

JULIANA MARIA ADERALDO VIDAL

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADAS DO INTESTINO DE
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

**RECIFE,
2015**



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 DE
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

Juliana Maria Aderaldo Vidal

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

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Orientadora

Recife,
Julho/2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

V648b Vidal, Juliana Maria Aderaldo.

Bactérias com potencial probiótico isolados do intestino de camarão marinho
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931). – Recife, 2015.
80 f. : il.

Orientador(a): Emiko Shinozaki Mendes.

Tese (doutorado Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Linha de pesquisa: Bactérias em organismos aquáticos cultivados –
Universidade
Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Engenharia de Pesca. Recife, 2015.

1. Bactérias probióticas. 2 . Testes de antagonismo. 3. *Bacillus cereus*.
4. Infecção experimental. I. Mendes, Emiko Shinozaki. II. Título.

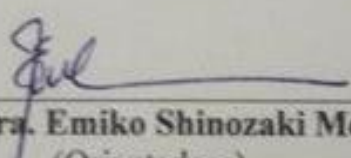
CDD: 639

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 DE
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

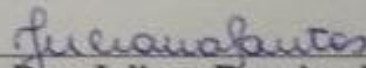
Juliana Maria Aderaldo Vidal

Tese julgada adequada para obtenção do título
de doutor em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
27/07/2015 pela seguinte Banca Examinadora:

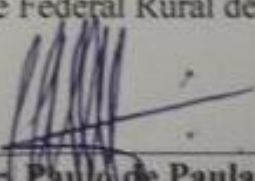


Prof. Dra. Emiko Shinozaki Mendes
(Orientadora)

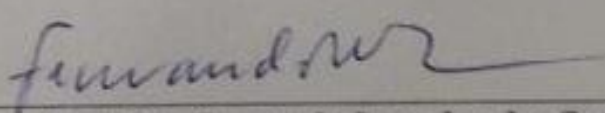
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco



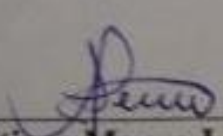
Prof. Dra. Juliana Ferreira dos Santos
Unidade Acadêmica de Serra Talhada
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes
Departamento de Engenharia de Pesca
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Dra. Alitiane Moura Lemos Pereira
Embrapa Meio Norte/Parnaíba - PI

*Aos meus queridos pais Raimundo Aderaldo e
Francisca Vidal.*

Dedico

Agradecimentos

A Deus meu rochedo e fortaleza em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado, a todos que fazem o Departamento de Eng. de Pesca, Unidade Acadêmica de Serra Talhada e Base de Aquicultura.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro a pesquisa através da concessão de bolsa de estudo.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco pela parceria na realização do cultivo de camarões em águas oligohalina, em especial ao colega Engenheiro de Pesca Carlos Guerra.

A Universidade Federal de Pernambuco em nome do Prof. Marcus Morais pela disponibilidade do laboratório para que fossem realizadas a biologia molecular.

À Profa. Emiko Shinozaki Mendes pela oportunidade de orientação, confiança e por todos os ensinamentos oferecidos.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuições imprescindíveis.

Aos professores: Fernando Leandro pela ajuda de grande valia nas análises de histologia, Paulo de Paula Mendes pela ajuda valiosa na análise estatística dos dados dos testes *in vivo* e por todas as sugestões ao longo do trabalho, Willian Severi, pela contribuição nas análises de qualidade de água e Eudes Correia pelas sugestões.

Ao amigo João Thiago pela ajuda na análise estatística dos dados dos testes *in vitro*

Aos meus queridos amigos: Juliana Santos, Maurício Pessôa, Weruska Costa e Zeca Pacheco, meu muito obrigada pela companhia, estímulo, paciência e por todas as sugestões e ajudas ao longo do trabalho.

Aos colegas e amigos da UAST (Francisco Marcante, Elton França, Girlene Fábila, Hélio, Renata Akemi e Ugo Lima) e do Lasaq/Lical (Carolina Notaro, Juliana Carvalho, Monique Pinto, Laelia Felix, Arthur Vinícius, João Guimarães, Alexandre Duarte, Sarah Galvão e Rejane Luna) pela convivência e contribuições ao longo do trabalho.

Aos alunos do Curso de Eng. de Pesca da UAST em especial a Juliana Meneses, Manoela Amaral, Juliane Lisandra, Ana Paula Silva, Camila Laís, Maria Gilvaneide, Karen Carvalho, Keylane Nunes, Mayara Vasconcelos, Estevão Jórdão, Carlos Éder, Thiago Hilário, Emanuel Leite, dentre outros, que muito me ajudaram, com vocês ensinei e aprendi.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos que mesmo de longe sempre estiveram presentes em minha vida, em especial a minha irmã Kennya Aderaldo pelo incentivo e amor de sempre.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho, meu muito obrigada!

Resumo

Bactérias com efeito probiótico contribuem para saúde de camarões marinhos em cultivo, em substituição aos antibióticos, exercendo ação antagonista à micro-organismos patogênicos ou por competição por espaço e nutrientes, além de melhorar o apetite levando a um maior crescimento dos animais. Quando isolados do próprio camarão seu uso é seguro, por serem capazes de aderir ou colonizar o intestino destes. Neste sentido, objetivou-se isolar bactérias probióticas do intestino de juvenis de *Litopenaeus vannamei* e avaliar os efeitos da sua administração sobre o desempenho dos animais cultivados frente infecção experimental. Foram isoladas bactérias do intestino de camarão cultivado em águas oligohalina e salgada, em períodos seco e chuvoso, e confrontadas com *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas hydrophila*, em testes *in vitro*. As bactérias que produziram efeito antimicrobiano foram identificadas através de biologia molecular. Vinte e nove isolados apresentaram efeito antagônico a pelo menos um dos patógenos testados. A espécie que mais ocorreu foi *Bacillus cereus*, produzindo os maiores halos de inibição frente ao *V. alginolyticus* e *V. vulnificus*. A bactéria *Citrobacter freundii*, proveniente de água oligohalina apresentou melhor efeito antimicrobiano, perante os quatro patógenos. O probiótico *Bacillus cereus* foi testado em ração para pós-larvas de *L. vannamei*, frente a desafio com *V. parahaemolyticus*, e *V. alginolyticus* quando avaliou-se o desempenho zootécnico dos animais, a capacidade de colonização das bactérias probióticas, contagem de patógenos e lesões histopatológicas. O uso do probiótico não influenciou nas taxas de sobrevivência dos animais, porém nos tratamentos em que não se utilizou probiótico houve menor ganho de peso. Os animais que receberam ração suplementada de probiótico, tiveram contagem de patógenos inferior aqueles alimentados sem o uso. Não foram observadas lesões histopatológicas nos órgãos e tecidos dos animais. Concluiu-se que é possível isolar bactérias com efeito probiótico do intestino do camarão marinho, sendo que a cepa de *Bacillus cereus* demonstrou maior capacidade de colonizar o próprio hospedeiro, diminuindo os patógenos.

Palavras-chave: Bactérias probióticas, testes de antagonismo, *Bacillus cereus*, infecção experimental.

Abstract

Bacteria with probiotic effect have been used in marine shrimp production like antibiotics substitution, contributing to the health of the host, by antagonistic action to pathogenic micro-organisms or by competition for space and nutrients, and improving appetite and lead the further growth of the animals. When isolated from the host itself is safe to use, being able to adhere and colonize the intestine. The objective was to isolate probiotic bacteria from intestine of juvenile *Litopenaeus vannamei* and evaluate the effects of probiotic administration in the performance of cultivated animals experimental challenged infection. Intestinal bacteria were from cultivated shrimp in oligohaline water and saltwater in dry and rainy seasons, and confronted with *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila*. Bacteria showed antimicrobial effect have been identified by molecular biology. Twenty-nine isolates showed antagonistic effect at least one of the tested pathogens. The species that most occurred was *Bacillus cereus*, the producing of the largest zones of inhibition to the *V. alginolyticus* and *V. vulnificus*. The bacterium *Citrobacter freundii*, from oligohaline water showed the best antimicrobial effect before the four pathogens. The probiotic *Bacillus cereus* was tested in diet for marine shrimp post-larvae against challenge with *V. parahaemolyticus*, and *V. alginolyticus* which evaluated the growth performance of animals, colonization capacity of the probiotic bacteria, pathogens count and histopathological lesions. The use of probiotic had no effect on animals survival, but not for treatments which was used probiotic had a lower weight gain. Animals fed dietary supplementation of probiotic had lower pathogens count those fed without the use. Histopathological lesions were observed in organs and tissues of animals. It can be concluded that it was possible to isolate bacteria having probiotic effect of marine shrimp intestine, wherein the strain *Bacillus cereus* demonstrated high capacity to colonize the host itself, causing a significant reduction of pathogens.

Key words: Probiotic bacteria, antagonism tests, *Bacillus cereus*, experimental infection.

ARTIGO 1

Tabela 1	Diâmetros médios ($\pm$ DP) dos halos de inibição produzidos por bactérias com características probióticas isoladas do intestino de camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> frente a patógenos.....	45
----------	--	----

ARTIGO 2

Tabela 1.	Valores médios ($\pm$ DP), mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos da água de cultivo de pós-larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> , quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.....	64
Tabela 2.	Influência do uso de probiótico sobre a taxa de sobrevivência de pós-larvas do <i>Litopenaeus vannamei</i> , quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.....	65
Tabela 3.	Influência do uso de probiótico sobre o peso de pós-larvas do <i>Litopenaeus vannamei</i> , quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.....	66
Tabela 4.	Contagens bacterianas de probióticos em amostras de pós-larvas de camarão marinho quando alimentadas por ração suplementada com <i>Bacillus cereus</i> e desafiadas com bactérias do gênero <i>Vibrio</i> spp, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.....	68
Tabela 5	Contagens bacterianas de patógenos em amostras de pós-larvas de camarão marinho quando alimentadas por ração não suplementada e suplementada com <i>Bacillus cereus</i> e desafiadas com bactérias do gênero <i>Vibrio</i> spp, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.....	69

Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

1-	Introdução.....	11
2-	Revisão de literatura.....	13
3-	Referências bibliográficas.....	20
4-	Artigo científico.....	27
4.1 -	Artigo científico I: Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de bactérias intestinais de camarão marinho.....	27
4.1.1-	Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.....	46
4.2 -	Artigo científico II Avaliação de probiótico frente à infecção experimental por bactérias patogênicas em pós-larvas de camarão marinho	56
4.2.1-	Normas da Revista Caatinga.....	74

1- Introdução

De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO, 2014), aproximadamente 92% da produção mundial de camarão cultivado é da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) com uma produção em 2012 de 3.178.721,10 toneladas, sendo que no Brasil a produção foi de aproximadamente 71.000 t. A produção de *L. vannamei* tem apresentado crescimento, devido ao conhecimento nutricional, oferta de ração de boa qualidade, crescimento em diferentes condições ambientais e ao estudo e domínio do seu ciclo reprodutivo. Além disso, por ser uma espécie eurihalina pode tolerar amplas flutuações na salinidade, adaptando-se a baixas salinidades, permitindo seu cultivo em águas interiores, circunstância que favorece a ampliação de criatórios.

Um dos maiores entraves para a manutenção dos índices de produtividade da carcinicultura são as enfermidades, destacando-se dentre elas as de origem bacteriana, que são capazes de desencadear infecções primárias e/ou oportunistas, as quais têm sido combatidos com a utilização de antibióticos o que tem acarretado o desenvolvimento de bactérias resistentes ao uso desses antimicrobianos. De acordo com Verschuere et al (2000) existe a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas a tais antibióticos.

Diversas bactérias com efeito probiótico têm sido utilizadas no cultivo de camarões marinhos em substituição ao uso de antimicrobianos, com o objetivo de melhorar o equilíbrio microbiano gastrointestinal, além de melhorar o apetite e levar a um maior crescimento e melhor conversão alimentar (BOONTHAI et al., 2011; NEWAJ-FYZUL et al., 2014).

A utilização empírica de probióticos na carcinicultura também é um problema preocupante, pela falta de informação dos produtos e de sua composição. Muitos dos probióticos comerciais são isolados a partir de outros ambientes, o que pode acarretar a introdução de um micro-organismo exótico ao ambiente de cultivo.

Sendo assim, Balcázar et al. (2006) sugeriram o isolamento de micro-organismos probióticos a partir do próprio hospedeiro por apresentar adaptabilidade muito maior às condições de origem. Desse modo, a utilização de bactérias isoladas do próprio hospedeiro, apresenta-se como uma alternativa para a prevenção de enfermidades, em substituição aos antimicrobianos.

Nesse sentido, objetivou-se isolar bactérias probióticas do intestino de juvenis de *Litopenaeus vannamei* cultivados em água salgada e oligohalina e avaliar os efeitos da administração de probiótico sob o desempenho dos animais cultivados frente a infecções experimentais.

2. Revisão de literatura

2.1 Doenças bacterianas em camarões cultivados

O desempenho produtivo da carcinicultura pode ser afetado por uma série de fatores, dentre os quais estão as enfermidades, que por consequência, causam sérios prejuízos econômicos (YINGVILASPRASERT et al., 2013; ZHANG et al., 2014) e restrições a expansão da atividade.

As doenças que acometem os camarões cultivados são desencadeadas quando ocorre um desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões e os agentes potencialmente patogênicos (MERCIER et al., 2006). As altas densidades populacionais, usualmente requeridas nos cultivos, bem como o estresse nos animais propiciam o rápido alastramento dos agentes infecciosos, resultando geralmente em mortalidades (BARRACO, 2004).

Inúmeros fatores ambientais podem causar estresse nos camarões cultivados, tais como extremos de pH e temperatura, concentrações baixas de oxigênio dissolvido, saturação de gases, mudanças abruptas na salinidade e presença de substâncias tóxicas (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema de defesa do organismo fica debilitado devido ao gasto de energia na sua adaptação às novas condições (FRANCO et al., 2010). Nestas circunstâncias, a população cultivada torna-se susceptível a patógenos oportunistas, que podem afetar a saúde dos camarões (MENDES et al., 2009).

As doenças em camarões cultivados podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e outros organismos (GESTEIRA, 2006), ocasionando infecções por um único ou múltiplos agentes patogênicos (QUIAO et al., 2015).

Dentre os principais agentes causadores de doenças em camarões marinhos destacam-se as bactérias, por serem encontradas normalmente nos ambientes aquáticos sendo capazes de desencadear infecções primárias e/ou secundárias (oportunistas). As doenças bacterianas

mais comuns das fazendas de camarão são provocadas por algumas bactérias extracelulares gram-negativas do gênero *Vibrio* (GOPAL et al., 2005) como *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. vulnificus* e *Vibrio* spp. (MORALES-COVARRUBIAS, 2008). Muitas fazendas de camarão foram atingidas por epidemias de vírus e vibrioses (CHIU et al., 2007) prejudicando o desempenho dos cultivos e causando alterações na aparência física dos camarões e consequentemente na qualidade do produto final.

Em Pernambuco, no litoral, Mendes et al. (2009) avaliando a qualidade microbiológica da água e do camarão provenientes de carciniculturas do litoral de Pernambuco, identificaram várias espécies de vibrios: *V. mediterranei*, *V. mimicus*, *V. fischeri*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. carchariae*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. anguillarum*.

Durante o ano de 2013, algumas cepas de *Vibrio parahaemolyticus* foram relatadas como agente etiológico da síndrome aguda hepatopancreática necrose (AHPNS / ESM) que provocou o colapso da carcinicultura na Ásia (TRAN et al., 2013) e no México (LOMELÍ-ORTEGA; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2014).

Os vibrios estão distribuídos em ambientes aquáticos de diferentes salinidades podendo infectar camarões peneídeos quando são submetidos a situações de estresse (LIGHTNER, 1996). Além disso, podem infectar todas as fases da vida do animal, desde os ovos até reprodutores, provocando na maioria dos casos 100% de mortalidade (HARRIS; OWENS, 1999 e AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2010). Os animais infectados por *Vibrio* spp. apresentam como principais sintomas inflamação e formação de nódulos no órgão linfóide, nas brânquias, no hepatopâncreas, no epitélio cuticular e no tecido conjuntivo, porém podem ser encontradas diferentes sintomas como a bioluminescência, necrose cuticular e mudanças na coloração do exoesqueleto e músculo (ANDERSON et al., 1988).

Para camarões cultivados em águas oligohalinas, de acordo com Yano et al. (2015), existe um grande risco microbiológico por *Aeromonas* os animais podem ser veículo para a transferência de diferentes genótipos de *Aeromonas* resistentes a antibióticos para diferentes regiões do mundo através do comércio. As *Aeromonas* spp. são bactérias gram-negativas comumente encontrados em água doce e ambientes estuarinos (JANDA; ABBOTT, 2010). Elas podem ser isoladas a partir de água, peixes, invertebrados, solo, e alimentos, podendo atuar como agentes patogênicos em seres humanos e animais aquáticos.

A indústria da aquicultura está continuamente buscando meios para manter um ambiente microbiologicamente saudável e melhorar a produção e lucratividade. A presença de bactérias patogênicas no ambiente de cultivo, ou nos camarões tem sido combatida com medidas profiláticas como a utilização de antibióticos. Entretanto, a utilização deste fármaco proporcionou o desenvolvimento de bactérias resistentes (AKINDOWALE et al., 2006). Sendo interesse da indústria da aquicultura o controle ou eliminação do uso de antimicrobianos e o avanço de estudos sobre profiláticos alternativos.

2.2 Probióticos

A palavra probiótico é construída de um termo latino “pro” (para) e de outro grego “bios” que significa vida (ZIVKOVIC, 1999). A primeira definição geralmente aceita para probióticos 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".

Schrezenmeir e De Vrese (2001) consideraram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm micro-organismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alteram, por colonização, a microbiota própria das mucosas do sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde.

Os probióticos contribuem com a saúde do organismo estimulando o sistema imunológico (INOOKA et al., 1986), e pela ação antagonista à micro-organismos

patogênicos, através da produção de metabólitos inibidores da colonização do crescimento destes micro-organismos no trato digestivo ou simplesmente, pela competição por recursos como nutrientes ou espaço (sítios de adesão) (VINE et al., 2006; FARZANFAR, 2006). Diz-se que uma bactéria possui uma atividade probiótica quando, se ingerida viva por um hospedeiro determinado, exerce sobre este um efeito benéfico direto ou indireto (FÜLLER, 1989). A exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada e as elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos (COPOLA; TURNES, 2004).

Uma variedade de bactérias gram-positivas (*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*) e bactérias gram-negativas (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photorhodobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio*) têm sido estudadas e testadas como probióticos (IRIANTO; AUSTIN, 2002).

2.3 Probióticos na aquicultura

A microbiota gastrointestinal de peixes, moluscos e crustáceos é dependente da água, sendo que as bactérias presentes no meio aquático são continuamente ingeridas juntamente com o alimento, demonstrando a influência daquele meio sobre o animal e vice-versa. Deste modo, alguns produtos comerciais atribuem o nome probiótico a produtos para tratar o meio e não para suplementar a dieta dos animais. Esta extensão do conceito de probiótico é pertinente quando os micro-organismos administrados no meio sobrevivem no trato gastrointestinal, caso contrário, os probióticos administrados recebem termos relacionados a sua função como biocontrole, para o tratamento contra patógenos na água ou bioremediação para o tratamento da qualidade da água (GATESOUBE, 1999).

Verschuere et al. (2000) propôs uma aplicação mais ampla do termo “probiótico na aquicultura”, definindo-o 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.

A ação benéfica do uso de um probiótico na aquicultura ocorre através dos melhores índices zootécnicos como: maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar e por meio da redução da colonização intestinal por alguns patógenos e proliferação de micro-organismos benéficos (VERSCHUERE et al. 2000).

O processo de exclusão competitiva ocorre através da produção de compostos inibitórios que são antagônicos em relação aos agentes patogênicos, ou competindo por nutrientes, o que impede o crescimento desses patógenos. O antagonismo bacteriano é um fenômeno comum na natureza e, portanto, interações microbianas desempenham um papel importante no equilíbrio entre os micro-organismos benéficos e potencialmente patogênicos (BALCÁZAR et al, 2006). Dessa forma, na escolha dos probióticos, a capacidade de adesão e, conseqüente, colonização das bactérias no trato gastrintestinal, bem como a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de vibrionáceas devem ser levadas em consideração (CHABRILLÓN et al., 2005).

O uso de probióticos na aquicultura é um tema recente, diante disso, tem-se aumentado consideravelmente as pesquisas visando o controle de doenças, melhoria do desempenho zootécnico e da qualidade da água na aquicultura. Dentre estes podemos citar o uso de probióticos em cultivos de peixes (ROSELET, 2008; SUZER et al., 2008; LEITE, 2009; BARROS, 2012), em raniculturas (DIAS et al., 2008) e em cultivos de camarões (CASTEX et al., 2008; ZHOU, et al. 2009; TSENG et al., 2009; LIU et al., 2009; SHEN, et al., 2010; VIEIRA et al., 2010; ZOKAEIFAR et al., 2014).

Com relação a criação de camarões o uso de probióticos pode ser considerado pois poderá atuar na prevenção de doenças causadas por víbrios como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi* (KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012).

Para atenuar a ação destes micro-organismos os probióticos mais comuns utilizados na aquicultura são compostos de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Vibrio* spp.,

Saccharomyces spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus subtilis* e *Bacillus* spp. (KUMAR et al., 2006), os quais são administrados como alimentos vivos enriquecidos, adicionados à dieta ou na água de cultivo (PANIGRAHIA et al., 2005). O gênero de bactérias lácticas mais amplamente empregado como probióticos em cultivos de organismos marinhos é o *Lactobacillus* sp, mas que foram isolados inicialmente a partir de organismos terrestres (VINE et al., 2006).

Diferentes probióticos para organismos aquáticos foram estudados com resultados muito promissores. O gênero *Bacillus* foi isolado de intestino de *Penaeus monodon* (RENGPIPAT et al., 1998), e algumas espécies deste gênero demonstraram atividade inibidora contra vários agentes patogénicos (SUGITA et al., 1998). Alguns estudos demonstraram que as células de *Bacillus* sp têm uma atividade antibacteriana na prevenção de infecções por *Vibrio* sp e na redução destes nos cultivos (MORIARTY, 1998; VASEEHARAM; RAMASAMY, 2004).

Meurer et al (2007) avaliaram a utilização de levedura *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico em rações para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Castex et al. (2008) estudaram a administração dietética de *Pediococcus acidilactici* o que resultou numa taxa de sobrevivência melhorada em camarão, *Litopenaeus stylirostris*. Liu et al. (2009) demonstraram que o camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, alimentados com uma ração contendo *Bacillus subtilis* E20 tem melhor desempenho do crescimento do que os animais do grupo controle, sem uso deste probiótico. Corroborando, Liu et al. (2010) mostraram que a aplicação da presente estirpe como aditivos de água melhorou a taxa de sobrevivência e a resposta imune em camarão branco. Resultados semelhantes foram relatados por Shen et al. (2010), que observaram que camarões da espécie *L. vannamei* alimentados com uma dieta contendo *B. subtilis* obtiveram melhor desempenho do crescimento e melhor resposta imune do que o grupo controle.

Luis-Villaseñor et al. (2011) estudaram os efeitos de *Bacillus* sp isolados de *L. vannamei* adultos selvagens sob larvas da mesma espécie e observaram uma notável atividade antagonista contra *Vibrio campbelli*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* além de melhorar a sobrevivência de larvas de camarão. Zokaeifar et al. (2012), observaram um maior ganho de peso, taxa de crescimento e conversão alimentar em camarões *L. vannamei*, quando adicionados a água de cultivo a espécie *B. subtilis*.

Muitos estudos relacionados com o efeito dos probióticos no cultivo de animais aquáticos têm sido relatados e vários efeitos benéficos podem ser afirmados como: redução na mortalidade de pós-larvas, aumento da resistência contra doenças, habilidade dos probióticos em aderir-se e colonizar o trato gastrointestinal dos animais causando um efeito antagonista contra patógenos, suplemento a alimentação e como alternativa a utilização de substâncias antimicrobianas como os antibióticos (IRIANTO e AUSTIN, 2002).

Roselet (2008) ressalta que é importante discutir a questão do uso de probióticos comerciais na aquicultura, uma vez que estes podem ser isolados a partir de outros ambientes e dessa forma, introduzindo um micro-organismo exótico ao ambiente de cultivo ou no corpo receptor de seus efluentes. Verschuere et al. (2000) sugeriram o isolamento de micro-organismos probióticos a partir do próprio hospedeiro. Sugita et al. (2002) afirmam que cepas bacterianas isoladas do intestino de juvenis da própria espécie possuem ótimo potencial para ser utilizado como probiótico devido a atividade antimicrobiana, podendo prevenir infecções e enfermidades em água, além de apresentar adaptabilidade muito maior às condições de origem.

Roselet (2008) considera que um micro-organismo capaz de colonizar e dominar um sítio de adesão do organismo hospedeiro, seria um bom candidato para competir com micro-organismos patogênicos, assim como a adição de um determinado grupo de bactérias na água do cultivo poderia competir por nutrientes com possíveis linhagens de bactérias patogênicas (exclusão competitiva).

3- Referências bibliográficas

- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; Sánchez-Martínez, R.; Pérez-Castañeda, R.; Palacios-Monzón, A.; Trujillo-Rodríguez, T.; Cruz-Hernández, N.I. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in American white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal World Aquaculture Society**. n. 48, p. 464–470, 2010.
- AKINDOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of applied Microbiology** v.100. n.5, p. 1103-1113, 2006.
- ANDERSON, I.G.; SHAMSUDIN, M.N.; SHARIFF, M.; NASH, G. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. **Asian Fisheries Science**, v. 2, p. 93-108, 1988.
- BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L., The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**. v. 114, p.173–186, 2006.
- BARRACO, M.A.M. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de los Angeles Peres Lizama. **Sanidade de organismos aquáticos**. Livraria Varela, 2004, p. 51-74.
- BARROS, C. N. Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) 2012. 58p. **Dissertação** (Mestrado). – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S., Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture Nutrition**. v.17, p. 634–644, 2011.
- CASTEX, M.; CHIM, L.; PHAM, D.; LEMAIRE, P.; WABETE, N.; NICOLAS, J-L. et al. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. **Aquaculture**, v. 275, p.182-193, 2008.
- CHABRILLÓN; M.; RICO, R.M.; DÍAZ-ROSALES, P.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on

Vibrio harveyi, a pathogen of farmed Senegalense sole, *Sole senegalensis* (Kaup). **Journal of Fish Diseases**. v. 28, p. 531-537. 2005.

CHIU, C.; GUU, Y.; LIU, C.; PAN, T.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 364 – 377, 2007.

COPOLA, M.M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA C.M.; FRANÇA, F.M. Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. **Archivos zootecnia** v.57 n.220, p. 449-455, 2008.

FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimps aquaculture. **FEMS Immunology and Microbiology** v.48, n.2, p.149-158, 2006.

FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FishStat plus: universal software for fishery statistical time series**. Version 2.3. Rome, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>>. Acesso em: 04 abril 2015.

FRANCO, I.; BAGALDO, A. R.; GIL, L.; OLIVEIRA, E.A.G.; ALBINATI, R.C.B.; COSTA, M.M. Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos de camarões. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.11, n.2, p. 527-536, 2010.

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

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

GESTEIRA, T.C.V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA, 2006. p. 137-158.

GOPAL, S.; OTTA, S.; KUMAR, S.; KARUNASAGAR, I.; NISHIBUCHI, M.; KARUNASAGAR, I. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture

environments; implications for food safety. **Journal Food Microbiology**. v. 102, p. 151–159, 2005

HARRIS, L.J.; OWENS, L. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 38, p. 11–22, 1999.

INOOKA, S., UEHARA, S. AND KIMURA, M. The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. **Poultry Science**. v. 65, p. 1217–1219, 1986.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Review: Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 33–642, 2002.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiological Rev.** v. 23, p. 35-73, 2010.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish & Shellfish Immunology** v.32 p. 170-177, 2012.

KUMAR, R.; MUKHERJEE, S.C.; PRASAD, K.P. e PAL, A.K. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeorohita* (Ham.). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 1215-1221, 2006.

LEITE, M.J.C. Utilização de microorganismos eficazes como probiótico no cultivo da tilápia do Nilo. 2009, 51p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências Agrárias, Areia.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune response in crustacea. **Aquaculture**, 191, p. 121 - 131, 2000.

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

LIU, C.; CHIU, C. S.; HO, P. L.; WANG, S.W. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal Applied Microbiolocal**, v.107, p.1031-1041, 2009.

LIU, K. F.; CHIU, C. H.; SHIU, Y. L.; CHENG, W.; LIU, C. H. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 28 p.837-844, 2010.

LOMELÍ-ORTEGA, C.O.; MARTÍNEZ-DÍAZ, S.F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture**, v. 434, p.208–211, 2014.

LUIS-VILLASEÑOR, I.E.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, M.; GÓMEZ-GIL, B. VALLE, F.A.; CÓRDOVA, A.I.C. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. v.321, p. 136–144, 2011.

MENDES, E. S.; LIRA, S. F.; GÓES, L. M. N. B.; DOURADO, J.; MENDES, P.P; ALVES, C.A.B. *Vibrio* spp. Isolados de camarão e água doce de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.

MERCIER, L.; PALACIOS, E.; CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; HERNÁNDEZ-HERRERA, R.; RACOTTA, I.S. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**, 258, p. 633 – 640, 2006.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; FRECCIA, A.; MAUERWERK, M.T. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-nilo submetidos a desafio sanitário1 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1219-1224, 2007.

MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Enfermedades Bacterianas. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. **Patología e inmunología de camarones penaeidos**. PROGRAMA CYTED ÁREA DE AGROALIMENTACIÓN RED II-D: Red Vannamei. Panamá, 2008. p. 116-133.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164, p.351-358, 1998

NEWAJ-FYZULA, A.H.; AL-HARBI, B.; B. AUSTIN, Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture** v. 431, p.1–11, 2014.

PANIGRAHIA, A.; KIRONA, V.; PUANGKAEWA, J.; KOBAYASHIB, T.; SATOHA, S. e SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a fator influencing the immune response in rain bow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.243, p. 241-254, 2005.

QIAO,G.; XU, D.; WANG,Z.; JANG, I.; QI, Z.; ZHANG, M.; KIM, S. Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum* **Fish & Shellfish Immunology**. v.44, n.1,p. 257-264, 2015.

ROSELET, F.F.G. Isolamento, cultivo e identificação de bactérias com potencial uso probiótico no cultivo de organismos aquáticos: Estudo de caso com bactérias do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). 2008. 61p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

RENGPIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture** v.167, p. 301– 313, 1998.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p. 361-364, 2001.

SHEN, W.Y.; FU, L.L.; LI, W.F.; ZHU, Y. R. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Research** v. 41, p. 1691–1698, 2010.

SUGITA,H.; HIROSE, Y.; MATSUO, N.; DEGUCHI, Y. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture**. v.165, p.269–280, 1998.

SUGITA, H.; OKANO, R.; SUZUKI, Y. Antibacterial abilites of intestinal bacteria from larval and juvenile japonise flounder against fish pathogenes. **Fisheries Science** v.68, p. 1004-1011, 2002.

SUZER, C.; COBAN, D.; KAMACI, H.O.; SAKA, S.; FIRAT, K.; OTGUCUOGLU, O.; KUCUKSARI, H. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus*

aurata, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**. v. 280, p. 140–145, 2008.

TRAN, L.; NUNAN, J., REDMAN, R.M., MOHNEY, L.L., PANTOJA, C.R., FITZSIMMONS, K., LIGHTNER, D.V. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms** v.105, p. 45–55, 2013

TSENG, D.; HO, P.; HUANG, S.; CHENG, S.; SHIU, Y.; CHIU, S.; LIU Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 2, 2009, p. 339-344

VASEEHARAN, B.; LIN, J.; RAMASAMY, P. Effect of probiotics, antibiotic sensitivity, pathogenicity, and plasmid profiles of *Listonellaanguillarum*-like bacteria isolated from *Penaeusmonodon*culture systems. **Aquaculture**, v.241, p.77-91, 2004.

VERSCHUERE,L.; ROMBAUT, G. SORGELVOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 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**, v.62, n.3, p.631-638, 2010.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H. Probiotics in marine laviculture. **FEMS Microbiology Reviews**. v.30, n. 3, p.404-427, 2006.

YANO, Y.; HAMANO, K.; TSUTSUI, I. AUE-UMNEOY, D.; BAM, M.; SATOMI, M. In marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. **Food Microbiology**. v.47, p.21–27, 2015

YINGVILASPRASERT, W.; SUPUNGUL, P.; TASSANAKAJON, A. Rab GTPase-activating protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, is involved in white spot syndrome virus infection. **Development Comparative Immunology**, v.42, p. 302–310, 2013.

ZHANG, Q.; HUANG, J.; LI, F.; LIU, S.; LIU. Molecular characterization, immune response against white spot syndrome virus infection of peroxiredoxin 4 in *Fenneropenaeus chinensis* and its antioxidant activity **Fish Shellfish Immunology**. v.37, p. 38–45, 2014.

ZIVKOVIC, R. Probiotics or microbes against microbes. **Acta Medical Croat**. v.53, p. 23–28, 1999.

ZHOU, X.; WANG, Y.; LI, W. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities **Aquaculture**, v. 287, p.349-353, 2009.

ZOKAEIFAR, H.; BALCÁZAR, J.L.; SAAD, C. R.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K; ARSHAD, A. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* **Fish Shellfish Immunology**. v.33 p. 683–689, 2012.

ZOKAEIFAR, H.; BABAEI, N.; SAAD, C.R.; KAMARUDIN, M.S.; SIJAM, K. BALCAZAR, J.L. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.36, p. 68-74, 2014.

4- Artigo científico

4. 1 - Artigo científico I

Artigo científico a ser encaminhado a Revista Pesquisa
Agropecuária Brasileira

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista.

Atividade antimicrobiana *in vitro* de bactérias intestinais de camarão marinho

Juliana Maria Aderaldo Vidal⁽¹⁾, Maurício Nogueira da Cruz Pessoa⁽¹⁾, Monique Monteiro Pinto⁽²⁾ e Emiko Shinozaki Mendes⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Estrada Fazenda Saco, s/n, Caixa Postal 063, Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. Email: julymav@yahoo.com.br, mauriciopes@yahoo.com.br. ⁽²⁾ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, CEP 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. Email: moniquemont@hotmail.com, esmendes@yahoo.com.br

Resumo – Bactérias probióticas podem ser utilizadas como medida profilática e terapêutica de doenças de camarão marinho, e se forem procedentes do mesmo animal podem proporcionar um uso mais seguro. Objetivou-se avaliar a atividade inibitória *in vitro* de bactérias do intestino de *Litopenaeus vannamei* frente a bactérias patogênicas. Foram isoladas bactérias do intestino de camarão cultivado em águas salgada e em água oligohalina, em períodos chuvoso e seco foram confrontadas com *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas hydrophila*. As bactérias que apresentaram efeito antimicrobiano foram identificadas através de biologia molecular. Vinte e nove isolados apresentaram efeito antagônico a pelo menos um dos patógenos testados. A espécie mais frequente foi *Bacillus cereus*, produzindo os maiores halos de inibição frente ao *V. alginolyticus* e *V. vulnificus*. A bactéria *Citrobacter freundii*, proveniente de água oligohalina apresentou o melhor efeito antimicrobiano, perante os quatro patógenos e as espécies *Enterococcus hirae* e *Enterococcus* spp., provenientes de camarões de água salgada apresentaram efeito inibitório aos três patógenos testados. As bactérias isoladas e identificadas apresentaram efeito antimicrobiano

frente aos principais patógenos de camarão marinho, sendo seguro seu uso como probiótico, pois foram capazes de aderir ou colonizar o intestino dos camarões.

Termos para indexação: *Litopenaeus vannamei*, antagonismo, probióticos.

***In vitro* antimicrobial activity of intestinal bacteria to marine shrimp**

Abstract - Bacteria probiotic can be used as prophylactic and as therapeutic marine shrimp diseases and it is believed that, if proceeding from same animal may provide a safer use. The objective was to evaluate the inhibitory activity *in vitro* of bacteria from the intestines of *Litopenaeus vannamei* against the pathogenic bacteria. Intestinal bacteria were isolated from challenged shrimp in saltwater and oligohaline water in dry and rainy seasons, and confronted with *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila*. Bacteria showed antimicrobial effect have been identified by molecular biology. Twenty-nine isolates showed antagonistic effect to at least one of the tested pathogens. The species most prevalent was *Bacillus cereus* strain, the presented of the largest zones of inhibition against *V. alginolyticus* and *V. vulnificus*. The bacterium *Citrobacter freundii* strain, from oligohaline water showed the best antimicrobial effect before the four pathogens and species *Enterococcus hirae* and *Enterococcus* spp., from saltwater shrimp showed inhibitory effect to the three tested pathogens. The bacteria isolated and identified showed antimicrobial effect opposite to the main marine shrimp pathogens, and secure its use probiotic because they were able to adhere to or colonize the intestine of shrimp.

Index terms: *Litopenaeus vannamei*, antagonistic, probiotics.

Introdução

A carcinicultura brasileira é baseada principalmente no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), cuja produção tem apresentado crescimento,

principalmente em águas interiores, devendo-se à oferta de ração de boa qualidade e ao estudo e domínio do seu ciclo reprodutivo. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2014), a produção mundial de *L. vannamei* em 2012 foi de 3.178.721,10 toneladas, o Brasil, a produção desta espécie foi de aproximadamente 71.000 t. Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2013), cerca de 28% das fazendas brasileiras têm captação de água utilizando poços, açudes ou rios com características de água oligohalinas e são responsáveis por 25,06% da produção nacional.

O desempenho da carcinicultura pode ser afetado devido a uma série de fatores que causam estresse aos camarões, tais como extremos de temperatura e pH, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, saturação de gases, mudanças abruptas na salinidade e presença de substâncias consideradas tóxicas (Le Moullac & Haffner, 2000). Mudanças bruscas no ambiente debilitam o sistema de defesa do camarão, devido ao gasto de energia na sua adaptação às novas condições (Franco et al., 2010). Nestas circunstâncias, os camarões tornam-se susceptíveis a patógenos oportunistas, que poderiam prejudicar sua saúde causando impactos negativos nos cultivos.

Dentre os principais agentes causadores das doenças, destacam-se as bactérias, as quais são capazes de desencadear infecções primárias e/ou secundárias (oportunistas). De acordo com Giraud et al. (2006), a presença desses patógenos tem sido combatida com a utilização de antibióticos, cujo uso indiscriminado proporcionou o desenvolvimento de bactérias resistentes (Thuy et al., 2011). Neste sentido, existe um interesse crescente da indústria da aquicultura no controle ou eliminação do uso de antimicrobianos e no avanço de estudos sobre métodos profiláticos alternativos.

Uma medida para se controlar o aparecimento de micro-organismos patogênicos em ambientes de cultivo, além de permitir a redução do uso de antibióticos, é a utilização de probióticos (Balcázar et al., 2006). Tais micro-organismos podem contribuir com a saúde do

organismo pela ação antagonista, através da produção de metabólitos inibidores da colonização e do crescimento de patógenos no trato digestivo, ou simplesmente, pela competição por recursos como nutrientes ou espaço (sítios de adesão) (Farzanfar, 2006). Sendo assim, os probióticos afetam de forma benéfica o seu consumidor, através da melhoria do equilíbrio microbiano gastrointestinal, além de melhorar o apetite e possibilitar um maior crescimento e melhor conversão alimentar (Newaj-Fyzul et al., 2014).

Vários estudos têm sido desenvolvidos nos últimos anos sobre a importância do uso de probióticos comerciais em cultivos de camarão (Balcazar et al., 2007; Liu et al., 2010; Kongnum & Hongpattarakere, 2012). No entanto, os probióticos utilizados comercialmente podem trazer problemas, tanto pela falta de dados de certos produtos utilizados, como por não conhecimento da sua composição. Muitos são isolados a partir de outros ambientes, acarretando a introdução de um micro-organismo exótico ao ambiente de cultivo ou no corpo receptor de seus efluentes (Roselet, 2008).

De acordo com Sugita et al. (2002), bactérias isoladas do intestino de juvenis da própria espécie possuem um grande potencial para ser utilizado como probiótico, por apresentar adaptabilidade muito maior às condições de origem. Sendo assim, Balcazar et al. (2006) sugeriram o isolamento de micro-organismos probióticos a partir do próprio hospedeiro. Nesse sentido, objetivou-se isolar bactérias com potencial probiótico do intestino de *Litopenaeus vannamei* cultivados em água oligohalina e salgada avaliando-se a atividade inibidora *in vitro* frente a bactérias patogênicas.

Material e Métodos

O material biológico utilizado foi obtido a partir de amostras de camarão marinho, cultivado em água salgada de uma fazenda comercial localizada no litoral em Goiana-PE, de água oligohalina, no semi-árido provenientes da Base de Aquicultura do Instituto Agrônomo

100 de Pernambuco, estação Serra Talhada-PE, sem usos de probióticos e animais aparentemente
101 sadios.

102 As coletas foram realizadas em diferentes ciclos de cultivo. Os camarões cultivados
103 em água salgada foram coletados no período chuvoso de julho a setembro de 2011 e período
104 seco de outubro a dezembro de 2011, com precipitações acumuladas de 781,9 mm e 315,4
105 mm (INMET, 2014), temperatura de $27,1 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ e $28,8 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$, salinidade $22,02 \pm 2,57\text{g/L}$ e
106 $28,7 \pm 3,6\text{ g/L}$, pH $8,1 \pm 0,6$ e $8,35 \pm 0,4$, oxigênio dissolvido $3,1 \pm 0,8\text{mg/L}$ e $4,25 \pm 0,38\text{mg/L}$,
107 respectivamente.

108 Nos cultivos em água oligohalina as coletas foram realizadas no período chuvoso de
109 janeiro a março de 2012, e no período seco de julho a setembro de 2013, com precipitações
110 acumuladas de 324,6 mm e 57,7 mm (IPA, 2014), temperatura de $27,09 \pm 1,88^{\circ}\text{C}$ e
111 $29,80 \pm 1,88^{\circ}\text{C}$, salinidade $0,89 \pm 0,01\text{g/L}$ e $0,98 \pm 0,01\text{g/L}$, pH $8,02 \pm 0,6$ e $8,2 \pm 0,8$ e oxigênio
112 dissolvido de $5,10 \pm 0,88\text{mg/L}$ e $7,17 \pm 1,74\text{mg/L}$, respectivamente.

113 Em cada ciclo de cultivo realizaram-se cinco coletas, a primeira com 30 dias de
114 cultivo e depois a cada 15 dias, obtendo-se dez amostras de camarões em cada coleta.

115 De cada camarão, foi retirado o intestino sob condições assépticas, macerado e
116 adicionado em Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubado por 24 horas em estufa a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$.
117 As culturas em TSB, foram semeadas em placas por técnica de esgotamento por estrias em
118 meio Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) e em meio não seletivo Plate Count Ágar (PCA) e
119 incubadas a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ de 24 a 36 horas.

120 Após o desenvolvimento das bactérias, os diferentes morfotipos foram caracterizados
121 e as colônias purificadas. Os isolados puros foram estocados em criotubos com caldo
122 glicerinado e armazenados a -80°C para análise posterior.

123 Executaram-se testes de antagonismo, *in vitro*, para avaliar a produção de metabólitos
124 com capacidade antimicrobiana. Nesses testes, as bactérias foram confrontadas com três

patógenos para camarão, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562) e *Vibrio alginolyticus* (IAL 1957). Adicionalmente, as bactérias isoladas de camarão cultivado em água oligohalina, também foram confrontadas com *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36).

O teste de antagonismo *in vitro* foi realizado de acordo com o descrito por Balcázar & Luna (2007), com adaptações, onde de cada isolado foi realizada uma suspensão em solução salina 0,85%, ajustada à escala 0,5 de MacFarland. A suspensão foi semeada em superfície de ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) e Plate Count Ágar (PCA), as placas foram incubadas por 24 h a 36°C. Em seguida, foram feitos discos do ágar (6 mm de diâmetro), impregnados pela bactéria teste, e colocados invertidos na superfície de ágar Mueller-Hinton recém semeado por patógeno. Os testes foram realizados em triplicata com controle negativo do meio MRS ou PCA. 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, onde não se observava o crescimento do micro-organismo patogênico. Os diâmetros dos halos foram mensurados (mm) com o auxílio de paquímetro, subtraindo-se o diâmetro dos discos de ágar.

As bactérias com atividade antimicrobiana foram identificadas através de biologia molecular. Para extração e purificação do DNA foi utilizado o kit Maxwell® 16 Cell DNA Purification, seguindo o protocolo do fabricante. Os fragmentos de rDNA 16S foram amplificados por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), usando, os *primers* p27f e p1093r. Os resultantes da PCR (*amplicons*) foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, conforme protocolo do fabricante, e submetidos ao sequenciamento automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram organizadas no formato FASTA e processadas pelo programa MEGA v. 5.2 (Tamura et al., 2011), onde foram criados arquivos com os bancos de

dados locais de nucleotídeos. Posteriormente, foram montados *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparados com as sequências de rDNA 16S de organismos representados na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que permitiu inferir à espécie ao qual a amostra analisada pertencia. Admitiram-se níveis de identidade de sequência acima de 95%.

Para verificar se houve diferença na proporção de isolados com caráter probiótico entre água salgada e água oligohalina, bem como entre os períodos seco e chuvoso foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2), ao nível de significância de 5%. Para averiguar a diferença da ação dos potenciais probióticos (tamanho dos halos de inibição) realizou-se análise de variância (ANOVA). Para avaliar a homogeneidade das variâncias utilizou-se o teste de Cochran e quando necessário utilizou-se transformação logarítmica $\ln(x + 1)$. Para análise comparativa das médias das variáveis, foi utilizado o Teste de Tukey, sendo todas as conclusões tomadas ao nível de significância de 5%. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o Software SISVAR® 5.3 Build 77.

Resultados e Discussão

Foram obtidos 244 isolados bacterianos puros do intestino de camarões marinho, sendo 162 isolados de camarões de água oligohalina e 82 de água salgada. Do total 29 apresentaram potencial probiótico a pelo menos um dos patógenos analisados (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Aeromonas hydrophila*), sendo 20 provenientes de camarão de água oligohalina e nove de água salgada.

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na proporção de isolados com caráter probiótico entre os provenientes de camarão de água oligohalina e de água salgada, demonstrando que no presente estudo foi possível isolar uma maior proporção de bactérias potenciais probióticas de camarão de água oligohalina.

A alta salinidade, provavelmente foi um fator inibitório para o desenvolvimento de algumas espécies bacterianas com potencial probiótico no presente estudo. De acordo com Cottrell & Kirchman (2004), existe uma relação entre a abundância de determinados grupos de bactérias ao longo de um gradiente salino, podendo haver um crescimento bacteriano lento em condições de alta salinidade.

Dos isolados a partir de camarões de cultivo em água oligohalina, 55 (33,96%) foi no período seco, e 107 (66,04%) no período chuvoso, dos quais dez isolados do período seco e dez do período chuvoso apresentaram potencial probiótico o que representou 18,18% e 9,35%, respectivamente, dos isolados de cada período. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) na proporção de isolados bacterianos com caráter probiótico de cada período havendo uma maior proporção de bactérias com potencial probiótico em camarões no período seco. O fator temperatura pode ter influenciado, de acordo com Pelczar et al. (1997), a temperatura possui uma grande influência no crescimento dos micro-organismos, que podem crescer em uma ampla faixa de temperatura variando de uma espécie para outra. Desse modo, a temperatura elevada da água dos viveiros em média de $29,80 \pm 1,88^{\circ}\text{C}$, pode ter influenciado na maior ocorrência de isolados bacterianos com potencial probiótico em camarões de água oligohalina no período seco.

Das bactérias isoladas de camarões de cultivo em água salgada, 50 (60,9%) foram no período seco, sendo cinco com potencial probiótico o que representou 10% dos isolados e 32 (39,01%) do período chuvoso, em que quatro foram potencialmente probióticos, representando 12,5% dos isolados deste período. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na proporção de isolados bacterianos com caráter probiótico de cada período, sendo maior a proporção no período chuvoso, onde a média de precipitação acumulada para o período foi de 781,0mm, enquanto no período de estio foi de 315,4mm. Em períodos chuvosos, ocorre a

diluição das águas pluviais e a salinidade da água do viveiro tende a diminuir o que pode acarretar uma variação quantitativa e qualitativa de bactérias (COSTA et al., 2009).

Os diâmetros dos halos de inibição produzidos por cada isolado bacteriano com potencial probiótico frente aos patógenos testados, são apresentados na Tabela 1. Observa-se que 21 (72,41%) dos 29 isolados, apresentaram efeito antimicrobiano frente ao patógeno *V. parahaemolyticus*, com halos de inibição médios entre $4,33 \pm 0,95$ e $17,47 \pm 0,11$.

O poder antagônico frente ao *V. vulnificus* foi observado em 20 isolados (68,96%) apresentando halos de inibição médios entre $2,57 \pm 0,75$ a $21,33 \pm 0,58$, sendo os maiores halos formados pelos isolados 9, 3, 21, porém sem diferença significativa ($P \geq 0,05$).

Apenas 37,93% dos isolados com caráter probiótico apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *V. alginolyticus*, com halos de inibição entre $3,26 \pm 0,40$ a $25,17 \pm 0,76$, sendo o maior halo de inibição produzido pelo isolado 21.

Somente 40% dos isolados com caráter probiótico de água doce apresentaram efeito antimicrobiano frente a *A. hydrophila*. Foram observados halos com diâmetros médios entre $3,97 \pm 0,74$ e $12,03 \pm 0,64$, sendo o isolado 9 o que apresentou maior halo de inibição.

Os diâmetros médios dos halos observados no presente estudo estão de acordo com os reportados na literatura. Luis-Villaseñor et al. (2011) ao avaliarem o potencial probiótico de *Bacillus* isolados a partir do intestino de *L. vannamei*, observaram halos de inibição com diâmetros médios entre $4,6 \pm 0,8$ e $21,9 \pm 1,6$ mm contra *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, no entanto, o *V. alginolyticus* mostrou-se apenas sensível aos *Bacillus* não apresentando halos de inibição. Barros (2012) isolou bactérias com potencial probiótico de intestino de *Rachycentron canadum* e verificou que estas produziram halos de inibição com diâmetros médios entre $3,00 \pm 0,15$ e $23,13 \pm 0,23$ mm contra os patógenos *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *A. hydrophila*. Balcázar et al. (2007) ao avaliar o potencial probiótico de bactérias

isoladas a partir do trato gastrointestinal de adultos de *L. vannamei* obtiveram halos de inibição com diâmetros entre 8 e 12 mm contra *V. parahaemolyticus*.

Foram identificadas doze espécies de micro-organismos: *Bacillus cereus* strain, *Citrobacter freundii* strain, *Enterobacter cloacae* ssp. *Dissolvens* strain, *Enterococcus hirae*, *Enterobacter* sp, *Morganela morgani* strain, *Lactococcus garviae* strain, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lysnibacilus sphaericus* strain, *Enterococcus canintestini* strain, *Enterococcus* spp, *Bacilus anthracis* strain. Foi verificado que apesar de algumas espécies serem geneticamente iguais, ocorrendo repetidamente, a maioria apresentou diferenças em suas atividades antimicrobiana, o que pode estar relacionado com as diferenças entre as expressões de proteínas devido a uma possível mutação genética. De acordo com Azevedo (2008), micro-organismos da mesma espécie podem sofrer mutações diferentes e recombinação genética, podendo adquirir genes de resistência, virulência e se comportarem de formas diferentes. A grande variabilidade dentro da mesma espécie mostra que apesar do material genético ser o mesmo, ele nem sempre produz o mesmo fenótipo, isso porque as alterações na sequência de nucleotídeos, altera o encadeamento de aminoácidos na cadeia polipeptídica codificado pelo gene, levando a uma alteração fenotípica.

A espécie *Bacillus cereus* foi a de maior ocorrência entre os potenciais probióticos, sendo identificada em 11 isolados bacterianos e encontrada tanto em água oligohalina, quanto em água salgada, nos dois períodos do ano, seco e chuvoso. Ressalta-se que o 21, isolado de água salgada no período chuvoso, foi o que formou os maiores halos frente a *V. alginolyticus* e *V. vulnificus*, com diâmetros médios de $25,17 \pm 0,76$ e $21,33 \pm 0,58$ mm, respectivamente.

A atividade antimicrobiana do *Bacillus cereus* também foi observada por Ravi et al. (2007) frente ao *Vibrio* spp. e *Vibrio harveyi* em larvas de camarões, tanto *in vitro* como *in vivo*. A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como probiótico, tem crescido devido ao aumento do número de estudos demonstrando a sua atividade antimicrobiana e exclusão

competitiva. De acordo com Cutting (2011), o uso destas bactérias como probióticos na aquicultura, proporciona o aumento do crescimento e resistência de camarões cultivados a doenças e tem mostrado atividade inibitória contra vários patógenos. Além de serem capazes de crescer no interior do trato intestinal e possivelmente colonizarem exercendo uma atividade simbiótica com o hospedeiro.

Ringo et al. (2010) citaram que bactérias do gênero *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp e *Bacillus* spp estão entre os grupos de probióticos mais indicados para a aquicultura. De acordo com Fuller (1989), as bactérias ácido-láticas são utilizadas como probióticos devido a sua capacidade de produção de compostos antibacterianos, como: bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácido lático. No presente estudo, bactérias ácido-láticas foram identificadas e apresentaram efeito antimicrobiano frente a pelo menos um dos patógenos testados. A espécie *Lactococcus garviae*, foi identificada em quatro isolados e o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* apenas em um, ambas espécies apresentaram efeito antagônico frente a *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*. A ação antagonista do *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* frente a estes patógenos também foi observada por Barros (2012).

No presente estudo, foram identificadas bactérias da família das Enterobacteriaceae, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* subsp. *Dissolvens* strain, *Enterobacter* spp, e *Morganella morganii*. Segundo Jack et al. (1995), não é comum relatos de bactérias dessa família como sendo capazes de produzir substâncias inibitórias, as chamadas bacteriocinas. No entanto, há registro da espécie *Citrobacter freundii* como potencial probiótico para tilápia (*Oreochromis niloticus*) inibindo a ação de *A. hydrophila* (Aly et al., 2008). A bactéria *Citrobacter freundii* (ILO9) conseguiu inibir todos os patógenos testados, destacando-se um maior halo frente ao *V. vulnificus*, conferindo o melhor desempenho entre todos os isolados provenientes de água oligohalina. O ILO2, também identificado como *Citrobacter freundii* apresentou potencial probiótico a três patógenos, dentre os quatro testados.

As bactérias *Enterobacter cloacae* ssp. *Dissolvens strain*, isolado 3 e *Enterobacter* spp. isolado 16 apresentaram efeito probiótico frente a três patógenos dentre os quatro testados, sendo que a *Enterobacter* spp. conferiu o melhor efeito antimicrobiano frente ao *V. parahaemolyticus*. Dentre os isolados de água oligohalina, o *Enterobacter* spp. foi o que apresentou o maior halo de inibição frente ao *V. alginolyticus*. Sendo assim, no presente estudo pode-se comprovar que bactérias da família das Enterobacteriaceae possuem um grande potencial probiótico, tendo em vista o bom desempenho diante dos patógenos testados.

O estudo aprofundado sobre o uso de probióticos é essencial para melhorar os cultivos de camarão marinho. Os resultados deste estudo mostram o efeito antimicrobiano de bactérias isoladas do próprio hospedeiro. Vale ressaltar que os micro-organismos probióticos, devem ser isolados a partir do próprio hospedeiro (Balcázar et al., 2006), sendo mais adequado, porque estas bactérias benéficas já são adaptadas a suportar condições extremas no trato digestivo e facilmente aderem à superfície intestinal, colonizando as células epiteliais do intestino (Sugita et al., 2002; Caipang et al., 2010).

Sugere-se que estudos *in vivo* sejam realizados, de modo a avaliar a efetividade dessas bactérias em condições de cultivo e seus efeitos, para que possam ser utilizadas como medida profilática e terapêutica de doenças de camarão marinho, proporcionando uma maior segurança no uso em cultivos tanto em água oligohalina como salgada.

Conclusão

1. As bactérias isoladas e identificadas apresentaram efeito antimicrobiano frente aos principais patógenos de camarão marinho e por fazerem parte da microbiota natural dos camarões, possibilita maior segurança no uso destes micro-organismos como probióticos, já que foram capazes de aderir ou colonizar o intestino dos camarões.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), pelo auxílio financeiro.

As Fazendas Marimar e Catuama pelo fornecimento de camarões.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) por ceder instalações físicas e funcionários para o cultivo em água oligohalina.

Referências

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. O censo da carcinicultura nacional em 2011. Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarões, ano XV, n. 1, p. 24-28. Janeiro 2015.

ALY, S.M.; MOHAMED, F.M.; JOHN, G. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 647-656, 2008.

AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: Editora UFG, 2008. 536p.

BALCAZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L., The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**. v. 114, p.173–186, 2006.

BALCÁZAR, J.L.; LUNA, T.R. Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Current Microbiology**. v.55, p. 409–412, 2007

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*)

- 322 following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus* **Journal of Invertebrate**
323 **Pathology**. v.96, p.147–150, 2007.
- 324 BARROS, C.N. Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá
325 (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) 2012. 58p. **Dissertação** (Mestrado). – Universidade
326 Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- 327 CAIPANG, C.M.A.; KULKARNI, A.; KIRON, V. Physiological responses of a cold-water
328 shrimp, *Pandalus borealis* to bacterial lipopolysaccharide and synthetic double-stranded
329 RNA, poly I: C. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 409, p. 180-185,
330 2011.
- 331 COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. Single-cell analysis of bacterial growth, cell size, and
332 communitary structure in the Delaware estuary. **Aquatic Microbial Ecology**, v.34, p. 139-
333 149, 2004.
- 334 CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, p. 214-220, 2011.
- 335 COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. VIBRIO EM
336 AMOSTRAS DE ÁGUA DE VIVEIROS DE CULTIVO DO CAMARÃO MARINHO
337 LITOPENAEUS VANNAMEI, NO CEARÁ-BRASIL. **Atlântica**, v. 31, n. 2, p. 177-182,
338 2009.
- 339 FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimps aquaculture. **FEMS Immunology and**
340 **Microbiology** v.48, n.2, p.149-158, 2006.
- 341 FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FishStat plus: universal software for**
342 **fishery statistical time series**. Version 2.3. Rome, 2014. Disponível em:
343 <<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>>. Acesso em: 27 julho 2014.
- 344 FRANCO, I.; BAGALDO, A.R.; GIL, L.; OLIVEIRA, E.A.G.; ALBINATI, R.C.B.; COSTA,
345 M.M. Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados

- 346 bacterianos de camarões. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.11, n.2, p.
347 527-536, 2010.
- 348 FULLER, R. Probiotics in man and animals, a review. **Journal Applied Bacteriology**. v. 66,
349 p. 365–378. 1989.
- 350 GIRAUD, E.; DOUET, D.G.; LE BRIS, H.; BOUJU-ABERT, A.; DONNAY-MORENO, C.;
351 IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Review: Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**.
352 v.25, p. 33–642, 2006.
- 353 INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Banco de Dados**
354 **Meteorológicos de Ensino e Pesquisa**. 2014. Disponível em:
355 <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em 18 de Novembro.
356 2014.
- 357 IPA- INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. **Arquivos do Banco de Dados**
358 **Pluviométricos da Estação Experimental de Serra Talhada**. Serra Talhada, 2014.
- 359 JACK, R.; TAGG, J.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological**
360 **Reviews**, v. 59, p-171-200, 1995.
- 361 KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated
362 from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus*
363 *vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish & Shellfish Immunology** v.32 p. 170-177,
364 2012.
- 365 LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune response in
366 crustacea. **Aquaculture**, 191, p. 121 - 131, 2000.
- 367 LIU, K.F.; CHIU, C.H.; SHIU, Y.L.; CHENG, W.; LIU, C.H. Effects of the probiotic,
368 *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of
369 white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 28 p.837-
370 844, 2010.

- 371 LUIS-VILLASEÑOR, I.E.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, M.; GÓMEZ-GIL, B. Valle, F.A.;
372 Córdova, A. I. C. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of
373 *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. V.321, p. 136–144, 2011.
- 374 NEWAJ-FYZULA, A.H.; AL-HARBI, B.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of
375 probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture** v. 431, p.1–11, 2014.
- 376 PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**.
377 v. 1. 1997. 524p.
- 378 ROSELET, F.F.G. Isolamento, cultivo e identificação de bactérias com potencial uso
379 probiótico no cultivo de organismos aquáticos: Estudo de caso com bactérias do trato
380 gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). 2008. 61p.
381 **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- 382 RAVI, A.V.; MUSTHAFA, K.S.; JEGATHAMMBAL, G.; KATHIRESAN, K.; PANDIAN,
383 S.K. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrio*
384 in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.219- 223, 2007.
- 385 RINGO, E.; LOVMO, L.S.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.;
386 MYKLEBUST, R.; OLSEN, R. E.; MAYHEW, T. M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in
387 the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**. v. 41, p. 451-467, 2010.
- 388 SUGITA, H.; OKANO, R.; SUZUKI, Y. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from
389 larval and juvenile japonise flounder against fish pathogens. **Fisheries Science** v.68, p. 1004-
390 1011, 2002.
- 391 THUY, H.T.T.; NGA, L.P.; LOAN, T.T.C. Antibiotic contaminants in coastal wetlands from
392 Vietnamese shrimp farming. **Environmental Science and Pollution Research International**
393 v.18, p. 835–841, 2011.
- 394 TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S.
395 MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

396 Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and**
 397 **Evolution** v. 28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

Tabela 1 - Diâmetros médios ($\pm$ DP) dos halos de inibição produzidos por bactérias com características probióticas isoladas do intestino de camarão marinho *Litopennaeus vannamei* frente a patógenos.

Pontenciais Probióticos		Diâmetros médios dos halos de inibição (mm)				
Isolado	Identificação	Procedência	VA	VV	VP	AH
1	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOC	-	12,2 $\pm$ 1,42 ^{c*A**}	4,33 $\pm$ 0,95 ^{aB}	5,53 $\pm$ 0,65 ^{aB}
2	<i>Citrobacter freundii</i> strain	AOC	3,26 $\pm$ 0,40 ^{aA}	5,5 $\pm$ 1,50 ^{bB}	-	4,06 $\pm$ 0,42 ^{aA}
3	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> strain	AOC	6,43 $\pm$ 1,45 ^{bA}	6,43 $\pm$ 1,76 ^{bA}	9,77 $\pm$ 3,84 ^{cB}	-
4	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOC	-	11,53 $\pm$ 1,07 ^{cB}	4,33 $\pm$ 0,95 ^{aA}	5,53 $\pm$ 0,65 ^{aA}
5	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOC	-	-	6,93 $\pm$ 0,58 ^{bA}	-
6	<i>Enterococcus hirae</i>	AOC	6,27 $\pm$ 4,10 ^{bA}	-	6,8 $\pm$ 1,06 ^{bA}	-
7	<i>Enterobacter</i> sp.	AOC	6,47 $\pm$ 0,76 ^{bA}	-	6,87 $\pm$ 2,35 ^{bA}	-
8	<i>Morganella morganii</i> strain	AOC	-	3,33 $\pm$ 0,99 ^{aA}	6,20 $\pm$ 1,11 ^{bB}	4,33 $\pm$ 0,58 ^{aA}
9	<i>Citrobacter freundii</i> strain	AOC	15,7 $\pm$ 2,02 ^{cA}	21,6 $\pm$ 3,67 ^{dB}	11,27 $\pm$ 0,60 ^{dA}	12,03 $\pm$ 0,64 ^{cA}
10	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOC	-	6,60 $\pm$ 1,04 ^{bA}	-	7,40 $\pm$ 0,35 ^{bA}
11	<i>Lactococcus garviae</i> strain	AOS	-	-	12,70 $\pm$ 1,85 ^{dA}	-
12	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOS	-	-	10,10 $\pm$ 1,73 ^{cA}	-
13	<i>Lactococcus garviae</i> strain	AOS	-	18,13 $\pm$ 1,20 ^{dA}	-	-
14	<i>Lactococcus garviae</i> strain	AOS	-	5,03 $\pm$ 0,30 ^{bA}	12,60 $\pm$ 0,85 ^{dB}	-
15	<i>Enterobacter</i> sp.	AOS	-	-	5,37 $\pm$ 1,70 ^{aA}	-
16	<i>Enterobacter</i> sp.	AOS	18,3 $\pm$ 2,44 ^{cB}	-	17,47 $\pm$ 0,11 ^{dB}	7,47 $\pm$ 0,97 ^{bA}
17	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain	AOS	-	2,57 $\pm$ 0,75 ^{aA}	14,47 $\pm$ 1,85 ^{dB}	-
18	<i>Lactococcus garviae</i> strain	AOS	-	-	13,03 $\pm$ 4,13 ^{dA}	-
19	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOS	-	9,30 $\pm$ 3,05 ^{cB}	-	3,97 $\pm$ 0,74 ^{aA}
20	<i>Bacillus cereus</i> strain	AOS	-	8,37 $\pm$ 2,26 ^{cA}	9,57 $\pm$ 0,67 ^{cA}	-
21	<i>Bacillus cereus</i> strain	ASC	25,17 $\pm$ 0,76 ^{dA}	21,33 $\pm$ 0,58 ^{dA}	-	ND
22	<i>Bacillus cereus</i> strain	ASC	5,47 $\pm$ 0,42 ^{bA}	8,63 $\pm$ 1,14 ^{cB}	-	ND
23	<i>Enterococcus canintestini</i> strain	ASC	-	7,90 $\pm$ 0,40 ^{cA}	-	ND
24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	ASC	-	8,83 $\pm$ 2,57 ^{cA}	8,33 $\pm$ 0,58 ^{cA}	ND
25	<i>Enterococcus hirae</i>	ASC	3,87 $\pm$ 0,91 ^{aA}	9,27 $\pm$ 0,25 ^{cC}	5,00 $\pm$ 2,00 ^{aB}	ND
26	<i>Bacillus cereus</i> strain	ASS	-	7,40 $\pm$ 0,53 ^{cA}	-	ND
27	<i>Enterococcus</i> sp.	ASS	6,27 $\pm$ 0,55 ^{bA}	9,40 $\pm$ 0,66 ^{cA}	5,33 $\pm$ 1,53 ^{bB}	ND
28	<i>Bacillus cereus</i> strain	ASS	4,17 $\pm$ 0,74 ^{aA}	-	4,33 $\pm$ 0,58 ^{aA}	ND
29	<i>Bacillus anthracis</i> strain	ASS	-	8,70 $\pm$ 0,70 ^{cA}	11,03 $\pm$ 1,42 ^{cA}	ND

Em que: DP = Desvio Padrão; ⁽¹⁾ *Vibrio alginolyticus* (IAL 1957); ⁽²⁾ *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562); ⁽³⁾ *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802); ⁽⁴⁾ *Aeromonas hydrophila* (IOC/FDA 110-36); *Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05); ** Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05); AOC = Água oligohalina, período chuvoso; AOS = Água oligohalina, período seco; ASC = Água salgada, período chuvoso; ASS = Água salgada, período seco; ND = Não houve desafio; - = Não apresentaram halos de inibição.

4. 2- Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB

Diretrizes para Autores

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.

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.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meio de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).

O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.

O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo;

Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.

Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.

Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.

Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: 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; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da relevância relativa. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.

Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/about/submissions#authorGuidelines>

4. 3 - Artigo científico II

Artigo científico a ser encaminhado a Revista Caatinga.

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista.

AVALIAÇÃO DE POTENCIAL PROBIÓTICO FRENTE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR VÍBRIOS EM PÓS-LARVAS DE CAMARÃO MARINHO¹

JULIANA MARIA ADERALDO VIDAL^{*2}, MAURÍCIO NOGUEIRA DA CRUZ
PESSÔA², PAULO DE PAULA MENDES³, EMIKO SHINOZAKI MENDES⁴

RESUMO – *Bacillus* spp. têm sido utilizados contra bacterioses que acometem camarão marinho cultivado, proporcionando efeito benéfico sobre o hospedeiro, alterando a comunidade microbiana intestinal e melhorando índices zootécnicos. Objetivou-se avaliar os efeitos de uma dieta suplementada com *Bacillus cereus*, bactéria com potencial probiótico em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* cultivados em laboratório. O experimento teve duração de quinze dias e consistiu de seis tratamentos: T₁- controle, T₂ – somente com probiótico, T₃ - com *Vibrio parahaemolyticus* (VP), T₄ – com probiótico e com VP, T₅ – com *V. alginolyticus* (VA) e T₆ – com probiótico e com VA. Foram avaliados a sobrevivência, o ganho de peso, a capacidade de colonização das bactérias probióticas, contagem de patógenos e lesões histopatológicas. Não foi verificada diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos na sobrevivência. Os grupos desafiados com patógenos e sem uso de probióticos foram os que apresentaram menor ganho de peso. Na contagem de *B. cereus*, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos T₂, T₄ e T₆, observando-se que o probiótico competiu melhor por espaço e nutrientes quando confrontado com *V. parahaemolyticus* do que com *V. alginolyticus*. Os animais alimentados com ração suplementada de probiótico, apresentaram contagem inferior daqueles alimentados sem o uso ($P < 0,05$). Não foram observadas lesões histopatológicas nos órgãos e tecidos dos animais. O *Bacillus cereus* demonstrou uma alta

*Autor para correspondência

¹ Resultado de Tese de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, UFRPE

²Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UAST/UFRPE, Caixa Postal 063, CEP 56900-000, Serra Talhada (PE), Brasil. Email: julymav@yahoo.com.br

³Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171 - 37 900, Recife/PE.

⁴Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171 - 37 900, Recife/PE.

capacidade de colonizar pós-larvas de camarão, causando uma diminuição significativa de patógenos, provavelmente pela secreção de substâncias antimicrobianas e/ou por exclusão competitiva, o que significa que o *B. cereus* é uma bactéria probiótica.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, *Bacillus cereus*, infecção experimental

EVALUATION OF PROBIOTIC POTENCIAL AGAINST OF EXPERIMENTAL INFECTION BY VÍBRIOS IN MARINE SHRIMP POST-LARVAE

ABSTRACT- *Bacillus* spp. have been used against bacterial diseases that affect marine shrimp farming, provided beneficial effect on the host, altering the intestinal microbial community and improving performance indexes. The objective was to evaluate the effects of a diet supplemented with *Bacillus cereus*, as probiotic in post-larvae of *Litopenaeus vannamei* cultured in the laboratory. The experiment lasted fifteen days and consisted of six treatments: T1 control, T2 - using probiotic, T3 - *Vibrio parahaemolyticus* (VP), T4 - probiotic and VP, T5 - *V. alginolyticus* (VA) and T6 - probiotic and VA. We evaluated the survival, weight gain, the colonization capacity of the probiotic bacteria, pathogens counting and histopathologic lesions. The results showed no significant difference ($P \geq 0,05$) in survival between treatments. The groups challenged with pathogens and without use of probiotics were those with less weight gain. In *B. cereus* count, there was a significant difference ($P < 0,05$) between the treatments T2, T4 and T6, and it was observed that the best probiotic competed for space and nutrients when faced with *V. parahaemolyticus* than with *V. alginolyticus*. There was a significant difference ($P < 0,05$) in the pathogen count in the animals fed dietary supplementation with probiotic showed lower count those fed without the use. No Histopathological lesions were observed in organs and tissues of animals. The *Bacillus cereus* demonstrated a high ability to colonize shrimp post-larvae, causing a significant reduction of pathogens, probably by secreting antimicrobial substances and or competitive exclusion.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Bacillus cereus*, experimental infection.

INTRODUÇÃO

As doenças que acometem camarões cultivados são desencadeadas quando ocorre um desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões e os agentes potencialmente patogênicos (MERCIER et al., 2006). Espécies do gênero *Vibrio*

estão entre as bactérias que mais causam doenças em camarões cultivados, podendo infectar em todas as fases de vida do animal, sendo responsáveis por mortalidades em massa nas carciniculturas, com consequentes perdas econômicas (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2010).

A presença desses patógenos tem sido tratada com o uso de antibiótico, os quais tem trazido consequências negativas, particularmente a resistência bacteriana (THUY et al., 2011). Na busca de profiláticos seguros, os probióticos surgiram como uma alternativa em substituição ao uso de antibióticos (BALCÁZAR et al., 2006).

Por definição, os probióticos na aquicultura são produtos cultivados ou complementos microbianos vivos que têm um efeito benéfico sobre o hospedeiro, alterando a comunidade microbiana associada ao intestino do animal e melhorando a resposta a doenças (VERSCHUERE et al., 2000), além de melhorar o apetite e levar a um maior crescimento e melhor conversão alimentar (NEWAJ-FYZUL; HARBI; AUSTIN. 2014). Os probióticos administrados como suplemento vivo em dietas devem ser capazes de sobreviver e passar através do trato intestinal do animal (NAVINCHANDRAN et al., 2014).

Para seleção de um probiótico, deve-se levar em consideração os resultados de testes de antagonismo frente a patógenos, a capacidade de adesão e, consequentemente, a colonização no trato intestinal (LUIS-VILLASEÑOR et al., 2011), bem como a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de vibrionáceos (CHABRILLÓN et al., 2005). O micro-organismo deve ser não patogênico, bioquimicamente e fisiologicamente bem caracterizado e se isolado do intestino da própria espécie, poderá apresentar maior adaptabilidade às condições de origem (BALCÁZAR et al., 2006).

Uma gama de bactérias gram-negativas e positivas tem sido identificada como potenciais probióticos para a aquicultura com efeitos benéficos contra vários patógenos (BRUNT; NEWAJ-FYZUL; AUSTIN, 2007).

Bactérias gram-negativas, formadoras de esporos, como os *Bacillus* spp. tem demonstrado um considerável sucesso como probióticos (HONG; DUC; CUTTING, 2005). As espécies *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* e *B. licheniformis* são as mais extensivamente estudadas. Por formarem esporos, são estáveis ao calor, dessa forma, o produto pode ser armazenado à temperatura ambiente, na forma de desidratado, sem qualquer efeito deletério sobre sua viabilidade, apresentando vantagens sobre os não formadores de esporos como os *Lactobacillus* spp. São muito utilizados em seres humanos como suplementos dietéticos e na aquicultura para aumentar o crescimento e resistência a doenças de camarões cultivados (CUTTING, 2011).

Várias pesquisas foram realizadas sobre o uso de *Bacillus* spp. na carcinicultura do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (LUIS-VILLASEÑOR et al., 2011; NIMRAT; BOONTHAI; VUTHIPHANDCHAI, 2011; LIU et al., 2010) e no crescimento de *Penaeus monodon* selvagens, estimulado pelo uso de *Bacillus cereus* (NAVINCHANDRAN et al., 2014).

Objetivou-se avaliar os efeitos de uma dieta suplementada com *Bacillus cereus* como probiótico em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, sobre a sobrevivência, ganho de peso, microbiota intestinal e avaliação histológica de tecidos quando desafiados com patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), com dez dias de vida (PL₁₀), provenientes de um laboratório comercial do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Os animais foram mantidos por 14 dias em sistema de berçário, em caixa d'água com volume de 1,0 m³, a uma densidade 24 pós-larva por litro (PL/L), aeração constante, temperatura de 28±0,3 °C e salinidade 28 mg/L⁻¹. A alimentação consistiu de ração comercial com 56% de proteína bruta, fornecida seis vezes/dia, de acordo com o consumo observado. Durante este período, para que houvesse a certificação de que os animais estavam livres de patógenos, os animais foram tratados com ração medicada com oxitetraciclina (pureza 50%), na dosagem de 0,4g/kg⁻¹, a incorporação do fármaco à ração foi baseada no método descrito por Brock e Main (1994). A ração medicada foi ofertada duas vezes ao dia, por sete dias. Ao final do tratamento, as pós-larvas permaneceram no sistema de berçário por mais cinco dias, para que se cumprisse o período de carência do antibiótico e assim iniciar o experimento.

Delineamento experimental

O experimento foi inteiramente casualizado e consistiu de seis tratamentos com três repetições, designados:

- T₁ – CONTROLE (sem uso de probiótico e sem patógeno);
- T₂ – PB (com probiótico e sem patógeno);
- T₃ – VP (sem probiótico e com *Vibrio parahaemolyticus*, ATCC - 147 17802);
- T₄ – PB-VP (com probiótico e com *V. parahaemolyticus*, ATCC 147 17802);
- T₅ – VA (sem probiótico e com *V. alginolyticus*, IAL - Instituto Adolfo Lutz 1957);
- T₆ - PB-VA (com probiótico e com *V. alginolyticus*, IAL 1957).

Foram utilizadas como parcelas experimentais garrafas plásticas, com volume utilitário de cinco litros, sendo distribuídos aleatoriamente 130 animais por recipiente, numa densidade de 30 animais por litro, com peso médio de 9 mg e idade de 24 dias. A água utilizada foi filtrada, esterilizada em luz ultravioleta e clorada a 15 ppm, por 24 horas e declorada com ácido ascórbico (5 ppm). Uma aeração suave com pedra porosa foi mantida constantemente em cada parcela experimental, com troca de água diária de 10% do volume de cada garrafa. A alimentação foi fornecida seis vezes/dia, com ração de 40% de proteína bruta (PB), na quantidade de acordo com o consumo.

Os camarões dos tratamentos T₂ (PB), T₄ (PB-VP) e T₆ (PB-VA) foram submetidos a alimentação suplementada com o probiótico *Bacillus cereus*, isolado do intestino de juvenis de camarões *L. vannamei* e testada seu potencial probiótico *in vitro* através de testes de antagonismo frente a *V. parahaemolyticus* (ATCC 147 17802) e *V. alginolyticus*, (IAL - Instituto Adolfo Lutz 1957). A cepa de *Bacillus cereus* foi adicionada à ração na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/g de ração, conforme sugerido por Vieira et al. (2007) e recomendado em produtos comerciais (CUTTING, 2011).

No sétimo dia do experimento os camarões dos tratamentos T₃ (VP), T₄ (PB-VP), T₅ (VA) e T₆ (PB-VA) foram desafiados com bactérias patogênicas adicionadas a água de cultivo numa concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml, conforme recomendação de Buglione et al. (2008). O experimento foi finalizado sete dias após o desafio.

Os parâmetros hidrológicos temperatura (°C), pH, salinidade (mg/L) e oxigênio dissolvido (mg/L) foram mensurados diariamente, a cada doze horas. Amostras de água foram coletadas a cada três dias, para determinação de alcalinidade (mg/L) e concentrações de compostos nitrogenados: amônia total (µg/L), nitrito (µg/L) e nitrato (µg/L).

Sobrevivência e ganho de peso

Para determinação de sobrevivência (%), ao final do experimento as pós-larvas foram quantificadas e relacionadas com a densidade de estocagem final (diferença entre o número de pós-larvas estocadas e número de pós-larvas retirada durante o experimento para realização de análises) (Eq. 1).

Para fins de cálculo de ganho de peso, foram realizadas sete biometrias ao longo do experimento nos seguintes dias de cultivo: 1º, 4º, 7º, 9º, 11º, 13º e 15º. Após remoção de excesso de umidade em papel absorvente, os animais foram pesados em balança digital com precisão de $\pm 0,0001$ g, sendo contados o número de indivíduos em uma biomassa de 0,1g (Eq. 2).

$$\text{Sob\%} = (\text{N}^{\circ}\text{PLF/DF}) \times \text{Eq. 1} \quad \text{PPL(g)} = (0,1\text{g biomassa}) / \text{N}^{\circ}\text{PL} \quad \text{Eq. 2}$$

Em que: Sob% – taxa de sobrevivência; N^oPLF- número de pós-larvas final; DF- densidade final. PPL(g) – peso médio das pós-larvas por grama; N^oPL – número de pós- larvas.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas utilizando-se o Método de Contagem Padrão em Placas. Avaliou-se a capacidade de colonização do probiótico nas pós-larvas de camarão marinho, através de determinação quantitativa de *Bacillus*, no início e ao longo de todo o experimento (1^o, 4^o, 9^o e 15^o dia do experimento).

Para avaliar o estado de saúde dos animais foi realizada determinação quantitativa de bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* nos animais no primeiro dia do experimento e após o desafio com as bactérias patogênicas no 9^o e 15^o dia. Além disso, foi realizada contagem de bactérias do gênero *Vibrio* na água do cultivo no início do experimento para certificar que estava livre de patógenos.

Para estimar a concentração das bactérias nos animais, uma biomassa de 0,1g de amostra de camarão, foi lavada ligeiramente em álcool etílico 70%, em seguida com água destilada esterilizada, e solução salina (3,5% NaCl), para remoção de possíveis bactérias externas. As amostras foram maceradas e diluídas em 0,9ml de solução salina estéril (diluição 10⁻¹) e a partir dessa foram obtidas diluições sucessivas até 10⁻⁴, e posterior plaqueamento, conforme Buller (2004) em meio Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) para contagem de *Bacillus* e meio Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) para determinação de *Vibrio* e incubadas a 35-37 °C por tempo de 24 a 36 horas e 18 a 24 horas, respectivamente. Após desenvolvimento das bactérias as colônias foram contadas e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g).

Para contagem de bactérias do gênero *Vibrio* na água de cultivo, foram realizadas diluições sucessivas decimais da amostra de água e plaqueadas, seguindo a mesma metodologia descrita para a análise nos animais.

Análises histopatológicas

As amostras para processamento histopatológico foram realizadas para todos os tratamentos. Ao longo do experimento foram realizadas sete coletas ao longo do experimento, nos seguintes dias de cultivo: 1^o, 4^o, 7^o, 9^o, 11^o, 13^o e 15^o. Os animais foram fixados em

solução de Davidson's AFA (HUMASON, 1972), onde permaneceram por 24/48 horas. Em seguida, transferidas para álcool 70%. O material foi submetido à bateria de desidratação, diafinização e incluídas em parafina e, subsequentemente, cortados com auxílio de micrótomo a uma espessura de 5 micra e corado pela técnica de hematoxilina-eosina (BEHMER et al., 2003).

Análise estatística

Os resultados das taxas de sobrevivência das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, em todos os tratamentos, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), após avaliação de homogeneidade através do teste K (Cochran) e para comparar as diferenças significativas ($P < 0,05$), entre os tratamentos foi utilizado o Teste de Tukey.

Para avaliar a relação entre o peso das pós-larvas com a densidade, tempo de cultivo e os tratamentos foi utilizado o seguinte modelo matemático:

$$\text{Peso} = \beta_0 + \beta_1 \text{TC} + \beta_2 \text{DE} + \beta_3 \text{TC} * \text{DE} + \sum_{n=1}^{n=6} \beta_{3+n} \text{Trat}_n + \varepsilon_i \quad \text{Equação 3}$$

Em que: Peso – Peso médio por pós-larva (0,1g); $\beta_{0,1,2,3, \dots, 9}$ - parâmetros do modelo, TC- tempo de cultivo, DE- densidade de estocagem, Trat- T_1 – (CONTROLE), T_2 (C/PBT-S/PT), T_3 (S/PBT- C/VP), T_4 (C/PBT-C/VP), T_5 (S/PBT-C/VA) e T_6 (C/PBT-C/VA), ξ - erro com distribuição normal e parâmetros (0, σ^2).

Para verificar a influência ($P < 0,05$) de cada variável do modelo usou-se o processo de Stepwise (seleção de variáveis) e ao final do processo avaliou-se a robustez do modelo com base na estatística F de Snedecor, valor da probabilidade de F, R^2 , normalidade dos erros (Shapiro-Wilk) e número de pontos discrepantes (out-lier).

Os resultados das contagens bacterianas de *Bacillus* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, quando alimentadas com ração suplementada de probiótico nos tratamentos T_2 (PB), T_4 (PB-VP) e T_6 (PB-VA), nos tempos de cultivo: 4º, 9º e 15º dia e as contagens de *Vibrios* quando desafiados com patógenos nos tratamentos T_3 (VP), T_4 (PB-VP), T_5 (VA) e T_6 (PB-VA), nos tempos de cultivo 9º e 15º dia, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), após avaliação de homogeneidade através do teste K (Cochran). Uma vez encontrada a diferença entre os tratamentos e entre os tempos de cultivo, as médias foram comparadas pelo teste t-Student, a 5% de probabilidade. Para as análises os valores das contagens foram transformados para $\text{Ln}(x + 1)$.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados usando o programa computacional SysEapro (v.2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido, alcalinidade e as concentrações de compostos nitrogenados: amônia total, nitrito e nitrato da água dos tratamentos (Tabela 1) e foram consideradas adequadas para o cultivo de camarões peneídeos, conforme Boyd (1990).

Dessa forma, a qualidade da água não deve ter comprometido o desenvolvimento dos camarões durante o experimento.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ DP), mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos da água de cultivo de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório

Parâmetros	Média $\pm$ DP	Mínimo – Máximo
Temperatura	26,33 $\pm$ 0,45	26,9 – 25,66
pH	7,61 $\pm$ 0,30	7,08 – 7,01
Salinidade (g/L ⁻¹)	28,15 $\pm$ 0,03	28,21 – 28,10
OD (mg/L ⁻¹)	6,16 $\pm$ 0,16	6,40-5,89
Amônia (μ g/L ⁻¹)	483,07 $\pm$ 36,08	518,17-423,37
Nitrato (μ g/L ⁻¹)	151,87 $\pm$ 31,68	205,34-125,21
Nitrito (μ g/L ⁻¹)	153,16 $\pm$ 25,92	205,34-125,21
Alcal. (mg/L ⁻¹)	182,34 $\pm$ 2,34	185,78-115,66

Em que: OD.- Oxigênio dissolvido; Alcal. – Alcalinidade; DP – Desvio padrão

Sobrevivência e ganho de peso

Após 15 dias de experimento, foi verificado que a melhor sobrevivência de pós-larvas entre cada tratamento foi no T₂ (PB) com a taxa de 60,52 $\pm$ 23,71%, enquanto os tratamentos com patógenos numericamente apresentaram as menores, porém não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2). Estes resultados corroboram com Guo et al. (2009) para *Pennaeus monodon*, em que adicionando *Bacillus fusiformis* na água não

resultou em diferença significativa na taxa de sobrevivência quando comparado com o controle.

As vantagens do uso de probióticos sobre a sobrevivência de camarões foi observada por Balcázar e Rojas-Luna (2007), que verificaram a eficácia da dieta *B. subtilis* UTM 126 na sobrevivência e na proteção de *L. vannamei* contra infecção por *V. parahaemolyticus*. Buglione et al. (2008) demonstraram que o uso de *Lactobaillus platarum* aumentou a sobrevivência de pós larvas de *L. vannamei* frente a testes de estresse de salinidade e infecções experimentais com *V. haveyi*. Navinchandran et al. (2014) avaliaram o efeito do *Bacillus cereus* como probiótico em pós-larvas de *Penaeus monodon* e observaram uma alta sobrevivência nos grupos tratados com ração suplementada de probiótico em relação ao grupo controle.

De acordo com Balcázar et al. (2006), a exclusão competitiva de probióticos é um fator importante, por melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, possibilitando à substituição de bactérias prejudiciais aos animais por bactérias benéficas, contribuindo no desempenho do crescimento e na taxa de sobrevivência.

Tabela 2. Influência do uso de probiótico sobre a taxa de sobrevivência de pós- larvas do *Litopenaeus vannamei*, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.

Tratamento	Sobrevivência (%)
T ₁ – CONTROLE	53,01± 8,48 a
T ₂ – PB	60,52± 23,71 a
T ₃ – VP	44,87± 11,03 a
T ₄ - PB-VP	51,48± 16,51 a
T ₅ – VA	47,47± 10,75 a
T ₆ – PB-VA	54,51± 3,40 a
CV (%)	10,74
Prob(F)	0,0599

Em que: T_{1,2,3,4,5,6} – Tratamentos; CONTROLE - sem uso de probiótico e patógeno; PB com probiótico; VP – com *V. parahaemolyticus*; (PB-VP) - com probiótico e com *V. parahaemolyticus*; VA - com *Vibrio alginolyticus*; PB-VA com probiótico e com *V. alginolyticus*; CV- Coeficiente de variação; Prob(F)- valor da probabilidade da estatística “F” de Fisher Snedecor; *n =3; **- letras iguais, indicam não haver diferença significativamente (P≥0,05) entre os tratamentos.

Ao avaliar o ganho de peso das pós-larvas de *L. vannamei*, com base na Eq.3, verificou-se que o tempo de cultivo interferiu positivamente ($P<0,05$), enquanto a densidade de estocagem e os tratamentos T₃ (VP) e T₅ (VA) influenciaram negativamente ($P\leq 0,05$), em conformidade com o modelo abaixo:

$$\text{Peso}_{(g)} = 0,00930 + 0,00252\text{TC} - 0,00002\text{TC} \cdot \text{DE} - 0,00286\text{T}_3 - 0,00395\text{T}_5$$

Em que: Peso- peso das pós-larvas; TC- tempo de cultivo, DE- densidade de estocagem, T₃ - Tratamento 3 sem uso de probiótico e desafiado com *Vibrio parahaemolyticus* (PB-VP); T₅ - Tratamento 5 sem uso de probiótico e desafiado com *Vibrio alginolyticus* (VA).

O referido modelo foi considerado robusto, uma vez que apresentou as seguintes estatísticas: $R^2=73,65\%$; Prob(F)- $<0,00001$; 6 out lier e a normalidade dos erros foram aceitos pelos testes de Shapiro-Wilk, D'Agostino e D'Agostino-Pearson. Desta forma, ao estimar e comparar os resultados, para um tempo de cultivo de 15 dias e a uma densidade média final de 78 indivíduos, verificou-se que os animais provenientes dos tratamento que foram desafiados com patógenos, porém com uso de probióticos e os controles não diferiram significativamente ($P\geq 0,05$) apresentando os melhores ganhos de peso enquanto que os animais dos tratamentos T₃ e T₅, desafiados com *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, respectivamente, sem uso de probióticos foram os que apresentaram menor ganho de peso apresentando diferença significativa ($P<0,05$) dos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Influência do uso de probiótico sobre o peso de pós-larvas do *Litopenaeus vannamei*, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.

Tratamento	PPL/g
T ₁ – CONTROLE	0,027* $\pm$ 0,02 a**
T ₂ – PB	0,027 $\pm$ 0,02 a
T ₃ – VP	0,024 $\pm$ 0,02 b
T ₄ - PB-VP	0,027 $\pm$ 0,02 a
T ₅ – VA	0,024 $\pm$ 0,02 b
T ₆ – PB-VA	0,027 $\pm$ 0,02 a

Em que: T_{1,2,3,4,5,6} – Tratamentos; CONTROLE - sem uso de probiótico e patógeno; PB com probiótico; VP – com *V. parahaemolyticus*; (PB-VP) - com probiótico e com *V. parahaemolyticus*; VA - com *Vibrio alginolyticus*; PB-VA com probiótico e com *V. alginolyticus*; PPL/g- Peso da pós-larva dado em grama; *- média de 3 repetições; **- letras

diferentes, numa mesma coluna difere significativamente ($P \leq 0,05$) os tratamentos, pelo teste “F” de Fisher Snedecor.

A presença dos patógenos nos cultivos em que não se utilizou probióticos influenciou negativamente no ganho de peso dos animais. Corroborando com Balcázar, Rojas-Luna e Cunningham (2007) que observaram o efeito benéfico do uso de probióticos isolados do trato gastrointestinal de *L. vannamei* incorporados na ração frente a infecção experimental com *V. parahaemolyticus*. Zokaeifar et al. (2014), avaliaram o efeito de probióticos na água de cultivo de *L. vannamei*, quando desafiados com *V. harveyi* e observaram um maior ganho de peso nos animais cultivados com o uso de probióticos. De acordo com Navinchandran et al. (2014), bactérias probióticas produzem enzimas digestivas e nutrientes de crescimento necessários, tais como vitaminas e aminoácidos, melhorando a absorção de alimentos, resultando em uma melhor taxa de crescimento no hospedeiro.

Análises microbiológicas

Não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* na água de cultivo e nos animais e nem de bactérias do gênero *Bacillus* nas pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, no primeiro dia de experimento. Também não houve crescimento de bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* nos tratamentos T₁, T₂ e bactérias do gênero *Bacillus* nos tratamentos T₁, T₃ e T₅ ao longo de todo o experimento.

A colonização de um probiótico no trato gastrointestinal de um animal é um fator muito importante para o equilíbrio intestinal (ZOKAEIFAR et al., 2014). Neste estudo, a administração de ração suplementada com *Bacillus cereus* mostrou uma colonização bem-sucedida, pois foi possível recuperá-lo nas amostras de animais de todos os grupos tratados com probiótico.

As contagens de bactérias do gênero *Bacillus* nas pós-larvas de camarão marinho provenientes dos tratamentos com ração suplementada de *Bacillus cereus* estão apresentadas na Tabela 4. No tratamento 2, onde não existia a presença de patógenos, observou-se que a contagem de bactérias probióticas manteve-se estável, não apresentando diferença significativa ($P \geq 0,05$), ao longo do experimento. Nos Tratamentos T₄ e T₆, os quais foram desafiados no sétimo dia de experimento com *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, respectivamente, observou-se que no 9º dia a contagem de *Bacillus* foi reduzida, provavelmente devido a presença dos patógenos, podendo ter ocorrido exclusão competitiva.

Observa-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os três tratamentos no 15º dia de experimento, em que no T₄ a contagem bacteriana de *Bacillus* ($5,83 \pm 1,18$ UFC/mg) foi

a maior que no T₆ (4,90±0,42UFC/mg) sugerindo-se que o probiótico em estudo, tende a competir melhor por espaço e nutrientes com *Vibrio parahaemolyticus* do que com *Vibrio alginolyticus* em pós-larvas de *L. vannamei*.

A capacidade de adesão e consequente colonização das bactérias no trato gastrintestinal, bem como a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de vibriónáceas devem ser levados em consideração na escolha de um probiótico (CHABRILLÓN et al., 2005). Balcázar et al., (2006) relataram que é essencial saber a origem da cepa utilizada, para que a mesma seja capaz de sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal do hospedeiro, como no caso do *B. cereus* utilizada como probiótico no presente estudo, a qual foi isolada de juvenis de *Litopenaeus vannamei*.

Tabela 4. Contagens bacterianas de probióticos em amostras de pós-larvas de camarão marinho quando alimentadas por ração suplementada com *Bacillus cereus* e desafiadas com bactérias do gênero *Vibrio* spp, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.

Tratamento	Tempo de cultivo (dias)		
	4	9	15
	Contagem bacteriana (Ln UFC/mg)		
T ₂ (PB)	6,11*±2,92 ^{aA**}	7,47±1,39 ^{aA}	7,62±1,23 ^{aA}
T ₄ (PB – VP)	7,61±0,87 ^{aA}	5,91±2,20 ^{aB}	5,83±1,18 ^{bB}
T ₆ (PB – VA)	6,88±187 ^{aA}	6,08±3,37 ^{aAB}	4,90±0,42 ^{cB}

Em que: T₂ (PB) - com uso de probiótico; T₄ (PB-VP) – com probiótico e com *V. parahaemolyticus*; T₆ (PB – VA) - com probiótico e com *V. alginolyticus*; Ln UFC /mg - log das contagens de Unidades Formadoras de Colônias por miligrama; *n= 3 ± intervalo de Confiança; **Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05) pelo teste t-Student, a 5% de probabilidade; dados transformados para Ln (x+1).

Os resultados das contagens de bactérias patogênicas nos animais provenientes dos tratamentos T₃, T₄, T₅ e T₆, estão apresentados na Tabela 5. Na primeira análise bacteriológica para *Vibrio* após o desafio no nono dia de cultivo não se verificou diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, ao final do experimento (15º dia) observou-se diferença (P<0,05) entre os tratamentos T₃ e T₄ e entre T₅ e T₆.

Com relação ao tempo de cultivo, houve diferença significativa (P<0,05) na contagem de bactérias entre o 9º e 15º dias, para os tratamentos T₄ e T₆. Dessa forma, nos grupos em que

as pós-larvas foram alimentadas com ração suplementada de probiótico apresentaram contagem de bactérias patogênicas inferior aqueles alimentados sem uso de probiótico, o que provavelmente está relacionado à ação antimicrobiana do *Bacillus cereus* frente ao *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*, corroborando com Vieira et al (2007).

Abriouel, et al. (2011) relataram que bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzirem um vasto arsenal de substâncias antimicrobianas, incluindo peptídicos, antibióticos lipopeptídicos e bacteriocinas, sendo essa última muito importante devido ao amplo espectro de inibição podendo incluir bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de leveduras e fungos. Além disso, de acordo com Verschuere et al. (2000) *Bacillus* spp. são capazes de competir com bactérias patogênicas por nutrientes e espaço, aumentando a sua proporção na microbiota intestinal de camarões.

Tabela 5- Contagens bacterianas de patógenos em amostras de pós-larvas de camarão marinho quando alimentadas por ração não suplementada e suplementada com *Bacillus cereus* e desafiadas com bactérias do gênero *Vibrio* spp, quando cultivado durante 15 dias, em laboratório.

Tratamento	Tempo de cultivo (dias)	
	Contagem bacteriana (Ln UFC/mg)	
	9	15
T ₃ (VA)	9,59*±1,64 ^{aA**}	8,54±3,47 ^{aA}
T ₄ (PB – VP)	9,37±1,33 ^{aA}	3,49±2,15 ^{bB}
T ₅ (VA)	8,87±3,75 ^{aA}	6,25±2,74 ^{aA}
T ₆ (PB – VA)	9,82±0,21 ^{aA}	2,91±6,27 ^{abB}

Em que: T₃ (VP) com *V. parahaemolyticus*; T₄ (PB-VP) - com probiótico e com *V. parahaemolyticus*; T₅ (VA) com *V. alginolyticus*; T₆ (PB-VA) com probiótico e com *V. alginolyticus*; ; Ln UFC /mg - log das contagens de Unidades Formadoras de Colônias por miligrama *Médias de três repetições ± intervalo de Confiança; **Médias seguidas de Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05) pelo teste t- Student, a 5% de probabilidade; dados transformados para Ln (x+1).

Análise histopatológica

Ao se utilizar 10^8 UFC/ml de bactérias patogênicas, não foram observadas lesões morfológicas relevantes nos órgãos e tecidos das pós-larvas de camarão marinho, em todos os tratamentos ao longo do experimento. Alguns exemplares tiveram discreta infiltração hemocítica periférica no hepatopâncreas, as quais não puderam ser associadas aos grupos desafiados com patógenos, diferentemente dos resultados de Soto-Rodriguez (2015) que observaram lesões do tipo: alongamento das células do epitélio tubular e atrofia, infiltração hemocítica e necrose em infecção experimental com *Vibrio parahaemolyticus*.

Apesar das elevadas contagens de *Vibrio* spp. nos animais provenientes dos tratamentos desafiados com *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* não foram observados sinais clínicos e lesões que pudessem ser relacionadas aquelas vibrioses, portanto, assintomáticos. Fatores diversos podem ter interferido na ausência de alterações como: curto período de exposição ao patógeno, bem como a manutenção de condições ambientais como pH, salinidade, oxigênio dissolvido, nitrito, nitrato, amônia, uma vez que de acordo com Mungnier et al. (2013) fatores externos ao animal, suficientemente estressantes, poderão antecipar o período de incubação do agente, com aparecimento de sinais clínicos mais precocemente.

CONCLUSÃO

O *Bacillus cereus* isolado do intestino de camarão marinho foi capaz de colonizar pós-larvas da mesma espécie, causando uma diminuição significativa de patógenos, sendo mais eficaz na redução de bactérias patogênicas como *Vibrio parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* em camarão marinho quando cultivados em laboratório.

AGRADECIMENTOS

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

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINA), pelo auxílio financeiro com material permanente.

REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H. et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins **FEMS Microbiology Reviews**, v. 3 n. 5, p 201–232, 2011.

- 430 AGUIRRE-GUZMÁN, G. Pathogenicity and infection route of *Vibrio parahaemolyticus* in
431 American white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal World Aquaculture Society** n. 48,
432 p. 464–470, 2010.
- 433 AGUIRRE-GUZMÁN, G. et al. The use of probiotics in aquatic organisms: a review.
434 **Journal Microbiology Research**, n. 6, p. 4845–4857, 2012.
- 435 BALCÁZAR, J. L.; LUNA, T.R. Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126
436 against vibrio species confers protection against vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus*
437 *vannamei*). **Current Microbiology**. v.55, p. 409–412, 2007
- 438 BALCÁZAR, J. L.; ROJAS-LUNA, T; CUNNINGHAM, D. Effect of the addition of four
439 potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
440 following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate**
441 **Pathology**, v. 96, p. 147–150, 2007.
- 442 BALCAZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL,
443 D.; MUZQUIZ, J.L., The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**. v. 114,
444 p.173–186, 2006.
- 445 BEHMER, O.A., et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Manole.
446 Barueri. 2003, 331p.
- 447 BROCK, J.A. & MAIN, K.L.A. Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured
448 *Penaeus vannamei*. Incorporation of medications into Growout Feeds. **World Aquaculture**
449 **Society**, Baton Rouge, Louisiane, USA, p.242, 1994
- 450 BRUNT, J., NEWAJ-FYZUL, A., AUSTIN, B. The development of probiotics for the control
451 of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal**
452 **Fish Diseases**, v. 30, 573–579, 2007
- 453 BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Auburn University, 1990.
454 482p.
- 455 BUGLIONE, M. et al. Avaliação de bacterina e *Lactobacillus plantarum* frente à infecção
456 experimental por *Vibrio harveyi* em pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* **Brazilian Journal**
457 **of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, suplemento, p. 40-45, 2008.8
- 458 BULLER, N. **Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical Identification**
459 **Manual**. Wallingford, UK: CABI Publishion Manual, 2004. 384p.
- 460 CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, p. 214-220, 2011.
- 461 CHABRILLON, M., et al. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream,
462 *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed *Senegalese sole*, *Solea*
463 *senegalensis* (Kaup). **Journal Fish Diseases**, v. 28, 531–537, 2005.

- 464 GUO, J.J. et al. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. **Aquatic**
465 **Research**. v. 40, p. 609-618, 2011.
- 466 HONG, H.A., DUC, L.H., CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics.
467 FEMS Microbiology Reviews, v. 29, p.813–835, 2005
- 468 HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. 3. ed. San Francisco: W.H. Freeman and Co,
469 1972.
- 470 LIU, K.F. et al. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development,
471 stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish &**
472 **Shellfish Immunology**. v. 28 p.837- 844, 2010.
- 473 LUIS-VILLASEÑOR, I.E. et al., Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval
474 cultivation of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.321, p. 136–144, 2011.
- 475 MERCIER, L. et al. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus*
476 *vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**, v.258, p. 633-640, 2006
- 477 MUGNIER A., et al. Biological, physiological, immunological and nutritional assessment of
478 farm-reared *Litopenaeus stylirostris* shrimp affected or unaffected by vibriosis. **Aquaculture**,
479 v. 388–391, p. 105–114, 2013.
- 480 NAVINCHANDRAN, M. et al. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated
481 from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter
482 and immune enhancer in *P. monodon* **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, p. 38-45, 2014.
- 483 NEWAJ-FYZUL A, AL-HARBI, A.H.; AUSTIN, B.B. Review: Developments in the use of
484 probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, v. 431, p.1–11, 2014.
- 485 NIMRAT, S., Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic
486 administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and
487 postlarvae. **Animal Feed Science and Technology**. v.169, p.244–258, 2011.
- 488 SOTO-RODRIGUEZ, S.A. et al. Field and Experimental Evidence of *Vibrio*
489 *parahaemolyticus* as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of
490 Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. **Applied and**
491 **Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5 , p. 1689-1699, 2015.
- 492 THUY, H.T.T., NGA, L.P., LOAN, Antibiotic contaminants in coastal wetlands from
493 Vietnamese shrimp farming. **Environmental science and pollution research international**,
494 v.18, p. 835–841, 2011.
- 495 VERSCHUERE, L. et al. W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture.
496 **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

- 497 VIEIRA, F.N, et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus*
498 *vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55,
499 n.4, p.251-255, 2007.
- 500 ZOKAEIFER, H. et al. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water
501 enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against
502 *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei* **Fish & Shellfish**
503 **Immunology** v. 36, p. 68-74, 2014.

4. 4- Normas da Revista Caatinga

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO CIENTÍFICO

- **Digitação:** o texto deve ser composto em programa Word (DOC ou RTF) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo de 20 páginas, A4, digitado em espaço 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho doze e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial ou consulte o último número da Revista Caatinga. As notas devem apresentar até 12 páginas, incluindo tabelas e figuras. As revisões são publicadas a convite da Revista. O manuscrito não deverá ultrapassar 2,0 MB.

- **Estrutura:** o artigo científico deverá ser organizado em título, nome do(s) autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (opcional), e referências.

- **Título:** deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página, no **máximo com 15 palavras**, não deve ter subtítulo e abreviações. Com a chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. O nome científico deve ser indicado no título apenas se a espécie for desconhecida.

Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

- **Autores(es):** nomes completos (sem abreviaturas), em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, país), endereço completo e e-mail do autor correspondente. Este deve ser indicado por um “*”. Só serão aceitos, no máximo, cinco autores. Caso ultrapasse esse limite, os autores precisam

comprovar que a pesquisa foi desenvolvida em regiões diferentes.

Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos.

Para a inserção do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s) endereço(s) na **versão final do artigo** deve observar o padrão no último número da Revista Caatinga (<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- **Resumo e Abstract:** no **mínimo 100** e no **máximo 250 palavras**.
- **Palavras-chave e Keywords:** em negrito, com a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs. Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês ou Espanhol), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a seqüência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

- **Introdução:** no **máximo, 550 palavras**, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.
- **Citações de autores no texto:** devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002.

Ex: Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com dois autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com mais de três autores, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).

- **Tabelas:** serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. **Não usar linhas verticais.** As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm (consulte o modelo de artigo), acessando a página da Revista Caatinga

(<http://periodico.caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema>).

- **Figuras:** gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. A resolução deve ter qualidade máxima com pelo menos 300 dpi. As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após à sua primeira citação.**

- **Equações:** devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word.

- **Agradecimentos:** logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, indicando, de forma clara, as razões pelas quais os faz.

- **Referências:** devem ser digitadas em espaço (1,5 cm) e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm). Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores, Justificar (Ctrl + J) - NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT. **UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.**

O título do periódico não deve ser abreviado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências. **EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES.**

REGRAS DE ENTRADA DE AUTOR

Até 3 (três) autores

Mencionam-se todos os nomes, na ordem em que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula.

Ex: TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 0, n. 0, p. 00-00, 2010.

Acima de 3 (três) autores

Menciona-se apenas o primeiro nome, acrescentando-se a expressão **et al.**

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

Grau de parentesco

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN**. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. **Cuiabá**: Prefeitura de Cuiabá, 2005.

MODELOS DE REFERÊNCIAS:

Artigos de Periódicos: Elementos essenciais:

AUTOR. Título do artigo. **Título do periódico**, Local de publicação (cidade), n.º do volume, n.º do fascículo, páginas inicial-final, mês (abreviado), ano.

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, set. 2006.

a) Livros ou Folhetos, no todo: Devem ser referenciados da seguinte forma:

AUTOR. **Título**: subtítulo. Edição. Local (cidade) de publicação: Editora, data. Número de páginas ou volumes. (nome e número da série)

Ex: RESENDE, M. et al. **Pedologia**: base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

b) Livros ou Folhetos, em parte (Capítulo de Livro):

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título**: subtítulo do livro. Número de edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. Indicação de volume,

capítulo ou páginas inicial-final da parte.

Ex: BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

c) Dissertações e Teses: (somente serão permitidas citações recentes, PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS TRÊS ANOS QUE ANTECEDEM A REDAÇÃO DO ARTIGO). Referenciam-se da seguinte maneira:

AUTOR. **Título:** subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas ou volumes. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, local.

Ex: OLIVEIRA, F. N. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.)**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

d) Artigos de Anais ou Resumos: (DEVEM SER EVITADOS)

NOME DO CONGRESSO, n.º, ano, local de realização (cidade). Título... subtítulo. Local de publicação (cidade): Editora, data de publicação. Número de páginas ou volumes.

Ex: BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

e) Literatura não publicada, mimeografada, datilografada etc.:

Ex: GURGEL, J. J. S. **Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS**. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

f) Literatura cuja autoria é uma ou mais pessoas jurídicas:

Ex: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

g) Literatura sem autoria expressa:

Ex: NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

h) Documento cartográfico:

Ex: INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). **Regiões de governo do Estado de São Paulo**. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

J) Em meio eletrônico (CD e Internet): Os documentos /informações de **acesso exclusivo**

por computador (on line) compõem-se dos seguintes elementos essenciais para sua referência:

AUTOR. Denominação ou título e subtítulo (se houver) do serviço ou produto, indicação de responsabilidade, endereço eletrônico entre os sinais < > precedido da expressão – Disponível em: – e a data de acesso precedida da expressão – Acesso em:.

Ex: BRASIL.Ministério da Agricultura e do abastecimento. **SNPC – Lista de Cultivares protegidas**. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.

UNIDADES E SÍMBOLOS DO SISTEMA INTERNACIONAL ADOTADOS PELA REVISTA CAATINGA

Grandezas básicas	Unidades	Símbolos	Exemplos
Comprimento	Metro	M	
Massa quilograma	quilograma	kg	
Tempo	segundo	S	
Corrente elétrica	Amper	A	
Temperatura termodinâmica	Kelvin	K	
Quantidade de substância	Mol	mol	

Unidades derivadas

Velocidade	---	m s^{-1}	343 m s^{-1}
Aceleração	---	m s^{-2}	$9,8 \text{ m s}^{-2}$
Volume	Metro cúbico, litro		
Frequência	Hertz	M^3, L^*	$1 \text{ m}^3, 1\,000 \text{ L}^*$
Massa específica	---	Kg m^{-3}	1.000 kg m^{-3}
Força Pressão	Newton	N	15 N
	pascal	Pa	$1,013.10^5 \text{ Pa}$
Energia	Joule	J	4 J
Potência	Watt	W	500 W
Calor específico		$\text{J (kg } ^0\text{C)}^{-1}$	$4186 \text{ J (kg } ^0\text{C)}^{-1}$
Carga elétrica	Coulomb	C	1 C

Potencial elétrico	Volt	V	25 V
Resistência elétrica	Ohm	Ω	29 Ω
Intensidade de energia	Watts/metros quadrado	W m^{-2}	1.372 W m^{-2}
Concentração	Mol/metro cúbico	Mol m^{-3}	500 mol m^{-3}
Condutância elétrica	siemens	S	300 S
Condutividade elétrica	desiemens/metro	dS m^{-1}	5 dS m^{-1}
Temperatura	Graus Celsius	$^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
Ângulo	Graus	$^{\circ}$	30 $^{\circ}$
Porcentagem		%	45%

Números mencionados em sequência devem ser separados por **ponto e vírgula (;)** Ex: 4,8; 5,3