

**MONIQUE MONTEIRO PINTO**

**BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO  
ISOLADAS DE CAMARÕES MARINHO CULTIVADOS.**

**RECIFE  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO**  
**ISOLADAS DE CAMARÕES MARINHO CULTIVADOS.**

**Monique Monteiro Pinto**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

**Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes**  
(Orientadora)

**Recife**

**Fevereiro/ 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO**  
**ISOLADAS DE CAMARÕES MARINHO CULTIVADOS.**

**Monique Monteiro Pinto**

Dissertação julgada adequada para  
obtenção do título de mestre em  
Ciência Veterinária. Defendida e  
aprovada em 27/02/2013 pela seguinte  
Banca Examinadora.

---

Profa.Dra. **EMIKO SHINOZAKI MENDES**  
(orientadora)  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

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

---

Prof. Dr. **FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS**  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr.. **EUDES CORREA DE SOUZA**  
Departamento de Pesca e Aquicultura  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## *Dedicatória*

*As duas grandes mulheres que são à base da minha vida,  
a quem deve todas as minhas conquistas e aprendizado: minha  
amada mãe, Jolanda e minha amada vó Sebastiana. Ao meu  
filho Francisco, amor da minha vida.*

## AGRADECIMENTO

À Deus.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A orientação da Profa. Dra Emiko Shinozaki Mendes, por acreditar sempre em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava, por permitir que eu expusesse toda minha fragilidade e medos, pela mão estendida e todo carinho.

À todos os professores da Pós-Graduação em Ciência Veterinária que passaram seus conhecimentos e contribuíram para minha formação acadêmica, pessoal e profissional.

A toda equipe que constitui o Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAq) e Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) da UFRPE, pessoas que ajudaram direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa, em especial a equipe de coleta e do projeto Probiótico Camarão, Alexandre Duarte, Laelia Pessoa, Juliana Vidal e Rodrigo Zeymer.

Aos meus queridos amigos, Carolina Patriota, Suely Bezerra, Virgínia Pedrosa, João Menezes, Marianne Teixeira, Mariana Siqueira, Kettyne Jaqueline, Paloma Coutinho, Fernanda Toshihid, Antonieta Vieira, Camila Domingues, Eder Ferreira e Erike Valença pela força, torcida e carinho durante essa caminhada.

À Fazenda Catuama, onde foram feitas as coletas dos camarões para a pesquisa, e assim possibilitar o estudo.

Ao meu pai pela presença a minha prima Ana Theodora pela força e muitos momentos de troca.

A todos os familiares, amigos, colegas, companheiros de estudo e de trabalho que de alguma forma deram-me forças e ânimo para iniciar, manter e finalizar mais essa etapa.

## RESUMO

Os probióticos são responsáveis por uma nova ideia de utilização de preventivos na aquicultura, visando a sustentabilidade do cultivo, equilíbrio do meio ambiente e dos seus produtos gerados. Entretanto, ainda são poucos os conhecimentos a respeito do tema, apesar da sua vasta utilização na carcinicultura, muitas vezes de forma aleatória. Em virtude da grande demanda do setor por novas alternativas para manter a saúde animal, que se objetivou identificar e testar bactérias, com potencial probiótico, isoladas do trato intestinal de camarões cultivados (*Litopenaeus vannamei*) em água salgada, oriundos de fazenda comercial do estado de Pernambuco. Foram coletados 90 animais, sendo 50 em período chuvoso e 40 em período de estiagem, todos apresentando-se saudáveis. Os camarões coletados no período chuvoso apresentaram peso de  $9,50 \pm 0,52$ g e comprimento de  $6,72 \pm 0,84$ cm, enquanto os animais analisados no período de estiagem o peso de  $9,76 \pm 0,24$ g e comprimento de  $6,54 \pm 0,42$ cm. Foram obtidos 72 isolados bacterianos, que foram reduzidos para 31 após a análise do Gram, os quais foram testados *in vitro* frente as espécies patogênicas, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Oito isolados (28,81%) apresentaram atividade antibacteriana a pelo menos um patógeno. Não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na proporção de isolados potenciais probióticos obtidos nas distintas épocas do ano, chuvosa e seca. Os isolados que apresentaram os melhores resultados no teste de antagonismo *in vitro* foram identificados como *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus brevis*. O maior halo de inibição observado no teste de antagonismo foi produzido por *Lactobacillus crispatus* frente ao *V. vulnificus*. Todas as bactérias testadas contra os patógenos estudados produziram halo de inibição, contudo sugere-se a realização de testes de antagonismo *in vivo* para que seja comprovada a efetividade das bactérias como probióticas para camarão marinho.

Palavras-chave: Bactérias probiótico, *Litopenaeus vannamei* e teste de antagonismo.

## ABSTRACT

Probiotics are responsible for a new idea of using preventive in aquaculture, aiming at sustainable farming, environmental balance and of its products generated. However, there are few knowledge on the subject, despite its widespread use in shrimp farming, randomly in the most of times. Because of large demand from the sector for new alternatives, to maintain animal health, reduce the chance of having disease problems that the study aimed to identify and test bacteria with potential probiotic isolated from the intestinal tract of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in salt water coming from commercial farm in the state of Pernambuco. Has been collected 90 animals, 50 in rainy season and 40 in dry season. The shrimps collected during the rainy season had weight of  $9.50 \pm 0.52$  g and length of  $6.72 \pm 0.84$  cm, while the animals from the dry period had weight of  $9.76 \pm 0.24$  g and a length of  $6, 54 \pm 0.42$  cm. Were obtained 72 bacterial isolates then performed the Gram 31 were tested *in vitro* against dual-known pathogenic species, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) and *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Eight isolates (28.81%) showed antibacterial activity to at least one pathogen. There was no significant difference ( $P < 0.05$ ) in the proportion of isolates potential probiotics obtained in different seasons, rainy and dry. Isolates that showed the best results in the antagonism test *in vitro* were identified as *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus brevis*. The largest zone of inhibition observed in the antagonism test was produced by *Lactobacillus crispatus* opposite *V. vulnificus*. All bacteria tested against the pathogens studied produced inhibition zone, however it is suggested the testing of antagonism *in vivo* to be proven the effectiveness of probiotic bacteria for marine shrimp.

Keywords: Bacteria probiotic, *Litopenaeus vannamei* and antagonism test.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Diâmetros médios ( $\pm$ IC) dos halos de inibição produzidos no teste “*in vitro*”  
(antagonismo)

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1. Carcinicultura/ <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	12
3.2. Doenças bacterianas de camarão marinho cultivado.....	14
3.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	18
3.4. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	19
3.5. Probiótico.....	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	25
5. ARTIGO CIENTÍFICO: Bactérias Gram positivas com potencial probiótico isoladas de camarões marinho cultivado.....	35
6. ANEXO (Normas para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira) .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

Muitas são as pesquisas e descobertas contínuas que permitem restabelecer o crescimento da aquicultura. No entanto, as doenças e o seu controle, além de uma abordagem efetiva e ambientalmente segura, continuam sendo os grandes obstáculos para o alcance das metas produtivas. Apesar das dificuldades que o segmento apresentou nos últimos anos, a produção de camarão no Brasil se manteve no patamar de 70 mil toneladas em 2009 (BRASIL, 2010). Mortalidades elevadas e surtos de doenças ocorrem nas diferentes fases de cultivo, devido à proliferação de micro-organismos patogênicos nos sistemas. Neste sentido, a indústria aquícola busca continuamente meios para manter um ambiente microbiologicamente saudável e melhorar a sua produção e lucros.

Na carcinicultura, para combater as infecções bacterianas, geralmente consideradas como problemas secundários, provavelmente são administrados os antimicrobianos. Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos pode acarretar naturalmente no aumento da resistência bacteriana. Além disso, após a morte das bactérias não resistentes a essas drogas veterinárias, existe a possibilidade da transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas a tais antibióticos, tornando cada vez mais difícil de serem controladas e erradicadas.

Há um interesse crescente da indústria camaroeira no controle ou eliminação do uso de antimicrobianos e no surgimento e avanço de estudos sobre profiláticos alternativos. A biotecnologia tem sido uma ferramenta de crescente importância na aquicultura, em que o uso de compostos à base de microrganismos vivos tem sido adotado como prática para sustentabilidade do cultivo, minimizando a utilização de produtos químicos e promovendo a sanidade dos animais.

A tecnologia de cultivo do *Litopenaeus vannamei*, espécie exótica originária da costa do Pacífico e introduzida no Brasil na década de 80 (WAINBERG et al. 1998), tem se desenvolvido nos diferentes aspectos nos últimos anos. Mesmo sendo uma espécie com manejo praticamente estabelecido, tem enfrentado diversas ameaças, incluindo vírus, bactérias e parasitas. As bactérias, principalmente as Gram-negativas do gênero *Vibrio*, são os principais patógenos que afetam a saúde do camarão. A redução no número de agentes patógenos presentes no trato gastrintestinal do camarão pode diminuir danos na mucosa e promover uma melhor absorção da área de superfície, melhorando o desempenho do animal. Esta redução pode ser atingida com a introdução

de bactérias benéficas, capazes de competir com os patogênicos, denominados probióticos.

Segundo Reidet al. (2003), probiótico é um conjunto de micro-organismos que quando consumidos vivos em quantidade adequada, conferem benefícios a saúde do hospedeiro. De acordo com Balcázaret al. (2006), as bactérias probióticas podem reduzir ou eliminar a incidência de micro-organismos patogênicos no intestino, o que é extremamente importante para o sistema imunológico do animal, para o aumento da absorção dos nutrientes, e desta forma, para melhoria do seu desempenho.

As doenças que acometem os organismos aquáticos ainda são a maior restrição para a expansão da aquicultura e o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura, em nível mundial. É neste panorama que se tem um considerável aumento de pesquisas, avaliando a utilização de bactérias com potencial probiótico, visando o controle de doenças, melhoria do desempenho e ainda, da qualidade da água nos cultivos, sendo um tema recente e propício a mais estudos.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Obter bactérias com características probióticas, que possam ser utilizadas na prevenção de enfermidades em camarões cultivados.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Isolar bactérias Gram positivas a partir do trato intestinal de camarão marinho cultivado no período de estio e chuvoso.
2. Testar *in vitro* as bactérias isoladas frente a duas bactérias patogênicas, *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, para camarão marinho;
3. Identificar as bactérias isoladas que apresentaram potencial probiótico.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Carcinicultura/ *Litopenaues vannamei***

A atividade de cultivo de camarão é um dos segmentos da aquicultura que mais se destaca no contexto do setor pesqueiro mundial. O camarão é o produto mais importante nesse cenário e no Brasil a produção de camarão cultivado permaneceu estável de 2005 a 2009 com um aumento significativo em 2010, tendo praticamente toda sua produção absorvida pelo mercado interno (ABCC, 2011).

Os números do desempenho da carcinicultura são bastante expressivos e segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2010), no ano de 2008, a produção desse setor cresceu de 917.273 toneladas em 1996 para 2.733.134 toneladas em 2005, correspondendo a um incremento médio de 13,38% ao ano, representando 45% da produção mundial de camarão, que é de 6.082.600 toneladas. Já a produção extrativa, nesse mesmo período, teve um acréscimo de apenas 3,44% ao ano, saindo de 2.522.122 toneladas em 1996 para 3.349.346 toneladas em 2005 (ROCHA; ROCHA, 2009).

No Brasil, o crescimento da aquicultura, particularmente a criação de camarão marinhos, tem-se destacado nos últimos anos. Este aumento é reflexo dos avanços tecnológicos do setor, estimulados pela grande demanda mundial por frutos do mar (ZANOLO, 2006). Na América Latina, o Brasil é considerado como o segundo maior mercado de camarão, tendo sido consumido 46,5 mil toneladas em 2005, o que é uma vantagem em comparação aos outros países que não contam com um mercado interno (CARVALHO et al., 2007).

Mesmo possuindo uma área de produção considerada baixa em relação aos outros principais produtores mundiais, o Brasil possui uma alta produtividade de 4.333kg/ha/ano, abaixo apenas da Tailândia. Em 2009 chegou a produzir 70.000 toneladas de camarão cultivado em 15 mil hectares (BRASIL, 2010).

Na região Nordeste do Brasil, a carcinicultura marinha já se constitui como uma das mais importantes atividades econômicas nos Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Bahia, Piauí e Paraíba. Em 2003, ocupou a segunda posição nas exportações desse setor e participou com 54,51% das receitas decorrentes das exportações do setor pesqueiro brasileiro (ROCHA, 2005).

Um dos principais pontos de destaque desse atual desenvolvimento é a espécie *Litopenaeus vannamei*, originária do Pacífico. Esta espécie, introduzida no país, na metade dos anos 80, possui excelentes condições zootécnicas, tais como: rápido crescimento, rusticidade e habilidade de converter dietas artificiais em excelentes

ganhos de peso. No final do século passado, essa espécie, praticamente, passou a ser cultivada em 100% das fazendas brasileiras (MARTINS, 2003).

O camarão *Litopenaeus vannamei* é nativo do oceano Pacífico oriental distribuindo-se desde a província de Sonora (norte do México) até o Estado de Tumbes, no Peru, normalmente em águas com temperatura superiores a 20 °C (BENZIE, 2000). A espécie tem preferência por *habitats* de fundo lamoso, podendo ser encontrada no ambiente natural desde a região do infra litoral, até profundidades de 72 m. Durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento o camarão *L. vannamei* habita regiões com águas de características oceânicas, refugiando-se para águas litorâneas na medida em que se desenvolve. Nas regiões estuarinas ou costeiras estes animais vivem até o estágio de juvenil quando retornam ao alto mar para se reproduzirem. No período reprodutivo, as fêmeas eliminam cerca de 100.000 a 500.000 ovócitos, que são fecundados externamente pelos espermatozoides no momento da desova (BARBIERI ;OSTRESKY, 2002). Após um período de 14 a 20 horas da desova, as larvas eclodem como náuplios, que possuem 5 subestágios (NI a NV), e passam posteriormente para os estágios de zoéia (ZI a ZIII) e misis (MI a MIII). A metamorfose se completa na passagem do subestágio misis III para pós-larva I, estágio em que os animais já possuem todas as características básicas de um camarão adulto (VINATEIA, 2004).

Além de boa aceitação no mercado, a espécie possui grande capacidade de adaptação às variadas condições de cultivo, apresentando altos rendimentos em elevadas densidades, em águas hiper ou oligohalinas, suportando também ambientes com elevada amplitude térmica entre 9 e 34° C (BARBIERI ; OSTRESKY, 2003).

Todas essas características fizeram do *L. vannamei* a espécie de camarão mais cultivada no mundo. Os principais países produtores de camarões são China e Tailândia, na Ásia, e Equador, México e Brasil, nas Américas (FAO, 2011).

### **3.2 Doenças bacterianas de camarão marinho cultivado**

A rápida expansão da indústria do camarão em poucas décadas tem proporcionado a muitos países altos rendimentos. O crescimento da indústria camaroeira é simultâneo a ocorrência de doenças virais e bacterianas, como o vírus da mancha branca (WSV) e as vibrioses (SHEN et al., 2010). Isto frequentemente conduz a perdas financeiras significantes para muitas fazendas de camarão (THAITHONGNUM et al., 2006).

As doenças são um dos principais fatores limitantes na carcinicultura e têm causa do prejuízo ao redor do mundo. Como ocorre em outros animais, as doenças do camarão resultam do desequilíbrio entre o organismo, o ambiente e o patógeno. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema de defesa do organismo fica debilitado, devido ao gasto energético extra empregado na sua adaptação às novas condições; dessa forma, ele se torna mais vulnerável ao ataque de um patógeno presente no meio (LEÃO, 2005 e PEREIRA et al., 2007).

Romero et al. (2003) citaram que acompanhando a intensificação da produção aquícola está o desenvolvimento de problemas ecológicos e patológicos. Zanolo (2006), por sua vez, referenciou a aquíicultura como uma atividade que, semelhantemente às outras (pecuária, avicultura e suinocultura), está susceptível a doenças dos animais.

Um manejo sanitário eficiente é realizado se conhecendo e considerando a inter-relação existente entre o hospedeiro, o ambiente e o patógeno. Segundo Galli (2004), qualquer alteração no equilíbrio a favor de algum deles pode determinar o aparecimento de uma enfermidade, ou seja, variações ambientais podem afetar tanto o hospedeiro quanto o patógeno.

Portanto, desequilíbrios ambientais podem ocasionar variações na temperatura da água, pH, salinidade e na concentração de oxigênio. Essas condições adversas favorecem o crescimento de micro-organismos, tendo como, por exemplo, os vibrios. Vários são os estudos que associam os vibrios às grandes perdas na carcinicultura (LAVILLA-PITOGO et al., 1998; VIEIRA et al., 2000). Holmström et al. (2003) concluíram na sua pesquisa que 86% das fazendas de camarão analisadas tinham problemas com vibrioses.

As vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, atacando todos os estágios de vida do camarão (SAULNIER et al., 2000; LIU ; CHEN, 2004). Porém algumas espécies de vibrios também podem ser isoladas de camarões peneídeos saudáveis, o que ressalta ainda mais o fato de serem consideradas como bactérias oportunistas (MENEZES, 2005). E isso ocorre porque, em condições adversas, os micro-organismos, ditos oportunistas, tendem a se manifestar de forma patogênica (HENNIG; ANDREATTA, 1998).

Na sua maioria das vezes problemas com vibriose ocorrem quando condições de estresse surgem no cultivo, tais como: queda de oxigênio; densidade de estocagem excessiva; manuseio impróprio do estoque; lesões na cutícula dos camarões; subalimentação e altas concentrações de compostos nitrogenados no ambiente de cultivo

(DECAMP et al., 2008). O processo de infecção da vibriose pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresentam lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos pontuais no hepatopâncreas. O impacto da vibriose é variável, mas em alguns casos pode alcançar até 70% da população cultivada. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem sofrer canibalismo rapidamente contaminando outros indivíduos na população (NUNES; MARTINS, 2002).

Além desses sinais clínicos, os camarões infectados por alguma espécie patogêna de *Vibrio* podem apresentar intestino semivazio, anorexia, inflamação de alguns órgãos internos (órgão linfóide, coração, hepatopâncreas, etc). Pode-se também observar, através de microscopia, um grande número de bactérias presentes em suas hemolinfas durante uma septicemia (AGUIRREZGÚZMAN, 2004). Segundo Phuoc et al. (2008), a ocorrência de vibrioses além de provocar lesões e mortalidades em camarões, contribui fortemente para o aumento da susceptibilidade destes animais a outras enfermidades.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção de víbrios em amostras de camarões, sedimentos e água de cultivo e incluem ferramentas de identificação bioquímica (O'HARA et al., 2003), técnicas moleculares (GONZALEZ et al., 2004; HERNÁNDEZ ; OLMOS, 2003) e análises imunológicas (LONGYANT et al., 2008). As análises bacteriológicas permitem quantificar as unidades formadoras de colônias (UFC), bem como identificar. Nas análises a fresco observa atrofia do hepatopâncreas, células com núcleo hipertrofiado e coloração pálida e por histopatologia com coloração por Hematoxilina e Eosina (H e E) se observa hipertrofia dos túbulos, desprendimento celular, atrofia tubular, infiltração de hemócitos e formação de nódulos homocíticos com presença de colônias de bactérias (PANTOJA; LIGTHNER, 2008).

Na maioria dos casos, as vibrioses em camarões podem ser caracterizadas pela expansão dos cromatóforos dos pleópodos, pereiópodos e urópodos, opacidade muscular, assim como pela presença de listras negras nas regiões laterais do cefalotórax. Uma coloração amarelada das brânquias e do cefalotórax pode também ser um indicativo da ocorrência desta enfermidade (SUDHEESH; XU, 2001; LONGYANT et al., 2008)

As vibrioses possuem várias denominações em todo o mundo e algumas delas são: enfermidade bacteriana, enterite séptica hemocítica, síndrome das bolitas,

septicemia bacteriana dos peneídeos, vibrioses dos peneídeos, vibriose luminescente, enfermidade das patas rochas (AGUIRREZGÚZMAN,2004). A enfermidade também é conhecida como “Síndrome da gaivota”, foi causa de grandes perdas para a indústria de camarão no México, talvez por desconhecimento das técnicas de diagnóstico, assim como do tratamento adequado ao problema. As espécies mais comuns associadas a essas enfermidades são *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*. Apresentam-se ocasionalmente *V. damsela*, *V. fluvialis* e *V. splendidus* que foram identificados como agentes patogênicos graves para vários animais aquáticos cultivados principalmente o camarão (JAYASREE et al., 2006).

Os membros pertencentes à família Vibrionaceae possuem grande diversidade bacteriana. Algumas espécies são de vida livre e outras são simbióticas. Possuem grande importância ecológica em todo o globo devido ao fato de serem encontradas em vários nichos (NISHIGUCHI; NAIR, 2003).

O gênero *Vibrio* são habitantes da flora normal aquática, apresentam-se como bactérias curtas. As espécies que constituem o gênero *Vibrio* são anaeróbicas facultativas, Gram-negativas, bastonetes curvos ou retos, medem entre 0,5 a 0,8µm de diâmetro e 1,4 a 2,4µm de comprimento. A maioria das patogênicas é móvel, possuindo flagelo único e polar e fermentam glicose sem produção de gás. Todos os vibrios patogênicos produzem oxidase e reduzem nitrato, com exceção da espécie *V. metschnikovii*. São halófitos restritos, necessitando de sódio para seu crescimento (MURRAY et al.,1999). Os vibriões têm relacionamento próximo com as Enterobacteriaceae e apresentam movimento rápido devido a um único flagelo polar. Todas as espécies de *Vibrio* são capazes de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas com elevada salinidade e temperatura variando de 10 a 30°C (MANJUSHA et al., 2005; STROHL et al., 2004; MURRAY et al., 2004). O gênero compreende cerca 83 espécies (DSMZ, 2008).

Panicker et al. (2004) afirmaram que dentre as várias espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, autóctone de ambientes marinhos e estuarinos, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* são as principais causadoras de gastroenterite no homem, e, em alguns casos, de septicemia. Entre as principais espécies do gênero que causam prejuízos para a carcinicultura estão o *Vibrio harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* (GUIMARÃES, 2008).

### **3.3 *Vibrio parahaemolyticus***

*V. parahaemolyticus* pode ser encontrado em ambientes estuarinos e marinhos em todo o mundo. Algumas cepas de *V. parahaemolyticus* possuem o gene da *Thermostable Direct Hemolysin (TDH)*. Outras possuem o gene da *Thermostable Related Hemolysin (TRH)* e há as que possuem ambos. Embora os mecanismos de atuação destes genes ainda não tenham sido bem esclarecidos, eles são correlacionados com o fator de virulência da espécie (HARA-KUDO et al., 2003).

*V. parahaemolyticus* foi isolado pela primeira vez em 1951 no Japão, a partir de um surto de gastroenterite ocasionado pela ingestão de “shirasu” (sardinhas novas) não submetidas à cocção. Atualmente, esse micro-organismo é reconhecido como importante patógeno capaz de determinar manifestações gastrointestinais após o consumo de pescado e moluscos bivalves sem cocção ou insuficientemente cozidos (DANIELS et al., 2000; SOUSA et al., 2004).

O mecanismo exato de virulência dessa espécie de *Vibrio* ainda não está perfeitamente elucidado. Entretanto, quatro componentes hemolíticos são produzidos, sendo dois destes: a *Thermostable Direct Hemolysin (TDH)* e *Thermostable Related Hemolysin (TRH)* correlacionados com a virulência da espécie. As cepas TDH positivas induzem a reação de beta hemólise nas hemácias humanas, fenômeno conhecido como reação Kanagawa. Algumas cepas TDH negativas, mas TRH positivas têm sido associadas a casos de gastroenterites (EC, 2001).

De acordo com Wong et al. (1999), a virulência das espécies de *V. parahaemolyticus* está associada com a produção da enzima hemolítica TDH e sua detecção é realizada pelo teste Kanagawa, portanto, as cepas que produzem esta enzima são denominadas Kanagawa positivas (KP). As cepas oriundas de ambientes marinhos, em sua maioria, não são patogênicas e não produzem TDH, sendo consideradas Kanagawa negativas (KN). As cepas KP são frequentemente isoladas de amostras clínicas, conseqüentemente, a produção de TDH é usada com frequência como indicador de virulência (LAKE et al., 2003). Entretanto, essa associação não é mantida em alguns casos, algumas cepas KN são isoladas de casos clínicos e cepas KP isoladas de amostras de ambiente.

### **3.4 *Vibrio vulnificus***

A espécie *V. vulnificus* possui elevada similaridade fenotípica com *V. parahaemolyticus*, diferenciando-se pela capacidade de fermentar lactose, o que

concorreu para inicialmente ser classificada como “víbrio lactosepositivo”. De acordo com Elliot et al. (1995), as cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* podem ser diferenciadas por uma série de provas bioquímicas, incluindo a produção da enzima - galactosidase. Horrét al. (1996) afirmaram que, somente em 1979 a bactéria foi denominada de *V. vulnificus*.

*V. vulnificus* ocorre naturalmente em águas estuarinas e representa uma ameaça significativa para humanos imunodeprimidos. As infecções frequentemente evoluem para septicemia, provocando morte de indivíduos suscetíveis. A ocorrência de *V. vulnificus* em água e na fauna marinha não está relacionada a indicadores bacteriológicos de origem fecal, por essa razão, a detecção e enumeração dessa bactéria no ambiente tem sido prioridade das agências responsáveis pela garantia sanitária dos produtos marinhos (HARWOOD et al., 2004).

De acordo com Husset al. (2004), *V. vulnificus* produz citotoxina extracelular e uma bateria de enzimas hidrolíticas, responsáveis pela rápida degradação do tecido muscular durante a infecção. A presença da cápsula de polissacarídeo é essencial para provocar o processo infeccioso. Três diferentes biótipos de *V. vulnificus* já foram identificados. Aproximadamente 85% das cepas isoladas de amostras clínicas pertencem ao biótipo 1, enquanto o biótipo 2 provoca infecções em enguias. O biótipo 3 foi identificado recentemente e está associado com bacteremia veiculada a alimentos de origem marinha.

*V. vulnificus* está também associado a doenças em camarão cultivado. Em 1995, vários surtos ocorreram envolvendo a espécie em fazendas na Tailândia, nos *Litopenaeus monodon* cultivados (AGUIRREZ-GÚZMAN, 2004).

### **3.5 Probiótico**

A comunidade microbiana de ambientes aquáticos é extremamente variável (MAYER,2011). Essa variação pode ser positiva, beneficiando os animais cultivados com o aparecimento de espécies favoráveis à saúde dos mesmos e à qualidade da água e do solo; ou negativa, com o surgimento de patógenos oportunistas ou não, causando doenças e perdas para a aquicultura em consequência de manejos e condições ambientais inadequados. Como prevenção e combate a esses fatores e em substituição ao uso de antibióticos, vem crescendo a utilização de probióticos tanto a nível experimental, quanto de produção nos sistemas de cultivo. Sendo assim, os probióticos

podem ser usados como agentes de biorremediação e biocontrole para melhorar a produção dos diversos organismos cultivados como peixes, moluscos, microalgas e camarões, com destaque para o camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, atualmente uma das espécies mais cultivadas.

O tratamento com probióticos pode ser considerado como um método de controle biológico, que provoca a limitação ou eliminação de pragas pela introdução de organismos competidores, como parasitas semelhantes ou patógenos específicos (GATESOUBE, 1999). Micro-organismos probióticos são frequentemente usados como aditivos em alimentos para animais cultivados ou de estimação. Adicionadas ao alimento do camarão, as bactérias probióticas podem facilitar a digestão das proteínas constituintes, por causa das enzimas produzidas pelas bactérias que podem complementar a atividade de proteases do camarão, aumentando a digestibilidade alimentar. Além disso, as enzimas probióticas têm uma faixa de pH mais amplo que as enzimas do camarão, o que poderia prolongar o tempo de digestão mesmo quando está no hospedeiro (OLMOS-SOTO, 2006).

O termo probiótico, que significa "para a vida," é derivado do grego "pro" e "bios"(GISMONDO et al., 1999). Esse termo foi utilizado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para descrever "substâncias secretadas por um micro-organismo que estimula o crescimento de outro". Contudo foi em 2001, que um comitê de ação conjunta da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO) definiu probiótico como micro-organismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas, proporcionam um efeito benéfico ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Na aquicultura, ao longo dos anos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram avaliadas como probióticas e conferiram proteção contra um importante número de patógenos. Os probióticos mais comuns utilizados para os organismos aquáticos são compostos de *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* spp. , *Vibrio* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Saccharomyces* spp., os quais são administrados como alimentos vivos enriquecidos ou adicionados à dieta ( BARROS, 2012).

Entre os principais micro-organismos com ação probiótica estudados para uso em carcinicultura estão as microalgas *Tetraselmis suecica* (MAEDA, 1999), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BERGER, 2000), bactérias Gram-positivas *Bacillus* S11, *Bacillus* sp e *Lactobacillus lactis* AR21 (OCHOA-SOLANO e OLMOS-SOTO, 2006), bactérias Gram-negativas *Photobacterium* spp. e *Vibrio alginolyticus*

(RENGPIPAT et al., 1998, 2000; IRIANTO e AUSTIN, 2002). Dentre estes tipos de agentes, as bactérias do gênero *Bacillus* representam organismos de grande importância e amplamente utilizados como probióticos para diferentes fases de cultivo de peneídeos (MORIARTY, 1998; 1999; DECAMP e MORIARTY, 2006).

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

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

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

A composição natural da flora bacteriana intestinal de camarões marinhos pode ser modificada pelo fornecimento de bactérias probióticas diretamente na alimentação (ZIAEINEJAD et al., 2006). Ao utilizar *B. subtilis* UTM 126 no controle de *Vibrio* spp. Balcazar et. al. (2007) observaram que o mecanismo de ação do probiótico pode ter sido a exclusão competitiva, pois detectaram ao final do estudo a presença de *B. subtilis* no hepatopâncreas de juvenis de *L. vannamei*. Ke Li et al. (2007) ao administrar *Bacillus licheniformis* juvenis de *L. vannamei* encontraram uma quantidade significativamente mais baixa de *Vibrio* spp. no trato intestinal desses animais.

Diversos mecanismos são sugeridos como modalidades da ação desses efeitos benéficos presentes nos probióticos. Estes organismos possuem capacidade de adesão no trato gastrointestinal de camarões, promovem a imunoestimulação nos hospedeiros, possuem peptídeos antimicrobianos que removem organismos hospedeiros através do princípio da exclusão competitiva (antagonismo) e promovem melhoras na qualidade da

água, principalmente pela decomposição da matéria orgânica (GATESOUBE, 1991; FULLER, 1992; WATSON et al., 2008).

Como promoção do uso de probiótico Rengpipat et al. (1998) observaram exclusão competitiva utilizando o *Bacillus* spp. adicionado a ração, obtendo melhores resultados de ganho de peso e sobrevivência no cultivo de *P. monodon*. Villamil et al. (2003), utilizando tratamento com bactérias probióticas, observaram que no cultivo de artêmia, as cepas de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei* eliminaram completamente o *Vibrio alginolyticus* deste microcrustáceo, e que no entanto a eliminação do *Vibrio* na água só foi possível com o uso de *L. brevis*. A utilização de cepas de *Pseudomonas* I-2 tem a propriedade de agir no controle de *Vibrio* spp. em sistema de aquicultura, assim como biocontrole em laboratórios e fazendas de camarão (CHYTHANYA et al, 2002). Moriarty (1998) observou um aumento na sobrevivência de camarões de água doce em tanques onde algumas cepas de *Bacillus* spp. foram introduzidas. Este tratamento diminuiu a proporção do patógeno *Vibrio* spp. no sedimento e, em menor extensão, na água.

Ochoa Solano & Olmos-Soto (2006) isolaram cepas de *Bacillus* spp. e verificaram um potencial aplicação tanto para fermentação de alimento como para aumentar a digestibilidade de camarão. Gomez-Gil et al. (2002) obtiveram melhores resultados de crescimento nos estágios de mysis e zoea de camarões peneídeos quando foram alimentados com a microalga *Chaetocero muelleri* e bactérias probióticas. Montero-Rocha (2006) encontrou efeitos positivos no sistema imunológico e fisiológico do *L. vannamei* quando alimentado com probiótico.

Segundo Callaway et al. (2008), dentro do hospedeiro, a ação antagonista ou exclusão competitiva das bactérias probióticas frente aos patógenos pode ser através da produção de compostos com atividade antimicrobiana; competição por nutrientes ou pelos mesmos sítios de adesão; através da alteração do metabolismo do patógeno, aumentando ou diminuindo a atividade enzimática; ou pelo estímulo da imunidade do hospedeiro, aumentando os seus níveis de anticorpos e atividade de macrófago. Balcázar (2006) ainda reforçou o uso do probiótico na aquicultura, observando como benefício a melhoria na qualidade de água .

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., 2008, GATESOUBE 2008., TINH et al., 2008). Nesse

contexto, através do uso de bactérias probióticas a composição da comunidade microbiana pode ser alterada, o que possibilita a proliferação de bactérias benéficas e uma redução de patógenos oportunistas.

Em diversos estudos foi constatado que bactérias do gênero *Bacillus* secretam diversas exoenzimas, como proteases, carboidrases e lipases, sendo essas muito eficientes na quebra de uma grande variedade de proteínas, carboidratos e lipídios em unidades menores. Esse processo pode contribuir para melhorar a digestão e aumentar a absorção dos alimentos, que por sua vez, poderia melhorar o crescimento dos camarões (MORIARTY, 1996, 1998; ARELLANO e OLMOS, 2002; OCHOA e OLMOS, 2006; NINAWA e SELVIN, 2009). Além disso, a microbiota pode servir como uma fonte suplementar de alimentos e sua atividade no trato digestivo pode ser uma fonte de vitaminas ou aminoácidos essenciais (DALL e MORIARTY, 1983).

Tsenget et al. (2009) observaram, com a administração de probióticos, um incremento da atividade da fagocitose e um aumento na resistência dos camarões contra infecções bacterianas. Zhou et al. (2009) e Liu et al. (2010) encontraram um aumento da atividade digestiva e absorção do alimento em camarões tratados com probióticos, resultando em um significativo aumento na sobrevivência, em virtude de uma possível melhora do estado nutricional dos animais.

Embora estudos relacionados ao gênero *Vibrio* spp. sejam, na maioria das vezes, associados as espécies responsáveis por enfermidades dos animais cultivados, Thompson et al. (2010) avaliaram a ação do *Vibrio gazogenes* sobre espécies patogênicas, observando seu potencial probiótico no controle de infecções bacterianas em *Litopenaeus vannamei* e concluíram que o *V. gazogenes* pode melhorar a saúde e o bem-estar de camarões sob condições de cultivo.

Na escolha dos probióticos, a capacidade de adesão e consequente colonização das bactérias no trato gastrointestinal e a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de vibriônicas é uma importante propriedade (CHABRILLÓN et al. 2005).

Segundo Sugita et al. (2002) e Vine et al. (2004), é essencial conhecer a origem bacteriana, sendo preferível o uso de linhagens isoladas do próprio hospedeiro, por apresentarem maior segurança (não patogênica) e habilidade em sobreviver no trato gastrointestinal (resistência a sais biliares, baixos pH e proteases). Com isso, é sugerido que cepas bacterianas isoladas do intestino de camarão da própria espécie possuam ótimo potencial para ser utilizado como probiótico, devido à atividade antimicrobiana, podendo prevenir infecções e enfermidades em aquicultura, além de apresentar

adaptabilidade muito maior as condições intestinais e as condições de origem (SUGITA et al., 2002 e RAMIREZ et al., 2005).

De acordo com Decamp e Moriarty (2006), probióticos têm proporcionado um incremento na produção de camarão similar aquele encontrado quando substâncias antimicrobianas são utilizadas. Vários benefícios têm sido relatados para utilização de bactérias probióticas em sistemas de aquicultura, como a criação de um ambiente hostil para patógenos pela produção de compostos inibitórios (bacteriocinas, lisozimas, proteases e peróxido de hidrogênio) e competição por nutrientes e locais de adesão; fornecimento de nutrientes essenciais e enzimas que resultam em uma melhor nutrição dos animais cultivados, conversão do material orgânico dissolvido na água de cultivo e melhora da resposta imune (GATESOUBE, 1999; GOMEZ-GIL et al., 2000; IRIANTO e AUSTIN, 2002; BALCAZAR et al., 2006; VOGLEY, 2011). Contudo ainda são recentes e escassas as pesquisas das bactérias probióticas na carcinicultura necessitando de maiores estudos a respeito do tema.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.215-219, 2001.

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; RUÍZ, H.M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, v.35, n. 15, p.1395-1404, 2004.

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.

ARELLANO, C.F.; OLMOS, S.J. Thermostable  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus* sp. Isolated from a marine environment. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 791-795, 2002.

Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Estatísticas internacionais. Principais países produtores de camarão cultivado. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/> Acessado em 5/11/2012.

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

BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A.C.; MÁRQUEZ, I.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmotrutta*). **British Journal of Nutrition**, 97, 522–527, 2007.

BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A.C.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, 278, 188–191, 2008.

BARBIERI JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil., 370p.2002.

BARROS, C.; NOTARO DE. Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) 2012. 58f. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura). – Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

BERGER, C. Aportes de labiotecnología a la alimentación y a la inmunostimulación de camarones Penaeidos. In: CRUZ-SUÁRES, L.E. et al. (Ed.). Avances en Nutrición Acuícola. Yucatán: Memores del V Simposium internacional de nutrición acuícola., Cap. 1, p. 19-22. 2000.

BRASIL. MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. 2010. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt\\_AGO\\_19-08-Producao-de-pescado-aumenta.2010](http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-pescado-aumenta.2010).

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

CARLI, E. M. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para controle de *Salmonella* spp em frango de corte. 2006. 82f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (RS), 2006.

CHYTHANYA, R. ;Karunasagar, I. ; Karunasagar, I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain . *Aquaculture*, v. 208, p. 1– 10, 2002.

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

DALL, W.; MORIARTY, D.J.W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: MANTEL, L.H. (Ed.). **The Biology of Crustacea**, vol. 5, Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, 1983.

DANTAS, D.; MATIAS DE MACÊDO. Desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931) cultivado com uso de probióticos quando submetido à infecção com *Vibrio harveyi*. 2008. 44f. **Dissertação** (Mestrado em Recurso pesqueiro e aquicultura) – Departamento de Pesca e aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2008.

DAS, S., WARD, L.R., BURKE, C., Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture, **Aquaculture**, v. 305, p. 32-41, 2010.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37(04), p. 60-62, 2006a.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. Safety of Aquaculture Probiotics. **Global Aquaculture Advocate**, v. 4/5, p. 86-87, 2006b.

DECAMP, O., Moriarty, D.J.W., Lavens, P. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquac. Res.* 39, 334-338, 2008.

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

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

FRANCO, I.; SANTANA, S. R. A; KREWER, C. C.; COSTA, M. M.; ALBINATI, R. C. B.; BAGALDO, A. R. Isolamento e identificação de bactérias candidatas a probióticos em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*. 2009. 90f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal dos Trópicos)-Programa de pós-graduação em Ciência Animal dos Trópicos, Universidade federal da Bahia (BA), 2009.

FULLER, R. History and development of Probiotics. In: FULLER, R. (Ed.). Probiotics: the scientific basis. New York: R. Chapman & Hall,. Cap 1, p. 1-8. 1992.

GALLI, L. Manejo sanitário en el cultivo de camaron. In: Ranzani- Paiva, M.J.T. et al. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela. p.301-322. 2004.

GATESOUBE, F. J. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. **Aquaculture**, v. 96, p. 335–342, 1991.

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

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of Lactic Acid Bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.

GOMEZ-GIL, B.; Roque, A.; Velasco-Blanco, G. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. **Aquaculture**. V.2111, p.43-48. 2002.

GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture** v.191, p.259–270. 2000.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, p. 1-14, 2004.

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

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

JATOBA, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, N., CELSO, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L. P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia do Nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v.43, p. 1201-1207, 2008.

LAVILLA-PIOTOG, C.R.; LEAÑO, E.M.; PANER, M.G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent Vibrios in the rearing environment. **Aquaculture**, v.164, p.337-349, 1998.

LI, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., Hong, H., Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Biotechnol. Lett.** 29, 525-530. 2007.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p.747-748, 1965.

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.

MAEDA, M. Microbial communities and their use in aquaculture. Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound and aquaculture production systems. **World Aquaculture Society**. Ceng-Shenglee: Pat O' Bryen. p.187, 2002.

MAEDA, M. Microbial processes in Aquaculture. Biocreate Press, Tsukuba, Japan and Derby, UK. 6 dez. p. 5, 1999.

MAICÁ, PF, BORBA MR, WASIELESKY JR W. Effect of low salinity on microbial flocculation and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero water-exchange super-intensive system. **Aquaculture Research** v. 43, p. 1-10, 2011.

MENEZES, L.C.B.; BEYRUTH, Z. Impactos da aquicultura em tanques-rede sobre a comunidade bentônica da represa de Guarapiranga - São Paulo - SP. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.29, n.1, p.77-86, 2005.

MICHEL, C.; PELLETIER, C.; BOUSSAHA, M.; DOUET, D.G.; LAUTRAITE, A.; TAILLIEZ, P. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm

environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 73, n. (9), p. 2947–2955, 2007.

MCNEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. **Global Aquaculture Advocate**, v. 3, n.(3): p. 72–76. 2000.

MISHRA, J.K.; SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; GANDY, R.L.; ALI, A.-M. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. **Aquacultural Engineering**, v. 38, p. 2–15, 2008.

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

MONTERO-ROCHA, A.; McIntosh, D.; Sánchez-Merino, R.; Flores, I. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. **Journal of Invertebrate Pathology**. V.91, p.188–194, 2006.

MORIARTY, D.J.W., Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. *Inf fish Int.* 4, 29-33. 1996.

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

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica, Vibrio, Aeromonas e Plesiomonas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 30, p. 265-271, 2004.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard—Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6** (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEAL, RS, COYLE SD, TIDWELL JH. Evaluation of Stocking Density and Light Level on the Growth and Survival of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in Zero- Exchange Systems. **Journal of the World Aquaculture Society** v. 41, n. (4): p. 533–544, 2010.

NINAWA, A.S., Selvin, J., 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 43-66.

NUNES, A. J. P. Revista Tratamento de efluentes e recirculação de água na engorda de camarão marinho. **Panorama da Aqüicultura**. v.12, n.71, p. 26. 2002.

OCHOA-SOLANO, J.; Olmos-Soto, J. The functional property of Bacillus for shrimp feeds. **Food Microbiology**. V. 23, p.519-525. 2006.

PALACIOS E, RACOTTA IS. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. **Aquaculture** v. 268, p. 123–135, 2007.

PEREIRA, O. M.; HENRIQUES, M. B.; MACHADO, I. C. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 29(1), p. 19-28, 2007.

PHUOC, L.H. Single and dual experimental infection of specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* shrimp with White Spot Syndrome Virus and *Vibrio* species. **PhD thesis**, GhentUniversity, Belgium, 2008.

PONCE-PALAFIX, J. et al. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v.157, p.107-115, 1997.

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

POZZA, P. C. et al. Desempenho, microbiota intestinal e peso de órgãos de leitões na fase inicial recebendo rações com simbiótico e probiótico. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1327-1334, set./out., 2010.

RAMIREZ, C. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Curitiba. **(Tese de Doutorado, Processos Biotecnológicos, UFPR)**, p. 180. 2005.

RAVI, A.V. et al. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.219-223, 2007.

REID, G.; BRUCE, A.W.; FRASER, N.; HEINEMANN, C.; OWEN, J.; HENNING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 30, p. 49-52, 2003.

RENGPIPAT, S.; Phianphak, W.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasveta, P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**. v.167, p.301–313. 1998.

RENGPIPAT, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasaveta, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**. n191, p.271–288, 2000.

RINGØ, E.; LØVMO, L.S.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; MAYHEW, T.M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Res.** 41, 451-467, 2010.

ROCHA, M. F. G.; SILDRIM, J. J. C.; SOARES, A. M.; JIMENEZ, G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Supernatants from Macrophages Stimulated with Microcystin-LR Induce Electrogenic Intestinal Response in Rabbit Ileum. **Pharmacology & Toxicology**. v.85: p. 2-6. 2005.

ROMERO, F.R. et al. Estrategias de control de enfermedades en acuicultura. IN: **II CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA**. p. 624-654. 2003.

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). **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, p. 61, 2008.

SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; PEVA, L.; ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v.191, p.133-144, 2000.

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

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

SUDHEESH, P.S.; XU, H.S. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. **Rev. Aquaculture**. v. 196. p.37-46. 2001.

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

SUGITA, H.; MIZUKI, H.; ITOI, S. Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. **Aquaculture Research**, v. 99, p.1-8, 2011.

THAITHONGNUM, S.; Ratanama, P.; Weeradechapol, K.; Sukhoom, A.; Vuddhakul V. Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. **Aquaculture**. V.261, p.1–9, 2006.

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

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 36, p. 83–87, 2003.

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.

- VILLAMIL, L.; TAFALLA, C.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clin.Diagn. Lab. Immunol.** v. 9, n. (6), p. 1318–1323, 2002.
- VILLAMIL, L.; Figueras, A.; Planas, M.; Novo, B. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. **Aquaculture.** v. 219, p. 43–56, 2003.
- VIEIRA, R.H.S.F. et al. *Vibrio* spp. e suas implicações sobre larviculturas de camarões marinhos. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.33, p.107-112, 2000.
- VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, Stirling, v. 27, p. 319-326.2004.
- WANG, Y.B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 269, 259–264, 2007.
- WASIELESKY JR., W. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396-403, 2006.
- WATSON, K.A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, p. 1–14, 2008.
- WYBAN, J.A.; SWEENEY, J.N. Intensive Shrimp Production Technology. Honolulu, USA: **The Oceanic Institute**, 85 p. 1995.
- ZHOU, X. A.; WANG, YAN-BO; LI, WEI-FEN. 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.
- ZANOLO, R.; YAMAMURA, M.H. Parasitas em tilápias-donilo criadas em sistema de tanques-rede. *Semina: Ciências Agrárias*, v.27, n.2, p.281-288, 2006.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

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

### **Bactérias Gram positivas com potencial probiótico isoladas do camarão marinho cultivado**

Monique Monteiro Pinto <sup>(1)</sup>, Alexandre Duarte Rodrigues da Silva <sup>(1)</sup>, Laelia Reginae Felix Pessoa <sup>(1)</sup>, Juliana Maria Aderaldo Vidal <sup>(2)</sup>, Emiko Shinozaki Mendes <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: moniquemont@hotmail.com, alexandredrs@yahoo.com, pessoaelia@hotmail.com, esmendes@yahoo.com.br; <sup>(2)</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco –Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Departamento de Engenharia de Pesca, Fazenda Saco, s/n – Zona Rural, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-460. Email: julymav@yahoo.com.br

Resumo: O uso de profiláticos não convencionais, como os probióticos, foi a alternativa encontrada para indústria camaroeira, com o intuito de se evitar grandes perdas, econômicas e ambientais, causadas pelas doenças nos animais cultivados. Nesse sentido, foram isoladas, testadas *in vitro* e identificadas bactérias com potencial probiótico provenientes do intestino de camarão marinho cultivado, em dois períodos do ano, estio e chuvoso. Foram coletados 90 animais, sendo 50 na época chuvosa e 40 na de estio, durante o período de abril de 2011 a fevereiro de 2012. Foram obtidos 31 isolados bacterianos testados *in vitro* frente as duas espécies patogênicas, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Oito isolados (28,81%) apresentaram atividade antibacteriana a pelo menos um patógeno. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) na proporção de isolados potenciais probióticos obtidos nas distintas épocas do ano, chuvosa e seca. Os isolados que apresentaram os melhores resultados no teste de antagonismo *in vitro* foram identificados como *Lactobacillus*

*paracasei*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus brevis*. O maior halo de inibição observado no teste de antagonismo foi produzido por *Lactobacillus crispatus* frente ao *V. vulnificus*. Sugere-se a realização de testes de antagonismo *in vivo* para que seja comprovada a efetividade das bactérias como probióticas para camarão marinho.

Termos para indexação: Bactérias probióticas, *Litopenaeus vannamei*, teste de antagonismo, estação do ano.

### **Gram positive bacteria with potential probiotic isolated from cultured marine shrimp**

Monique Monteiro Pinto <sup>(1)</sup>, Alexandre Duarte Rodrigues da Silva <sup>(1)</sup>, Laelia Reginae Felix Pessoa <sup>(1)</sup>, Juliana Maria Aderaldo Vidal <sup>(2)</sup>, Emiko Shinozaki Mendes <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email: moniquemont@hotmail.com, alexandredrs@yahoo.com, pessoaelia@hotmail.com, esmendes@yahoo.com.br; <sup>(2)</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco –Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Departamento de Engenharia de Pesca, Fazenda Saco, s/n – Zona Rural, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-460. Email: julymav@yahoo.com.br

**Abstract:** The use of probiotics as a prophylactic unconventional was a solution found by the shrimp industry aiming avoid major losses, economic and environmental, caused by diseases in crops. In this regard were isolated, tested *in vitro* and identified with bacteria probiotic potential from the intestines of marine shrimp grown in two seasons, summer and rainy. Has been collected 90 animals, 50 in the rainy season and 40 in the summer period from April 2011 to February 2012. Obtained 31 bacterial isolates were tested *in vitro* against dual-known pathogenic species, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) and *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). Eight isolates (28.81%) showed antibacterial activity to at least one pathogen. There was no significant difference (P>

0.05) in the proportion of isolates potential probiotics obtained in different seasons, rainy and dry. Isolates that showed the best results in the test of antagonism *in vitro* were identified as *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus brevis*. The largest zone of inhibition observed in the antagonism test was produced by *Lactobacillus crispatus* opposite *V.vulnificus*. It is suggested the testing of antagonism *in vivo* to be proven the effectiveness of probiotic bacteria as for marine shrimp.

Index Terms: Probiotics bacterias, *Litopenaeus vannamei*, antagonismo test, season.

### Introdução

O uso de bactérias probióticas, para inibir patógenos pela liberação de substâncias antimicrobianas, vem ganhando importância em fazendas de camarão como uma alternativa mais eficaz que administração de antibióticos no gerenciamento da saúde dos camarões (Dantas, 2008). Probióticos são compostos à base de micro-organismos vivos, que atuam por meio de uma série de mecanismos para controlar patógenos presentes nos cultivos de organismos aquáticos (Balcázar et al. 2006), que poderiam ainda ser utilizadas para melhorar a qualidade da água dos cultivos, assim como intensificador da resposta imune e melhorar a nutrição (Verschuere et al. 2000; Sugita et al. 2011; Rengpipat et al. 2000).

Na carcinicultura, as doenças bacterianas, geralmente consideradas como problema secundário, são as grandes causas de perdas econômicas do setor e como meio de inibir ou controlar essas infecções faz-se uso de antimicrobianos. No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode acarretar naturalmente resistência bacteriana, possibilitar transferência dos genes de resistência a outras bactérias que nunca foram expostas aos antibióticos, tornando cada vez mais difícil de serem controladas e erradicadas, além da persistência do antibiótico residual no produto final.

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

Dentre as diversas espécies de camarão cultivado, destaca-se o *Litopenaeus vannamei*, sendo bastante utilizado em todo o mundo por sua alta capacidade de

adaptação em diferentes condições ambientais. *L. vannamei* consegue sobreviver a amplas variações de salinidade (Palacios e Racotta 2007; Maicá et al. 2011), temperatura (Wyban et al. 1995; Ponce-Palafox et al. 1997) e densidade de estocagem (Mcneil 2000; Neal et al. 2010) sendo considerado um animal rústico com bom ganho de peso e conversão alimentar (Wasielesky Jr. et al. 2006; Mishra et al. 2008).

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

O efeito destas bactérias probióticas na redução da mortalidade do camarão contra infecções causadas por *Vibrio* foi descrito em recentes estudos (Vaseeharan e Ramasamy, 2003; Balcazar et al., 2007; Das et al., 2010). Balcázar et al. (2006) citaram que as bactérias probióticas podem reduzir ou eliminar a incidência de micro-organismos patogênicos no intestino. Contudo, a ação das bactérias potencialmente probióticas frente aos micro-organismos patogênicos ainda necessitam de mais pesquisas.

Com isso, o estudo foi realizado com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento sustentável do cultivo do camarão marinho, a partir do conhecimento e uso de bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do *Litopenaeus vannamei*.

## **Material e métodos**

### **Local, coleta e amostras**

Os animais foram coletados em uma fazenda situada no litoral norte do estado de Pernambuco (PE/Brasil), em dois períodos do ano, caracterizado como chuvoso em virtude do alto nível pluviométrico que ocorre nos meses de março a agosto e o de estiagem, com baixo nível pluviométrico, correspondente aos meses de setembro a fevereiro.

Foram realizadas nove coletas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, sendo cinco no período chuvoso e quatro no de estio. Cada amostra foi constituída de 10 animais, tendo sido coletado 50 no período chuvoso e 40 no estio, totalizando 90

animais amostrados. Diante da possibilidade de se isolar diferentes micro-organismos de acordo com a faixa etária e/ou tamanho, os animais analisados estavam 35, 70, 90, 115 e 135 dias de cultivo.

Todos os animais foram transportados vivos, com aeração constante até o momento da realização dos procedimentos iniciais, exame clínico, biometria e coleta do material para as análises (trato intestinal). Os animais se apresentavam aparentemente saudáveis e não haviam sido administrados probióticos.

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

### **Isolamento e estocagem das bactérias do intestino**

De cada animal foi retirado uma porção do intestino em condições assépticas. O órgão foi macerado e adicionado ao Caldo Tripton de Soja (TSB) com o objetivo de possibilitar melhor recuperação da microbiota presente no órgão, sendo em seguida incubado por 24 horas em estufa a 35-37°C.

A partir das culturas em TSB foram realizadas estrias em placas contendo meio de cultivo seletivo ágar Man Rogosa-Sharpe (MRS) e meio não seletivo Plate Count Ágar (PCA), para ampliar a possibilidade de isolamento de bactérias potenciais probióticas, incubadas a 36°C por 24h.

Após o desenvolvimento das bactérias, os diferentes morfotipos (de acordo com coloração, tipo de crescimento, formato da borda, tamanho e textura da colônia) foram selecionados e isolados do meio MRS e PCA para o estoque Trypticase soy ágar (TSA) sem sal e PCA, respectivamente. Após coloração de Gram e análise microscópica, procedeu-se a purificação da colônia, as quais foram armazenadas em criotubo à -80°C, para posteriores testes *in vitro* (Roselet, 2008).

### **Testes de antagonismo *in vitro***

As bactérias isoladas foram confrontadas com duas espécies patogênicas para camarão, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) e *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562). O teste de antagonismo se efetuou por meio do método “bloco de gelose”, descrito por Stern et al. (2006).

De cada isolado foi realizada uma suspensão, referente à escala de MacFarland 0.5, em solução salina 0,85% (NCCLS, 2003). A suspensão foi semeada na superfície

do ágar MRS ou PCA, de acordo com sua derivação, o qual foi incubado por 24 h a 36°C. Discos do ágar MRS e PCA (6 mm de diâmetro), impregnado pela bactéria testada, foram assepticamente retirados e colocados invertidos na superfície de ágar Mueller-Hinton recém semeado com o patógeno. As placas contendo *V. parahaemolyticus* foram incubadas por 24 a 48 horas a 36°C e os com o *V. vulnificus* incubada a 28°C.

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

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

### **Análises estatísticas**

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

### **Resultados e discussão**

De um total de 72 isolados bacterianos obtido do intestino de 90 camarões marinho cultivados, com diferentes dias de cultivo, nas estações chuvosa e de estio, 31 foram selecionados, através de Gram, levando-se em consideração a morfologia e a coloração (bacilos, coco bacilos e cocos Gram +). De acordo com pesquisas recentes, as bactérias dos gêneros *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Bacillus* spp. estão entre os grupos de probióticos mais indicados para aquicultura ( RingØ et al. 2010; Sequeiros et al. 2010; Balcázar et al. 2008; Michel et al. 2007).

Inicialmente, todos os camarões foram examinados para averiguação de saúde aparente, sendo o isolamento bacteriano obtido somente dos animais que não apresentaram alterações e ainda com informações de que não tinham recebido

medicamentos e/ou probiótico. As amostras ainda foram submetidas à biometria, peso e comprimento.

Dos 31 isolados bacterianos confrontados contra dois patógenos no teste de antagonismo, 14 (45,2%) isolados foram obtidos no período chuvoso e 17 (54,8%) no de estio, oito (26%), do total de isolados, apresentou atividade antimicrobiana a pelo menos um dos dois patógenos testados, sendo cinco (62,5%) do período chuvoso e três (37,5%) do estio. Não foi observada diferença significativa ( $P>0,05$ ) na proporção de isolados com potencial probiótico obtidos nas distintas épocas do ano.

Todos os isolados conferiram atividade antimicrobiana pela presença de halo significativo no teste de antagonismo contra o *V. vulnificus* e seis (75%) a ambos os patógenos, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*. Os isolados que apresentaram os melhores resultados no teste de antagonismo, por produzirem maiores halos ou por inibirem todos os patógenos testados, foram identificados como *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Bacillus cereus* (Tabela 1).

Os isolados obtidos no período chuvoso apresentaram melhores desempenhos nos testes de antagonismo. Porém, não se pode afirmar que esse resultado se deva a influência da época do ano, já que nas duas estações pesquisadas os animais apresentavam-se aparentemente sadios e alimentados, sem variação no peso e comprimento, e principalmente, sem diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição produzidos dos isolados.

O isolado de número 1, identificado como, *Lactobacillus crispatus*, foi a bactéria que apresentou o maior halo de inibição frente ao *V. vulnificus* ( $21,40 \pm 0,57$ ), não tendo desenvolvido halo de inibição para o *V. parahaemolyticus*. Esta atividade frente ao *V. vulnificus* é importante, uma vez que Cornélio (2009) relatou que esse micro-organismo é uma das bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus* com potencial probiótico para aquicultura.

Os isolados de números 3, 5 e 8 foram identificados como a mesma bactéria *Lactobacillus brevis*, espécie que apresentou halo de inibição significativo para os dois patógenos testados, com exceção do isolado 3 que produziu halo apenas para o *V. vulnificus*. Em estudo com peixes, Jatobá et al. (2008) observaram a redução na contagem de *Vibrio* spp e a ação potencialmente probiótica do *L. brevis*, após os animais terem sido alimentados com ração suplementada com a cepa dessa bactéria ácido-láctica. Os animais também foram submetidos a testes comparativos de ação

probiótica das bactérias e dos antibióticos, verificaram semelhança da inibição causada por *L. brevis* com a da eritromicina. Li et al. (2007) também observaram efeito inibitório de bactérias probióticas *Lactobacillus* spp. semelhante ao antibiótico clorafenicol.

Villamil et al. (2003) utilizando tratamento com bactérias probióticas, observaram que no cultivo de artêmia, as cepas de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei* eliminaram completamente o *Vibrio alginolyticus* deste microcrustáceo. Entretanto, a eliminação do *Vibrio* na água só foi possível com o uso de *L. brevis*.

O *Lactobacillus paracasei*, o isolado de número 24, apresentou inibição aos dois patógenos testados. Balcázar et al. (2006) já haviam incluído o *L. paracasei* em uma lista das bactérias com potencial probiótico para aquicultura. Em um estudo com aves, o *L. paracasei* quando adicionado a dieta dos animais apresentou atividade inibitória em relação a *Salmonella* Enteritidis (Carli, 2006).

Pozza et al. (2010) utilizando simbiótico combinado com cepa de probiótico de *L. paracasei*, observaram que houve diminuição na contagem de coliformes no íleo e cólon em leitões com 35 a 60 dias.

O isolado de número 14 foi identificado como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, conferiu atividade antimicrobiana aos dois patógenos testados. Em pesquisas recentes alguns autores citaram a ação antagonista do *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* frente a bactéria *V. anguillarum* (Villamil et al., 2002; Balcázar et al., 2007a) e a *V. parahaemolyticus* (Balcázar et al., 2007b). O *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* também apresentou capacidade de modificar a microbiota intestinal do *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo trutta*, estimulando a resposta imune desses animais (Balcázar et al., 2007c).

Cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. isoladas e selecionadas do intestino de camarões *Litopenaeus vannamei*, mostraram ter qualidade probiótica para serem aplicados a animais cultivados, por apresentarem boa capacidade de inibição de patógenos, agindo como imuno estimuladores quando desafiados com *Vibrio alginolyticus* (Ramírez, 2005).

Os isolados de número 25 e número 28 foram identificados como *Bacillus cereus*, este no teste de antagonismo conseguiu inibir os dois patógenos testados. Franco (2009) já havia isolado no intestino de camarão *Litopenaeus vannamei* o *B. cereus* e esses achados corroboram com os de Gomez-Gil et al.(2000), que apontaram para o potencial uso deste micro-organismo como probiótico.

Ravi et al. (2007) também revelaram que *Bacillus cereus* são eficientes na inibição de patógenos em larvas de camarões, como *Vibrio* spp. e *Vibrio harveyi*,

ambos *in vitro* e *in vivo*. Apesar dos bacilos não serem considerados bactérias autóctones, fato que poderia tornar inviável sua utilização como probiótico, muitos apresentam um ciclo de vida duplo, que envolve germinação de esporos, proliferação e re-esporulação sob condições adversas, o que lhes permite crescer e sobreviver no meio ambiente e no intestino de animais, sendo este ciclo a base do seu efeito probiótico (Hong et al., 2005). Não foram encontrados relatos que descrevam *B. cereus* como patogênico para camarões *Litopenaeus vannamei*.

### **Conclusão**

Foram selecionados 31 isolados bacterianos Gram positivo, sendo que apenas 8 apresentaram atividade antimicrobiana aos dois patógenos testados *in vitro*. Os isolados identificados apresentaram atividade inibitória a pelo menos um dos dois patógenos. Algumas espécies com potencial probiótico identificadas nesse estudo já haviam sido isoladas em outras pesquisas recentes com camarão. O uso de probióticos isolados do próprio animal pode representar maior segurança para o organismo e ambiente. Ainda são restritas as pesquisas, específicas, com probióticos e sua utilização em cultivos de *L. vannamei*. Sugere-se a realização de testes de antagonismo *in vivo*, para confirmação da atividade antimicrobiana das bactérias isoladas do intestino do camarão marinho e com isso, possibilitar o uso efetivo de alternativas profiláticas para a manutenção da saúde animal.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos pela apoio e permissão ao uso dos equipamentos e utensílios.

### **Referências**

- 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.
- 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. 14, p. 173–186, 2006.

BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A.C.; MÁRQUEZ, I.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 522–527, 2007.

BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A.C.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J.L. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, p. 188–191, 2008.

BARROS, CAROLINA NOTARO DE. Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá (*Rachycentron canadum*, Linnaeus, 1766) 2012. 58f. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura). – Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

CARLI, E. M. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para controle de *Salmonella* spp em frango de corte. 2006. 82f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (RS), 2006.

DANTAS, DANIELLI MATIAS DE MACÊDO. Desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931) cultivado com uso de probióticos quando submetido à infecção com *Vibrio harveyi*. 2008. 44f. **Dissertação** (Mestrado em Recurso pesqueiro e aquicultura) – Departamento de Pesca e aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2008.

DAS, S., WARD, L.R., BURKE, C., Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture, **Aquaculture**, v. 305, p. 32-41, 2010.

FRANCO, I.; SANTANA, S. R. A; KREWER, C. C.; COSTA, M. M.; ALBINATI, R. C. B.; BAGALDO, A. R. Isolamento e identificação de bactérias candidatas a probióticos em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*. 2009. 90f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal dos Trópicos)-Programa de pós-graduação em Ciência Animal dos Trópicos, Universidade federal da Bahia (BA), 2009.

GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture** v.191, p.259–270. 2000.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, p. 1-14, 2004.

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

JATOBA, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, N.; CELSO, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L. P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-láticas isoladas do trato intestinal de tilápia do Nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v.43, p. 1201-1207, 2008.

LI, K. et al. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 525- 530, 2007.

MAICÁ, PF, BORBA MR, WASIELESKY JR W. Effect of low salinity on microbial flocculation and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero water- exchange super-intensive system. **Aquaculture Research** v. 43, p. 1-10, 2011.

MCNEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. **Global Aquaculture Advocate**, v. 3, n.(3): p. 72–76. 2000.

MICHEL, C.; PELLETIER, C.; BOUSSAHA, M.; DOUET, D.G.; LAUTRAITE, A.; TAILLIEZ, P. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 73, n. (9), p. 2947–2955, 2007.

MISHRA, J.K.; SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; GANDY, R.L.; ALI, A.-M. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition. **Aquacultural Engineering**, v. 38, p. 2–15, 2008.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard—Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6** (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEAL, RS, COYLE SD, TIDWELL JH. Evaluation of Stocking Density and Light Level on the Growth and Survival of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in Zero- Exchange Systems. **Journal of the World Aquaculture Society** v. 41, n. (4): p. 533 544, 2010.

PALACIOS E, RACOTTA IS. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. **Aquaculture** v. 268, p. 123–135, 2007.

PONCE-PALAFIX, J. et al. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v.157, p.107-115, 1997.

POZZA, P. C. et al. Desempenho, microbiota intestinal e peso de órgãos de leitões na fase inicial recebendo rações com simbiótico e probiótico. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1327-1334, set./out., 2010.

RAMIREZ, C. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. Curitiba. **(Tese de Doutorado, Processos Biotecnológicos, UFPR)**, p. 180.2005.

RAVI, A.V. et al. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.219-223, 2007.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**.v. 191, p.271–288, 2000.

RINGØ, E.; LØVMO, L.S.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; MAYHEW, T.M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Res.** v. 41, p. 451-467, 2010.

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).

**Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, p. 61, 2008.

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

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

SUGITA, H.; MIZUKI, H.; ITOI, S. Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. **Aquaculture Research**, v. 99, p. 1–8, 2011.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 36, p. 83–87, 2003.

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.

VILLAMIL, L.; TAFALLA, C.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 9, n. (6), p. 1318–1323, 2002.

VILLAMIL, L.; Figueras, A.; Planas, M.; Novo, B. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. **Aquaculture**. v. 219, p. 43–56, 2003.

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

WYBAN, J.A.; SWEENEY, J.N. Intensive Shrimp Production Technology. Honolulu, USA: **The Oceanic Institute**, 85 p. 1995.

**Tabela 1** - Diâmetros médios ( $\pm$ IC) dos halos de inibição produzidos por isolados

Isol. <sup>(1)</sup>	Potenciais probióticos Identificação	Diâmetros médios dos halos de inibição (mm)	
		VP <sup>(2)</sup>	VV <sup>(3)</sup>
1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	0,00 <sup>Aa</sup>	21,40 $\pm$ 0,57 <sup>Bc</sup>
3	<i>Lactobacillus brevis</i>	5,72 $\pm$ 3,20 <sup>Ab</sup>	6,96 $\pm$ 1,63 <sup>Aa</sup>
14	<i>Lactococcus lactis</i>	6,00 $\pm$ 1,92 <sup>Abc</sup>	9,27 $\pm$ 0,34 <sup>Bb</sup>
24	<i>Lactobacillus paracasei</i>	5,33 $\pm$ 1,70 <sup>Ab</sup>	9,40 $\pm$ 0,79 <sup>Bb</sup>
25	<i>Bacillus cereus</i>	7,73 $\pm$ 3,12 <sup>Ac</sup>	6,43 $\pm$ 2,08 <sup>Aa</sup>
28	<i>Bacillus cereus</i>	7,42 $\pm$ 3,01 <sup>Ac</sup>	6,24 $\pm$ 1,96 <sup>Aa</sup>

IC = Intervalo de confiança; <sup>(1)</sup>Isolados; <sup>(2)</sup>*Vibrio parahaemolyticus*; <sup>(3)</sup>*Vibrio vulnificus*.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) os diâmetros dos halos entre bactérias potenciais probióticas; letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) os diâmetros dos halos entre as bactérias patogênicas.

## **6. ANEXO (Normas para publicação na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)**

### **INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB**

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

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

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

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

#### **Escopo e política editorial**

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal

forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

### **Análise dos artigos**

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

### **Forma e preparação de manuscritos**

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

### **Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos**

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

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

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

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

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

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

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

- A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma: - Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras. - Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, MaterialsandMethods, ResultsandDiscussion, 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 compoñham o título. - Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada. - Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: MultilingualAgricultural 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 seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

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

### **Agradecimentos**

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

## Referências

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

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

### - Artigos de periódicos

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

### - Capítulos de livros

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

### - Livros

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

### - Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. - Fontes eletrônicas EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006. **Citações** - Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

- A autocitação deve ser evitada.

- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação. - Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências. - Redação das citações fora de parênteses

- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

### **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

**Tabelas** - As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.

- Devem ser auto-explicativas.

- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo. - Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo. - Notas de rodapé das tabelas

- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre

parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

**Figuras** - São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante. - As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.

- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto. - Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

### **Notas Científicas**

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

### **Outras informações**

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

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

Embrapa Informação Tecnológica

Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315

CEP 70770 901 Brasília, DF

