatment with probiotics as water
403 additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response.
404 **Fish. Physiol. Biochem.** 36 (3), 501-509, 2009.
- 405

406 **Tabela 1.** Pesos e comprimentos médios de beijupirás provenientes de tanque berçário e
 407 sistema *offshore* coletados no período de novembro de 2010 a julho de 2011 (Recife,
 408 Brasil).

Variável	Coleta mês/ano	Sistema de cultivo	Mínimo	Máximo	Média ± DP
Peso (g)	11-12/2010	berçário	77,88	192,29	139,30 ± 31,52
	01-07/2011	<i>offshore</i>	150,40	1025,00	456,77 ± 264,46
Comprimento (cm)	11-12/2010	berçário	24,50	29,00	27,13 ± 1,46
	01-07/2011	<i>offshore</i>	28,00	49,00	37,29 ± 6,05

409 DP= desvio padrão

Tabela 2. Diâmetros médios ($\pm$ DP) dos halos de inibição produzidos por isolados do intestino de *Rachycentron canadum* no teste de antagonismo *in vitro* frente a cinco patógenos.

Potenciais probióticos		Diâmetros médios dos halos de inibição (mm)				
Isol. ⁽¹⁾	Identificação	VP ⁽²⁾	AH ⁽³⁾	SA ⁽⁴⁾	PA ⁽⁵⁾	VV ⁽⁶⁾
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,13 $\pm$ 0,15 ^{bB}	6,63 $\pm$ 0,35 ^{fC}	0 ^{aA}	7,73 $\pm$ 0,06 ^{fD}	8,37 $\pm$ 0,32 ^{dE}
7	<i>Bacillus cereus</i>	4,10 $\pm$ 0,17 ^{cB}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	5,47 $\pm$ 0,11 ^{bC}	0 ^{aA}
11	<i>Bacillus coagulans</i>	0 ^{aA}	0 ^{aA}	9,23 $\pm$ 0,21 ^{cD}	2,73 $\pm$ 0,15 ^{aB}	6,57 $\pm$ 0,67 ^{cC}
15	<i>Bacillus cereus</i>	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	9,07 $\pm$ 0,11 ^{hB}	0 ^{aA}
17	<i>L. plantarum</i>	3,00 $\pm$ 0,20 ^{bA}	4,23 $\pm$ 0,25 ^{cB}	16,25 $\pm$ 0,07 ^{gD}	7,13 $\pm$ 0,15 ^{eC}	18,6 $\pm$ 0,14 ^{gH}
24	<i>Bacillus</i> spp.	0 ^{aA}	0 ^{aA}	0 ^{aA}	5,77 $\pm$ 0,15 ^{bcB}	0 ^{aA}
29	<i>B. coagulans</i>	8,56 $\pm$ 0,05 ^{fC}	4,06 $\pm$ 0,11 ^{cA}	17,13 $\pm$ 0,23 ^{hD}	6,1 $\pm$ 0,17 ^{cdB}	17,93 $\pm$ 0,11 ^{gE}
30	<i>Klebsiela</i> spp.	3,06 $\pm$ 0,11 ^{bB}	0 ^{aA}	9,13 $\pm$ 0,23 ^{cD}	8,77 $\pm$ 0,06 ^{ghD}	6,53 $\pm$ 0,55 ^{cC}
31	<i>Klebsiela</i> spp.	8,20 $\pm$ 0,20 ^{fC}	0 ^{aA}	9,4 $\pm$ 0,10 ^{cD}	14,17 $\pm$ 0,15 ^{jE}	4,13 $\pm$ 0,42 ^{bB}
34	<i>L. plantarum</i>	4,13 $\pm$ 0,15 ^{cA}	4,37 $\pm$ 0,15 ^{cA}	15,53 $\pm$ 0,15 ^{fC}	8,73 $\pm$ 0,06 ^{ghB}	20,4 $\pm$ 0,10 ^{iD}
37	<i>Bacillus circulans</i>	4,73 $\pm$ 0,21 ^{dA}	9,1 $\pm$ 0,10 ^{hB}	12,53 $\pm$ 0,06 ^{dC}	9,53 $\pm$ 0,15 ^{iB}	23,13 $\pm$ 0,23 ^{jD}
38	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	5,47 $\pm$ 0,11 ^{eA}	6,13 $\pm$ 0,11 ^{eB}	14,60 $\pm$ 0,10 ^{eC}	6,1 $\pm$ 0,17 ^{cdB}	19,17 $\pm$ 0,15 ^{hD}
40	<i>L. plantarum</i>	4,17 $\pm$ 0,29 ^{cA}	8,33 $\pm$ 0,15 ^{gC}	14,2 $\pm$ 0,20 ^{eD}	6,27 $\pm$ 0,25 ^{dB}	16,23 $\pm$ 0,21 ^{fE}
41	<i>Bacillus firmus</i>	5,10 $\pm$ 0,17 ^{deB}	3,37 $\pm$ 0,32 ^{bA}	7,33 $\pm$ 0,30 ^{bC}	7,43 $\pm$ 0,06 ^{efC}	14,67 $\pm$ 0,15 ^{eD}
44	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	4,17 $\pm$ 0,15 ^{cA}	5,07 $\pm$ 0,11 ^{dB}	16,23 $\pm$ 0,15 ^{gD}	8,47 $\pm$ 0,25 ^{gC}	19,13 $\pm$ 0,15 ^{hE}

DP = Desvio padrão; ⁽¹⁾Isolado bacteriano; ⁽²⁾*Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802); ⁽³⁾*Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36); ⁽⁴⁾*Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813); ⁽⁵⁾*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442); ⁽⁶⁾*Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significamente ($P < 0,05$) os diâmetros dos halos entre bactérias potenciais probióticas; letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$) os diâmetros dos halos entre as bactérias patogênicas.

5. ANEXO (Normas para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja

contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

- Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.
- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em "comentários ao editor", informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor, informar a formação e o grau acadêmico. Clicar em "incluir autor" para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 2, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema. Depois, ir à parte superior da tela, no campo "Idioma do formulário", e selecionar "English". Descer a tela (clicar na barra de rolagem) e copiar e colar o "title", "abstract" e os "index terms" nos campos correspondentes. (Para dar continuidade ao processo de submissão, é necessário que tanto o título, o resumo e os termos para indexação quanto o title, o abstract e os index terms do manuscrito tenham sido fornecidos.)

No passo 3 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word 1997 a 2003.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo: "Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer: Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

- A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:
- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO .

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
- A autocitação deve ser evitada.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de

publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.
- Apresentação de Notas Científicas
- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica

Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315

CEP 70770 901 Brasília, DF