

**EMANUELL FELIPE BESERRA DA SILVA**

**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO (*Bacillus* spp.) NA LARVICULTURA  
DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

**RECIFE  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO (*Bacillus* spp.) NA LARVICULTURA DO  
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

**Emanuel Felipe Beserra da Silva**

**Orientador: Dr. Sílvio Ricardo Maurano Peixoto**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Roberta Borda Soares**

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

**RECIFE**  
**2010**

Ficha catalográfica

S586u Silva, Emanuell Felipe Beserra da  
Utilização de probiótico (*Bacillus* spp.) na larvicultura do  
camarão marinho *Litopenaeus vannamei* / Emanuell Felipe  
Beserra da Silva. -- 2010.  
x, 80 f. : il.

Orientador: Sílvio Ricardo Maurano Peixoto.  
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e  
Aqüicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Pesca e Aqüicultura, Recife, 2010.  
Inclui referências e anexo.

1. *Litopenaeus vannamei* 2. Larvicultura 3. Probiótico  
4. *Bacillus* 5. *Vibrio* I. Peixoto, Sílvio Ricardo Maurano,  
Orientador II. Título

CDD 639.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO (*Bacillus spp.*) NA LARVICULTURA DO  
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

**EMANUELL FELIPE BESERRA DA SILVA**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura** e aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, em sua forma final.

---

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Sílvio Ricardo Maurano Peixoto - Orientador  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Borda Soares - Co-orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester - Membro externo  
Universidade Federal do Rio Grande

---

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez - Membro interno  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia - Membro interno (suplente)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Iêda Beserra da Silva (*in memoriam*) e Manoel Luiz da Silva, dos quais tenho o maior orgulho de ser filho.

Minha irmã, Emanuella Fernanda, que apesar da distância, sei o quanto torce por mim.

Minhas tias (mães), Margarida Luiz da Silva, Sueli dos Santos Mattos, Josefa Luiz da Silva e Sebastiana Luiz da Silva. Sinônimos de amor e dedicação. Essa vitória é nossa!

Ao grande amigo Adriano Fernandes Ferreira. Um dos grandes incentivadores para realização desse mestrado. Um exemplo de profissional e ser humano. Muito obrigado por me apontar o caminho.

## AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, por guiar meus passos em todos os momentos e por me proporcionar tantas vitórias.
- ✓ À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, em especial ao prof. Paulo de Paula Mendes (coordenador) e Selma Santiago (secretária) pela enorme atenção e carinho.
- ✓ Aos professores do programa de pós-graduação que contribuíram na minha formação pessoal e profissional.
- ✓ Aos estimados orientadores, Prof. Dr. Silvio Peixoto e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Roberta Soares pela amizade, presteza, sabedoria e competência na orientação deste trabalho. Agradeço também pela confiança e principalmente pelos valiosos ensinamentos que serão eternos.
- ✓ À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de mestrado e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado sanduíche, realizado na Universidade Federal do Rio Grande (FURG) através do programa PROCAD.
- ✓ À empresa Netuno pela doação dos animais utilizados nos experimentos.
- ✓ À empresa INVE na pessoa do Dr. Marcos Santos pela doação do probiótico e rações utilizadas nos experimentos.
- ✓ Aos grandes amigos Nathalia Calazans e Marcelo Soares pela total dedicação e competência na execução deste trabalho e de tantos outros que já realizamos.
- ✓ Às meninas da bacteriologia Joana Vogeley, Bruna do Valle e Roberta Nery pela dedicação e paciência dispensada aos experimentos.
- ✓ Ao Professor Dr. Alfredo Olivera Gálvez por aceitar compor a banca examinadora e pelos inúmeros conselhos e ensinamentos sempre prestados.
- ✓ Ao Professor Dr. Eduardo Ballester por aceitar compor a banca examinadora e pela grande atenção dispensada sempre que precisei. Agradeço pela grande receptividade durante meu estágio na FURG, mas principalmente pelos ensinamentos, não só profissionais como pessoais. Grande Eduardo!
- ✓ Ao professor Dr. William Severi por gentilmente permitir a utilização dos microscópios e lupas do seu laboratório.

- ✓ A todos que fazem parte do Laboratório de Maricultura Sustentável (LAMARSU) e Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), pelo companheirismo e ajuda sempre que precisei.
- ✓ Ao grande amigo Phelps, pela descontração durante os experimentos e principalmente por nos transmitir tanta alegria! “É o preto!!”
- ✓ Aos amigos de turma, em especial a Isabela Bacalhau, Anailza Cristina, Ana Lia, Mirna Tambourgi, Julieta de Fátima, Janilson Félix, Suzianny Maria, Hozana Leite e Paulo Pessoa, por todos os momentos de estudo e descontração.
- ✓ À querida amiga Anailza Cristina (Camocim), por pacientemente ajudar na captura de imagens das larvas, principalmente aos sábados e domingos.
- ✓ À Isabela Bacalhau, uma amizade verdadeira desde a graduação. Agradeço pelo carinho, torcida e principalmente por me transmitir tanta alegria. Sem esquecer daquela tradicional “tesourada” nos intervalos!
- ✓ À Fabiana Penalva por toda amizade e generosidade, sempre disposta a ajudar! Valeu Fabi!
- ✓ A todos que fazem parte da Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da FURG, em especial aos professores Dr. Wilson Wasielesky e Dr. Eduardo Ballester, pelo carinho e dedicação que me dispensaram durante o estágio. Além disso, não poderia deixar de agradecer aos inúmeros amigos: Gabriele de Lara, Paula Maicá, Adriana Ferreira, Sabrina Suíta, Viviana Lisboa, Plínio Furtado, Charles Fróes, Diego Souza, Jonas Motta, Carla Bueno, Dariano Krummenauer, Geraldo Foes e Manoel Valenzuela, pelo companheirismo, amizade, carinho e pelos momentos de alegria e descontração, sem falar nos inúmeros churrascos (que saudades tchê!).
- ✓ À galera do Setor 9, pelos momentos de descontração e principalmente pela amizade. Agradeço especialmente ao querido amigo Jerffeson Castro (*in memoriam*), um exemplo de alegria que nos deixou com uma imensa saudade!
- ✓ 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

A presente dissertação foi composta por dois estudos e dividida em dois artigos científicos, o primeiro avaliou a influência da adição do probiótico *Bacillus* spp. na larvicultura do camarão branco *Litopenaeus vannamei*, enquanto o segundo comparou a utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas da espécie. Para o primeiro estudo, foram realizados três experimentos: (I) Nauplios<sub>4-5</sub> a Zoea<sub>3</sub>, onde foram expostos ao probiótico através da água (P<sub>w</sub>), microalga (P<sub>m</sub>), água e microalga (P<sub>wm</sub>) e controle sem probiótico (C); (II) Mísis<sub>1</sub> a Mísis<sub>3</sub>, expostos ao probiótico através da água (P<sub>w</sub>), *Artemia* (P<sub>a</sub>), água e *Artemia* (P<sub>wa</sub>) e controle (C) e (III) PL<sub>1</sub> a PL<sub>10</sub>, submetidos aos mesmos tratamentos do experimento II. Os parâmetros de qualidade de água não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de cada experimento. Em geral, o peso e sobrevivência dos camarões nos tratamentos com probiótico foram significativamente superiores em comparação aos controles nos experimentos I e II, porém esta diferença não foi observada entre os tratamentos do experimento III. A concentração de *Vibrio* spp. tanto na água quanto nas pós-larvas no experimento III foi significativamente maior no controle comparado com os tratamentos com uso de probiótico. Já nos experimentos I e II, a concentração de *Vibrio* spp. na água não diferiu entre os tratamentos, entretanto, as larvas Mísis<sub>3</sub> tratadas com probiótico apresentaram uma menor concentração de *Vibrio* spp. comparadas com o controle. No segundo estudo, pós-larvas (PL<sub>1</sub> a PL<sub>10</sub>) foram cultivadas em três tratamentos, correspondendo a um tratamento biológico (TB), onde foi adicionado probiótico *Bacillus* spp., tratamento químico (TQ), com adição de antibiótico (eritromicina) e um tratamento controle (TC), sem ambos os produtos na água de cultivo. Os parâmetros de qualidade de água, assim como o desempenho zootécnico das pós-larvas (peso, comprimento total e sobrevivência) não diferiram entre os tratamentos. Entretanto, as concentrações finais de *Vibrio* spp. tanto na água de cultivo como nas pós-larvas foram reduzidas significativamente com a utilização de probiótico (TB) em relação aos outros tratamentos. Com base nos resultados obtidos nos dois estudos, sugere-se que o uso do probiótico *Bacillus* spp. na larvicultura do camarão *L. vannamei* pode proporcionar um incremento no crescimento e sobrevivência dos animais, mas principalmente possibilita uma redução na concentração de *Vibrio* spp. no sistema de cultivo. Além disso, o emprego do probiótico tem grande potencial para substituir o uso de antibiótico no cultivo de pós-larvas de *L. vannamei*.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, larvicultura, probiótico, *Bacillus*, *Vibrio*.



## ABSTRACT

This dissertation consisted of two studies and was divided into two papers, the first evaluated the influence of the addition of probiotic *Bacillus* spp. in the larviculture of white shrimp *Litopenaeus vannamei*, while the second compared the use of probiotic and antibiotic in the postlarvae culture of the species. For the first study, three experiments were performed: (I) Nauplios<sub>4-5</sub> to Zoea<sub>3</sub>, where they were exposed to probiotic through water (P<sub>w</sub>), microalgae (P<sub>m</sub>), water and microalgae (P<sub>wm</sub>) and control without probiotic (C); (II) Mysis<sub>1</sub> to Mysis<sub>3</sub>, exposed to probiotic through the water (P<sub>w</sub>), *Artemia* (P<sub>a</sub>), water and *Artemia* (P<sub>wa</sub>) and control (C) and (III) PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub>, subject to the same treatments of experiment II. The water quality parameters showed no significant differences among treatments of each experiment. In general, the weight and survival of shrimp in the treatments with probiotic were significantly higher compared with controls in experiments I and II, but this difference was not observed among treatments of experiment III. The concentration of *Vibrio* spp. both in the water and postlarvae in experiment III was significantly higher in control compared with treatments with the use of probiotic. Already in experiments I and II, the concentration of *Vibrio* spp. in the water did not differ among treatments, however, Mysis<sub>3</sub> larvae treated with probiotic had a lower concentration of *Vibrio* spp. compared with the control. In the second study, postlarvae (PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub>) were cultured in three treatments, corresponding to a biological treatment (TB), which was added probiotic *Bacillus* spp., chemical treatment (TQ) with the addition of antibiotic (erythromycin) and a control (TC), without both products in the culture water. The water quality parameters, as well as the zootechnical performance of postlarvae (weight, total length and survival) did not differ among treatments. However, the final concentrations of *Vibrio* spp. both in the culture water and postlarvae were significantly reduced with the use of probiotic (TB) in relation to other treatments. Based on the results obtained in the two studies, suggested that the use of probiotic *Bacillus* spp. in the larviculture of shrimp *L. vannamei* can provide an increase in the growth and survival of animals, but mainly provides a reduction in the concentration of *Vibrio* spp. in the culture system. Furthermore, the use of probiotic has great potential to replace the use of antibiotic in the culture of *L. vannamei* postlarvae.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, larviculture, probiotic, *Bacillus*, *Vibrio*.

**SUMÁRIO**

|   | <b>Pág</b> |
|---|------------|
| RESUMO  | VII        |
| ABSTRACT  | VIII       |
| LISTA DE TABELAS  | X          |
| <br>  |            |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 01         |
| 2. OBJETIVOS .....  | 02         |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....   | 02         |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 03         |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....  | 03         |
| 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....  | 10         |
| 4.1. ARTIGO CIENTÍFICO 1: Influence of probiotic ( <i>Bacillus</i> spp.) addition during the larviculture of the white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> ..... | 10         |
| 4.2. ARTIGO CIENTÍFICO 2: Utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco <i>Litopenaeus vannamei</i> .....                   | 31         |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 47         |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 48         |
| ANEXOS .....  | 59         |

## LISTA DE TABELAS

|   |            |
|---|------------|
| <b>ARTIGO CIENTÍFICO 1:</b> Influence of probiotic ( <i>Bacillus</i> spp.) addition during the larviculture of the white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i>   | <b>Pág</b> |
| <b>Table 1:</b> Mean ( $\pm$ SE) values of temperature ( $^{\circ}$ C) dissolved oxygen (mg/L) (D.O), pH, salinity ( $\%$ ), NO <sub>2</sub> (mg/L) and NH <sub>3</sub> (mg/L) of <i>L. vannamei</i> reared with and without <i>Bacillus</i> added to water and microalgae for N <sub>4-5</sub> to Z <sub>3</sub> (Experiment I), added to water and <i>Artemia</i> for M <sub>1</sub> to M <sub>3</sub> (Experiment II) and for PL <sub>1</sub> to PL <sub>10</sub> (Experiment III) ..... | 28         |
| <b>Table 2:</b> Mean ( $\pm$ SE) values of growth and survival of <i>L. vannamei</i> reared with and without <i>Bacillus</i> added to water and microalgae for N <sub>4-5</sub> to Z <sub>3</sub> (Experiment I), added to water and <i>Artemia</i> for M <sub>1</sub> to M <sub>3</sub> (Experiment II) and for PL <sub>1</sub> to PL <sub>10</sub> (Experiment III) .....   | 29         |
| <b>Table 3:</b> Mean ( $\pm$ SE) values of total <i>Vibrio</i> spp. count in water and shrimp <i>L. vannamei</i> reared with and without <i>Bacillus</i> added to water and microalgae for N <sub>4-5</sub> to Z <sub>3</sub> (Experiment I), added to water and <i>Artemia</i> for M <sub>1</sub> to M <sub>3</sub> (Experiment II) and for PL <sub>1</sub> to PL <sub>10</sub> (Experiment III) .....   | 30         |
| <b>ARTIGO CIENTÍFICO 2:</b> Utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco <i>Litopenaeus vannamei</i>   |            |
| <b>Tabela 1:</b> Valores finais médios ( $\pm$ EP) do peso (mg), comprimento (mm) e sobrevivência ( $\%$ ) de pós-larvas (PL <sub>10</sub> ) do camarão <i>L. vannamei</i> cultivados nos tratamentos biológico (TB), químico (TQ) e controle (TC) .....  | 45         |
| <b>Tabela 2:</b> Valores finais médios ( $\pm$ EP) da concentração de <i>Vibrio</i> spp. na água de cultivo (UFC mL <sup>-1</sup> ) e nas pós-larvas (UFC g <sup>-1</sup> ) do camarão <i>L. vannamei</i> cultivados nos tratamentos biológico (TB), químico (TQ) e controle (TC) .....   | 46         |

## 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de camarões vem sendo prejudicada por diversas enfermidades, principalmente aquelas causadas por bactérias patógenas oportunistas (AUSTIN, 1993; MORIARTY, 1999; GOMEZ-GIL et al., 2000), que são consideradas como a maior causa de mortalidade nas larviculturas de camarão, influenciando na produção consistente de pós-larvas (WYBAN e SWEENEY, 1991; WILKENFELD, 1992; DANIELS, 1993).

Entre as bactérias potencialmente patógenas, as do gênero *Vibrio* tem sido as principais responsáveis por doenças em camarões cultivados, especialmente a bactéria luminosa *Vibrio harveyi* (BATICADOS et al., 1990). Na tentativa de controlar a proliferação desses patógenos, diversos antibióticos têm sido amplamente utilizados nas larviculturas comerciais (GATESOUBE et al., 1989), principalmente na América Latina e Sudeste asiático, onde existem poucas restrições para uso destes produtos (GOMEZ-GIL et al., 2000).

O abuso de antibióticos pode resultar no desenvolvimento de bactérias resistentes, característica esta que pode ser rapidamente transferida para outras bactérias, tanto por alterações no genoma existente como por transferência de material genético entre as células (TOWNER, 1995; WESTON, 1996). Estes problemas são ainda mais perigosos se estas substâncias quimioterápicas forem utilizadas profilaticamente no cultivo de camarões peneídeos (BROWN, 1989).

O uso de antibióticos para controlar a proliferação bacteriana geralmente é ineficiente nos dias de hoje. Nas Filipinas, doenças causadas por *Vibrio* spp. (luminescentes) afetaram significativamente a sobrevivência dos camarões e diversas fazendas tiveram que ser fechadas em 1996 (MORIARTY, 1999). Estas espécies de *Vibrio* foram resistentes a todos os antibióticos empregados, incluindo cloranfenicol, furazolidona, oxitetraciclina e estreptomicina, e tornaram-se mais virulentas que nos anos anteriores.

Existe um interesse crescente, tanto do setor produtivo como do mercado consumidor, em controlar ou eliminar o uso de antibióticos na produção de larvas. Desta forma, métodos alternativos precisam ser desenvolvidos para manter o ambiente microbiano saudável nos tanques de larvicultura (IRIANTO e AUSTIN, 2002). Entre estes métodos, o uso de bactérias probióticas para controlar organismos potencialmente patógenos vem se destacando não só por sua eficiência, mas também devido ao conceito de responsabilidade ambiental associado a estes produtos junto ao mercado consumidor.

Os agentes probióticos podem ativamente inibir a colonização de potenciais patógenos no trato digestivo por ação antibiótica, competição por nutrientes e/ou espaço, alteração do metabolismo microbiano ou através da estimulação da imunidade do hospedeiro (GOMEZ-GIL et al., 2000). Probióticos podem ainda aumentar o crescimento e sobrevivência dos camarões cultivados (RENGPIPAT et al. 1998a,b). Mesmo com tantos benefícios em potencial, muitas dúvidas ainda permanecem no setor produtivo e comunidade científica sobre a real eficiência dos probióticos e sobre o custo-benefício de produtos comerciais disponíveis na larvicultura de camarões peneídeos.

Dessa forma, é importante a realização de estudos que avaliem o uso de probióticos na larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, possibilitando determinar a real eficiência desses produtos comerciais sob a produção de larvas e pós-larvas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Otimizar a produção da larvicultura do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* através da aplicação de bactérias probióticas do gênero *Bacillus*.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a eficiência da aplicação do probiótico sob os parâmetros zootécnicos da larvicultura;
- ✓ Analisar a influência do uso do probiótico na qualidade de água;
- ✓ Quantificar a carga de bactérias do gênero *Vibrio* na água de cultivo e nos camarões;
- ✓ Avaliar diferentes vias de aplicação do probiótico;
- ✓ Comparar o uso do probiótico com o antibiótico (eritromicina) no cultivo de pós-larvas.

## 3. REVISÃO DA LITERATURA

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 microrganismo que estimula o crescimento de outro". Parker (1974) foi o primeiro a definir o termo probiótico no sentido de que é usado hoje, conceituando como "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal". Em seguida, Fuller (1989) tentou melhorar a definição de probiótico estabelecida por Parker com a seguinte distinção: "Um suplemento alimentar de microrganismos vivos que tem efeito benéfico ao animal hospedeiro por melhorar seu balanço microbiano intestinal". Em 2001, um comitê de ação conjunta da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (WHO) definiu probiótico como microrganismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas, proporcionam um efeito benéfico ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Na aqüicultura, a interação entre os microrganismos e o hospedeiro não é limitada apenas ao intestino, nesse contexto, Moriarty (1999) sugeriu que a definição de um probiótico para aqüicultura deve incluir a adição de bactérias vivas na água de cultivo. Dessa forma,

Verschuere et al. (2000) definem probióticos como “suplementos microbianos vivos que tem efeito benéfico ao hospedeiro, através da modificação da comunidade microbiana no hospedeiro ou no ambiente, o que proporciona melhorias na utilização dos alimentos, maior resposta imunológica do hospedeiro a doenças, e melhor qualidade de água”.

Diversos benefícios são observados através do uso de probióticos na aquicultura, tais como: exclusão de patógenos por competição, fonte de nutrientes e aumento da atividade enzimática, melhoria na qualidade de água e aumento da resposta imunológica do hospedeiro (BALCÁZAR, 2006).

O processo de exclusão competitiva ocorre através da produção de compostos inibitórios que são antagonicos 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 microrganismos benéficos e potencialmente patogênicos (BALCÁZAR, 2002). 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.

Diversos estudos constataram que bactérias do gênero *Bacillus* secretam diversas exoenzimas, como proteases, carboidrases e lipases, essas são 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).

Probióticos podem ainda melhorar a qualidade de água, de acordo com Wang et al. (2005), houve uma redução nas concentrações de nitrogênio e fósforo na água de cultivo do camarão *L. vannamei* quando o probiótico foi adicionado. Da mesma forma, houve uma melhoria na qualidade de água no cultivo de *P. monodon* com adição de *Bacillus* (DALMIN et al., 2001).

A resposta imune do hospedeiro pode ser influenciada pelo uso de bactérias probióticas. Rengpipat et al. (2000) mencionou que a utilização de *Bacillus* sp. proporcionou uma proteção contra doenças através da ativação tanto das defesas imunológicas humoral e celular no camarão *P. monodon*. Balcázar (2003) demonstraram que a administração de uma mistura de bactérias (*Bacillus* e *Vibrio* sp.) influenciou positivamente no crescimento e sobrevivência de juvenis do camarão branco e apresentou um efeito protetor contra o *Vibrio harveyi* e o vírus da mancha branca (WSSV). De acordo com os autores, essa proteção está relacionada com uma estimulação do sistema imune do animal.

As bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio* são consideradas importantes uma vez que têm grande capacidade de infectar diversos organismos aquáticos, incluindo os camarões peneídeos (LIGHTNER, 1993). De acordo com Moriarty (1999), nas Filipinas, doenças causadas por *Vibrio* spp. (luminescentes) afetaram significativamente a sobrevivência dos camarões e diversas fazendas tiveram que ser fechadas em 1996. Da mesma forma, Decamp et al. (2008) relataram que essas bactérias tem sido causadoras de perdas na larvicultura de peneídeos. No entanto, existem espécies de *Vibrio* que são caracterizadas tanto como benéficas quanto patogênicas para o cultivo de camarões peneídeos. Em estudos realizados com estas bactérias, Gomez-Gil et al. (2000) caracterizaram o *Vibrio alginolyticus* como benéfico ao *L. vannamei*, enquanto Lee et al. (1996) classificaram essa mesma espécie como patogênica ao camarão *P. monodon*. Para a espécie luminescente *Vibrio harveyi*, sua presença



em tanques de cultivo vem sendo associada como causadora de doenças e de muitas perdas durante a larvicultura de peneídeos (VANDENBERGHE et al., 1999).

Na tentativa de controlar infecções bacterianas, ou mesmo da presença de potenciais bactérias patogênicas nos sistemas de larvicultura, a utilização de componentes antimicrobianos (antibióticos) vem sendo realizada principalmente na América Latina e no Sudeste Asiático, onde existem poucas restrições para o uso destes produtos (GOMEZ-GIL et al., 2000). Entretanto, o emprego de antibióticos tem um sucesso limitado na prevenção ou cura das doenças em animais aquáticos (RAVI et al., 2007). Muitas vezes, o antibiótico é aplicado como tratamento profilático, mesmo sem a evidência de algum patógeno, esse fato possibilita a resistência dos vírios ou de outras bactérias aos antibióticos, aumentando a virulência desses patógenos (MORIARTY, 1999).

O uso de bactérias benéficas (probióticas) para substituir potenciais patógenos tem sido amplamente utilizado na indústria de produção animal como alternativa aos antibióticos, e, mais recentemente está também ganhando aceitação para o controle de patógenos na aquicultura (HAVENAAR, 1992). As bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* têm sido usadas como probiótico nos cultivos de camarão, atuando como um biocontrole para reduzir a carga de vírios no hospedeiro e no ambiente de cultivo (RENGPIPAT et al., 2000). Cepas de *Bacillus* produzem um antibiótico que causa aumento nas taxas de mortalidade de *Vibrio* alterando a dominância em favor dos *Bacillus*, mesmo que este antibiótico não seja produzido em quantidades suficientes para eliminar todas as células de *Vibrio* diretamente (MORIARTY, 1999).

Diversas bactérias têm sido utilizadas para o cultivo de larvas de camarões peneídeos, seja através da aplicação direta na água ou através da alimentação via alimento vivo ou rações (OCHOA e OLMOS, 2006). Os primeiros experimentos iniciaram quando operadores de larviculturas desejaram aumentar os níveis de vírios benéficos no sistema, denominados

fermentadores de sacarose (GARRIQUES e WYBAN, 1993). Para atingir esta meta, açúcar foi adicionado em algumas larviculturas para estimular o crescimento dessas espécies de *Vibrio*. Posteriormente, essas bactérias foram cultivadas da mesma forma que microalgas para serem adicionadas aos tanques de larvicultura (GARRIQUES e WYBAN, 1993; DANIELS, 1993). Griffith (1995) relata que após a introdução de probióticos no Equador em 1992 os volumes de produção nas larviculturas aumentaram 35% e o uso de antibióticos foi reduzido em 94%. Moriarty (1998) demonstrou que é possível aumentar a produção de camarões pela adição de *Bacillus*, alterando assim a composição bacteriana da água dos tanques.

Bactérias *Bacillus* S11 isoladas no habitat natural de *P. monodon* foram administrados no cultivo desta espécie a partir de pós-larvas. Após 100 dias de cultivo, o crescimento e sobrevivência dos indivíduos foram significativamente superiores nos tratamentos com probióticos comparados ao controle sem adição do produto (RENGPIPAT et al., 1998a). Estes autores realizaram, ao final do experimento, um desafio de imersão dos camarões por 10 dias em meio inoculado com o patógeno *V. harveyi*, resultando em 100% de sobrevivência nos indivíduos tratados com o probiótico em comparação com apenas 26% sem a utilização do produto. Posteriormente, esta mesma bactéria provou ser eficiente no aumento da resposta imunológica através da atividade de fagocitose na hemolinfa de *P. monodon*, resultando em uma maior proteção contra doenças e aumento da sobrevivência (RENGPIPAT et al., 2000).

O emprego de um probiótico comercial (Bacillogen-zinc) e culturas puras contendo *Bacillus pumilus* e *Vibrio fluvialis*, considerados probióticos poderosos, foram estudados para larvas de *Marsupenaeus japonicus*. Os resultados após sete dias de cultivo revelaram aumentos de 95% na sobrevivência das larvas comparados com o controle, sendo que com o uso do produto comercial a sobrevivência chegou a 97% (EL-SERSY et al., 2006). GARRIQUES e WYBAN (1993) observaram que larvas de *L. vannamei* cultivadas com probióticos ficaram maiores e mais ativas, e o sistema de cultivo ficou livre de bactérias

luminescentes patogênicas. A inoculação de cepas de bactérias probióticas nos tanques de cultivo de *L. vannamei* preveniu a colonização por bactéria patogênicas mesmo quando estas foram também inoculadas propositalmente no sistema. De acordo com Ziaei-Nejad et al. (2006), a adição do probiótico *Bacillus* spp. no cultivo de diferentes estágios de larvas do camarão *Fenneropenaeus indicus* proporcionou uma maior sobrevivência dos animais e um aumento na atividade das enzimas lipase, protease e amilase no trato digestivo dos camarões. Da mesma forma, quando o probiótico *B. coagulans* SC8168 foi adicionado no cultivo de larvas e pós-larvas de *L. vannamei*, houve um aumento na sobrevivência dos animais (ZHOU et al., 2009).

Além dos exemplos citados da eficiência de probióticos com base no gênero *Bacillus*, bactérias gram-positivas do gênero *Streptomyces* foram incorporadas em diferentes concentrações na alimentação durante 25 dias na larvicultura de *P. monodon* (DAS et al., 2006). Os resultados dos tanques experimentais tratados com probiótico mostraram uma melhor qualidade de água do que no tratamento controle e redução significativa na quantidade de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos presentes na água. O crescimento e sobrevivência das pós-larvas aumentaram com a elevação das concentrações de células de *Streptomyces*.

De mesma forma, a bactéria *Pseudomonas* spp. PS-102 selecionada em ambiente estuarino mostrou alta eficiência em inibir diversas bactérias patogênicas como *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* e *Aeromonas* spp. Os resultados encorajam o uso de *Pseudomonas* sp. PS 102 como agente probiótico em sistemas aquícolas (VIJAYAN et al., 2006). Uma cepa de *Arthrobacter* XE-7, isolada em *Penaeus chinensis* foi avaliada como um potencial probiótico na larvicultura desta espécie. Estudos in-vitro demonstraram o antagonismo contra *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* e *V. nereis* (BEIPING-TAN et al., 2006).

De acordo com todas estas informações pode-se sugerir que a adição de probióticos com cepas de *Bacillus* proporcionam efeitos benéficos na larvicultura de camarões peneídeos, entretanto, embora exista um consenso sobre os benefícios da redução ou eliminação do uso de antibióticos em substituição ao emprego de probióticos nos sistemas de cultivo, as informações ainda são dispersas e dependem principalmente das recomendações dos fabricantes destes produtos. Dessa forma, o presente estudo apresenta os efeitos da utilização do probiótico *Bacillus* spp. na larvicultura do camarão branco *Litopenaeus vannamei*, além de apresentar um comparativo do cultivo de pós-larvas com probiótico e antibiótico.

#### 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

##### 4.1. ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico *Aquaculture*.

Influence of probiotic (*Bacillus* spp.) addition during the larviculture of the white shrimp

*Litopenaeus vannamei*

Emanuell Silva\*, Marcelo Soares, Nathalia Calazans, Joana Vogeley, Bruna do Valle, Roberta Soares, Silvio Peixoto

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aqüicultura,  
Laboratório de Maricultura Sustentável, 52171-900, Recife, PE, Brazil

\*Corresponding author – contact information:

Phone: +55 81 3320-6524

Email: emanuelfelipe@yahoo.com.br

## Abstract

The influence of the addition of *Bacillus* probiotic during the larviculture of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* was examined in three separate experiments: (I) Nauplius<sub>4-5</sub> to Zoea<sub>3</sub>, which were exposed to probiotic in the water (P<sub>w</sub>), only in the microalgae (P<sub>m</sub>), in the water and microalgae (P<sub>wm</sub>) and control (C); (II) Mysis<sub>1</sub> to Mysis<sub>3</sub>, which were exposed to probiotic in the water (P<sub>w</sub>), only in *Artemia* (P<sub>a</sub>), in the water and *Artemia* (P<sub>wa</sub>) and control (C); (III) PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub>, which were exposed to similar treatments of experiment II. There were no significant differences for all water quality factors measured among treatments of each experiment. In the experiment I, the wet weight for larvae treated with probiotic was significantly higher compared to the control, while in experiment II, P<sub>w</sub> showed the highest wet weight followed by P<sub>a</sub> which was higher than the other treatments. The total length showed no significant differences among treatments in all experiments. The larvae survival rate increased in probiotic treatments for experiments I and II. In experiment III, there were no significant differences for the postlarvae zootechnical parameters among treatments, but total *Vibrio* concentration was higher in the controls (water and shrimp) when compared to probiotic treatments. The concentration of *Vibrio* in the water for experiment I and II did not differ among treatments, however, Mysis<sub>3</sub> treated with probiotic showed the lowest concentration of *Vibrio* compared with the control. Overall, results suggest that the use of *Bacillus* probiotic during the larviculture of *L. vannamei* can provide an increase in the survival and growth of the animals, but mainly can reduce the load of *Vibrio* in the culture system.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Bacillus*, *Vibrio*, probiotic, larviculture, survival

## 1. Introduction

Bacterial diseases are considered to be a major cause of mortality in shrimp larviculture (Wyban and Sweeney, 1991; Wilkenfeld, 1992) which has resulted in decrease in quality, quantity and regularity of shrimp production (Bachère et al., 1995; Mialhe et al., 1995; Selvin and Lipton, 2003). A large number of Gram-negative bacteria of the genus *Vibrio* have been reported as causing losses in penaeid larviculture. These opportunistic bacteria are normally present in the culture facilities, as well as in the larval gut flora and in the live feed, and usually cause disease under sub-optimal culture conditions (Decamp et al., 2008).

In an attempt to control bacterial infections, or even the presence of potential pathogens in hatchery systems, the use of antibiotics has been performed mostly in Latin America and Southeast Asia, where there are few restrictions on the use of these products (Gomez-Gil et al., 2000). However, excessive use of antibiotic can lead to the emergence of resistant bacteria and increase its virulence (Moriarty, 1999; Verschuere et al., 2000). Thus, the use of probiotics in the culture of aquatic organisms has been increasing with the demand for more environment-friendly aquaculture practices (Gatesoupe, 1999).

Probiotics are defined as “live microorganisms, which when are consumed in adequate amounts, confer a health benefit for the host” (Reid et al., 2003). However, in aquaculture probiotics can be administered either as a food supplement or as an additive to the water (Moriarty, 1998). Several benefits have been associated with the use of probiotics in the culture of aquatic organisms such as creation of a hostile environment for pathogens by the production of inhibitory compounds, supply of essential nutrients and enzymes resulting in enhanced nutrition of the cultured animal, improvement of water quality, lower incidence of diseases by enhancement immune response of host species and higher survival (Boyd and

Massaaut, 1999; Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil et al., 2000; Verschueren et al., 2000; Irianto and Austin, 2002; Balcázar et al., 2006).

*Bacillus* bacteria has been widely used as probiotics in aquaculture, they constitute a diverse group of rod-shaped, Gram-positive bacteria, characterized by their ability to produce a robust spore (Ninawe and Selvin, 2009). These bacteria compete for nutrients and thus inhibit the rapid growth of *Vibrio* and other bacteria, this fact allows that resistant bacteria do not multiply and do not transfer resistance genes (Hong et al., 2006). Furthermore, many different antibiotic compounds are naturally produced by a range of *Bacillus* species (Moriarty 1998). Studies have shown that when *Bacillus* were administered as probiotics for *Penaeus monodon*, growth and survival were improved and immunity was enhanced (Rengpipat et al. 1998a,b, 2000). Similarly, Ziaei-Nejad et al. (2006) observed an increase in survival and growth of *Fenneropenaeus indicus* in treatments that *Bacillus* was added.

The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of *Bacillus* spp. used as probiotic in different development stages of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during the larviculture.

## **2. Materials and Methods**

This study conducted three separate experiments to evaluate different ways of applying the probiotic (*Bacillus* spp.) in different development stages of white shrimp *L. vannamei*.

### **2.1. Experimental animals**

The different larval stages used in this study were obtained from the spawning of domesticated broodstock in a commercial hatchery (Maricultura Netuno S/A) located in Pernambuco, Brazil. These animals were transferred to our laboratory in the previous stage of



development needed for each experiment (Nauplius<sub>3-4</sub>, Zoea<sub>3</sub> and Mysis<sub>3</sub> for experiments I, II and III, respectively). Larvae were maintained in a fiberglass tank (80 L) under constant aeration, temperature of 27-28 °C and salinity 34-35‰ until the metamorphosis. The water was supplemented with the microalgae *Chaetoceros calcitrans* at a concentration of  $12 \times 10^4$  cells/ml. Food consisted of specific commercial diets (INVE-Frippak) for *L. vannamei* larvae (Zoea and Mysis), offered every two hours. Additionally, in Mysis stage, frozen *Artemia* nauplii was offered *ad libitum* once daily.

## 2.2. Experimental design

The treatments of each experiment had four replications and five liter plastic containers were used as experimental tanks, which were maintained under constant aeration and ambient temperature of 27-28 °C.

The commercial probiotic used in this study (INVE Sanolife<sup>®</sup> MIC) contained spores of *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* and *B. pumilus* in the concentration of  $5.0 \times 10^{10}$  CFU/g. The concentration of probiotic used in the water followed manufacturer's recommendations for shrimp larviculture, where it was added daily in the amount of 0.5 ppm ( $2.5 \times 10^4$  CFU/ml) for Nauplius<sub>4-5</sub> to Zoea<sub>2</sub> and 1.0 ppm ( $5.0 \times 10^4$  CFU/ml) from Zoea<sub>3</sub> to PL<sub>10</sub>.

Feed diets for *L. vannamei* (INVE-Frippak) specific to Zoea (1 CAR), Mysis (2CD), PL<sub>1-4</sub> (3CD) and PL<sub>5-10</sub> (PL+300) were offered every 2 hours in all treatments from each experiment. During all experiments, the water quality factors such as temperature, dissolved oxygen, pH, and salinity were monitored daily using a multiparameter sensor (YSI 556). Nitrite (NO<sub>2</sub>) and ammonia (NH<sub>3</sub>) concentrations were measured by photolorimetry (ALFAKIT-AT10P) in the first and last day of experiment I and II, and the first, fifth and tenth day of the experiment III.

### 2.2.1. Experiment I

The influence of the addition of probiotic on the larviculture of early larval stages, Nauplius<sub>4-5</sub> (N<sub>4-5</sub>) to Zoea<sub>3</sub> (Z<sub>3</sub>), was performed in Experiment I. Larvae were stocked in experimental tanks at the density of 100 nauplii per liter. The experiment lasted four days, and there was no renewal of water during this period. The treatments consisted of addition of probiotic only in the water (P<sub>w</sub>), only in the microalgae (P<sub>m</sub>), in the water and microalgae (P<sub>wm</sub>) and control (C), where no probiotic was administered. The probiotic used through microalgae was added daily in the amount of 2 ppm (10.0x10<sup>4</sup> CFU/ml) in the culture of *C. calcitrans* to its exponential phase (third day of culture), then it was added daily in the treatments. Microalgae without probiotic addition were cultured in similar conditions to be used in all experiments. The microalgae *C. calcitrans* cultured with or without probiotic was maintained at the concentration of 20 x 10<sup>4</sup> cells/ml.

### 2.2.2. Experiment II

In this experiment the influence of the addition of probiotic was examined on stages Mysis<sub>1</sub> to Mysis<sub>3</sub> (M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub>). Larvae were stocked in experimental tanks at the density of 50 larvae per liter. The experiment lasted three days, and there was no renewal of water during this period. The treatments consisted of addition of probiotic only in the water (P<sub>w</sub>), only in *Artemia* (P<sub>a</sub>), in the water and *Artemia* (P<sub>wa</sub>) and control (C), where the probiotic was not used. For addition of probiotic via *Artemia*, cysts were hatched (2 g of cysts per liter of gently aerated 35‰ seawater) with 4 ppm (20.0x10<sup>4</sup> CFU/ml) of probiotic in the water for 18 hours, then the nauplii were separated from the cysts and 4 ppm of probiotic was added again. After 10 hours the nauplii were harvested and offered to shrimp three times daily (1200, 1600 and 2000 h) at a rate of 6-7 nauplii/larvae. *Artemia* without probiotic was cultured following the

same protocol to be used in other treatments. The microalgae *C. calcitrans* was maintained in all treatments at the concentration of  $15 \times 10^4$  cells/ml.

### 2.2.3. Experiment III

The addition of probiotic was examined in the culture of the first postlarvae PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub> in experiment III. Postlarvae were stocked in experimental tanks at the density of 50 shrimp per liter. The experiment lasted 10 days and 10% of the tank water was exchanged every day. The treatments tested in this experiment were similar to those used in experiment II. *Artemia* nauplii cultured with the same methodology of experiment II was added two times daily (1600 and 2000 h) at a rate of 15 nauplii/postlarvae. The microalgae *C. calcitrans* was maintained in all treatments at the concentration of  $12 \times 10^4$  cells/ml.

### 2.3. Estimation of growth and survival

To estimate final growth of M<sub>3</sub> and Z<sub>3</sub>, samples of 25 larvae per experimental tank were randomly selected at the end of each experiment to determine the total length (mm). Larval images were captured in a microscope (40x) connected to a video camera, computer-digitized and analyzed using the software ImageTool version 2.0 for Windows (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX,USA). Body wet weight (mg) was also recorded for 50 larvae sampled from each tank of the experiments I and II. These larvae were blotted dry on tissue paper and weighed together in analytical balance with precision of 0.0001 g. In experiment III, 100 postlarvae of each tank were weighed together following the same procedure described. To determine the total length (mm), 15 postlarvae from each tank were measured using a digital caliper. Final survival (%) was determined by counting the animals in each experimental tank.

## 2.4. Bacteriological analysis

At the end of each experiment, samples of water and shrimp were analyzed to determine counts of total *Vibrio* spp. Water samples from each experimental tank were serially diluted with sterilized saline solution (3.5% NaCl) and plated (0.1 ml) in TCBS Agar (TCBS Agar, Himedia). After the incubation period of 24 hours at 30 °C the number of colonies on each plate was counted, only considering the plates containing between 25 and 250 colonies (Downes and Ito, 2001).

The estimation of *Vibrio* concentration in shrimp was performed by randomly sampling 50 larvae per tank from the experiment I and II, and 100 postlarvae per tank from experiment III. Larvae and postlarvae were washed with sterile distilled water, followed by sterile saline solution (3.5% NaCl) to remove external bacteria. Then the samples were macerated, diluted and plated, following the same methodology described for the analysis of water.

## 2.5. Data analysis

The values of water quality factors, growth, survival and the concentration of *Vibrio* spp. in the water and shrimp were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test to determine differences among treatments. Survival data were arcsine transformed for analysis, but only original values are presented. Results are presented as means  $\pm$  standard error (SE).

# 3. Results

## 3.1. Water quality factors

The values of the water quality factors are shown in Table 1. There was no significant difference for all factors measured among treatments of each experiment. Temperature varied

from 27.40 to 28.28 °C, dissolved oxygen from 4.58 to 5.52 mg/L and pH varied from 8.15 to 8.26. Salinity of 34‰ was maintained in all experiments. Values of nitrite (NO<sub>2</sub>) between experiments I and III ranged from 0.03 to 0.06 mg/L, however, in experiment II, nitrite concentration was not detected in all treatments. For ammonia (NH<sub>3</sub>), the values observed in experiment I and II ranged between 0.06 and 0.12 mg/L, while experiment III showed values from 0.74 to 0.80 mg/L.

Insert Table 1

### 3.2. Growth and survival of shrimp

In the first experiment, the wet weight of shrimp treated with probiotic (0.22 to 0.23 mg) was significantly higher compared to the control (0.16 mg) (Table 2). For experiment II, shrimp in treatment P<sub>w</sub> showed the highest wet weight followed by P<sub>a</sub> which was higher than the treatments P<sub>wa</sub> and C that did not differ between them. There was no significant difference in shrimp wet weight among treatments in experiment III, with values ranging from 2.31 to 2.41 mg. Values of total length showed no significant differences among treatments with or without probiotic in all experiments (Table 2).

Insert Table 2

The shrimp survival rates of treatments P<sub>w</sub> (80.6%) and P<sub>m</sub> (80.5%) in experiment I were significantly higher when compared with the control (67.5%), however, treatment P<sub>wm</sub> (76.1%) did not differ from the other treatments (Table 2). In experiment II, the treatments in which the probiotic was added showed a significantly higher survival (83.4 to 85.6%) compared to control (62.9%). There was no significant difference in survival among

treatments with or without probiotic in experiment III, with values ranging from 73.6 to 80.7% (Table 2).

### 3.3. Bacterial development

In  $Z_3$  stage (experiment I), *Vibrio* bacteria were not detected in the water samples of all treatments tested. However, the concentration of *Vibrio* in shrimp varied from 0.15 to  $0.41 \times 10^4$  CFU/larvae, which did not differ among treatments (Table 3). In the experiment II, the concentration of *Vibrio* in  $M_3$  showed a significantly higher value in the control ( $0.75 \times 10^4$  CFU/larvae) when compared to treatments where the probiotic was used (maximum of  $0.19 \times 10^4$  CFU/larvae). The development of *Vibrio* in the water, which did not differ among treatments, showed values ranging from 3.13 to  $5.53 \times 10^4$  CFU/ml (Table 3).

Insert Table 3

The values found in experiment III showed that the concentration of *Vibrio* in the water and shrimp ( $PL_{10}$ ) was significantly higher in the control compared to treatments with the use of probiotic (Table 3). The maximum concentration of *Vibrio* in the water was  $2.51 \times 10^4$  CFU/ml for the treatments with probiotic, while the control reached the concentration of  $4.12 \times 10^4$  CFU/ml. For shrimp, total *Vibrio* count reached  $792 \times 10^4$  CFU/g in the control, while the treatments with probiotic showed a maximum value of  $88.6 \times 10^4$  CFU/g.

## 4. Discussion

The use of probiotics in aquaculture can provide an improvement in water quality factors (Wang et al. 2005). Lakshmanan and Soundarapandian (2008) investigated the effect of commercial probiotics (*Bacillus* spp.) on culture of shrimp *P. monodon* and observed that

probiotics could significantly reduce the concentrations of nitrite and ammonia in pond water compared with the control. However, the present findings found no obvious effect of probiotic on the water quality, which may be explained by the good management, adequate supply of feed, low densities of culture and short time tests. Our results are in agreement with Zhou et al. (2009) that observed no significant difference between treatments with probiotic and control in the culture of larvae and postlarvae of *L. vannamei*. Similarly, the use of *B. fusiformis* at a concentration of  $10^5$  CFU/ml in larviculture of *P. monodon* and *L. vannamei* (Z<sub>1</sub> to PL<sub>1</sub>) did not affect water quality when compared with treatment without probiotic (Guo et al., 2009). Water quality factors found in all the experiments in the present study were unremarkable and considered safe for shrimp culture (Menasveta et al., 1989; Boyd, 1990; Menasveta et al., 1991).

The addition of *Bacillus* probiotic significantly improved survival for the first larvae (Zoea and Mysis) in the present study. Zhou et al. (2009) observed that application of probiotic *B. coagulans* SC8168 in the culture water had beneficial effects on the survival rate of *L. vannamei* larvae. Similarly, the application of *Bacillus* spp. in the water or via *Artemia* in the culture of *F. indicus* larvae resulted in a higher survival in treatments with probiotic compared to controls (Ziaei-Nejad, 2006). The survival increase observed in probiotic treatments of experiment II is probably related with the action of *Bacillus*. Verschuere et al. (2000) and Moriarty (1998) reported that *Bacillus* are able to compete with other bacteria, such as *Vibrio*, for nutrients and space, but also may exclude other bacteria by producing antibiotics, increasing their proportion in the gut flora of shrimp. This may be associated with the highest concentration of *Vibrio* found in the control ( $0.75 \times 10^4$  CFU/larvae) compared with treatments with probiotic (maximum of  $0.19 \times 10^4$  CFU/larvae). However, in the experiment I the higher shrimp survival in probiotic treatments did not correspond to higher concentrations of *Vibrio* in these animals when compared to the control. This may be associated to a greater

immunity acquired by the larvae (N<sub>4-5</sub> to Z<sub>3</sub>) reared with *Bacillus*, which may have brought greater survival compared to control. The addition of *Bacillus* S11 in the culture of *P. monodon* increased survival and had positive effects on the immune response and disease resistance against the luminescent bacterium *V. harveyi* (Rengpipat et al., 2000). Similarly, Li et al. (2007) observed that the shrimp *L. vannamei* reared with addition of *B. licheniformis* demonstrated promising immune response stimulation. The survival results obtained for treatments of experiment I also may be related to the possible presence of non-pathogenic *Vibrio* species in the larvae. According to Gomez-Gil et al. (2000), there are species of *Vibrio* characterized as both beneficial and pathogenic for penaeids. These authors characterized the *Vibrio alginolyticus* as beneficial to *L. vannamei*, while Lee et al. (1996) classified the same species as pathogenic to *P. monodon*.

Previous studies reported that *Bacillus* bacteria secrete many exoenzymes, such as proteases, carbohydrases and lipases, which are very efficient in breaking down a large variety of proteins, carbohydrates and lipids into smaller units (Moriarty, 1996, 1998; Arellano and Olmos, 2002; Ochoa and Olmos, 2006; Ninawe and Selvin, 2009). Furthermore, these authors argued that this process may contribute to enhance digestion and increase absorption of food, which in turn could improve shrimp growth. Accordingly, our results showed that the body wet weight of the first larvae phase was incremented by the addition of probiotic. Ziaei-Nejad et al. (2006) reported that the weight of *F. indicus* in stages N<sub>1-2</sub> to Z<sub>3</sub> did not differ significantly when cultured with or without probiotic, however, from M<sub>1</sub> to PL<sub>1-2</sub>, higher weight was observed in shrimp treated with probiotic. This same study showed no difference between treatments in relation to total length, which was also observed in our study within each developmental stage.

The bacteria of the genus *Bacillus* have been widely used as probiotic in shrimp culture to act as a biocontrol, reducing the concentration of *Vibrio* in the host and in the water



(Skjermo and Vadstein, 1999; Rengpipat et al., 2000). Ziaei-Nejad et al. (2006) added daily probiotic *Bacillus* in the water at a concentration of  $7.3 \times 10^6$  CFU/ml during the culture of larvae and postlarvae of *F. indicus*, and observed a higher concentration of these bacteria in relation to total bacteria, which may include the vibrios. In contrast, our results indicated that the concentration of *Vibrio* in the water (Experiment II) was not influenced by the use of probiotic, which is possible to be related to the lower concentration of probiotic used ( $5.0 \times 10^4$  CFU/ml). Additionally, *Vibrio* were not detected in the water during experiment I, which may be a result of the absence of *Artemia* addition in the system, as conducted in the experiments II and III. Live feeds such as *Artemia* represent a significant vector risk in the transfection of bacterial contaminants and subsequent infectious disease in larval cultures (Verdonck et al., 1994; Lopez-Torres and Lizárraga-Partida, 2001). In contrast, microalgae employed in shrimp hatcheries usually have a natural bacterial load between  $10^4$  and  $10^7$  CFU/ml of heterotrophic bacteria but rarely vibrios (Lizárraga-Partida et al., 1997).

In experiment III, the action of *Bacillus* probably was responsible for the lower concentration of *Vibrio* in the shrimp and water in treatments with probiotic compared to control. Nevertheless, these results did not influence the zootechnical parameters (wet weight, total length and survival) among the treatments. In many cases, the vibrios are opportunists, causing disease and mortality in animals only when they are physiologically stressed (Alderman and Hastings, 1998). Therefore, we must consider that similar growth performance and survival among treatments during the culture of PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub> occurred due to lack of physiological stress by the maintenance of adequate environmental conditions and food supply during the experiment.

This study also tested the effectiveness of the use of probiotic via *Artemia* and microalgae, which showed satisfactory results in the transfer of probiotic for shrimp, however, these procedures have resulted in similar growth, survival and concentration of *Vibrio* when

compared to treatments with probiotic added directly in the water. Therefore, the additional labor and expense involved in these procedures could not be a cost effective solution. Overall, the results of this study suggested that the use of *Bacillus* probiotic during the larviculture of *L. vannamei* can provide an increase in the survival and growth of animals, but mainly can reduce the load of *Vibrio* in the culture system.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the company INVE for providing the probiotic used in the experiments. This study was supported by the Pernambuco State Council of Science and Technology (FACEPE) and the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq). S. Peixoto is research fellow of CNPq.

### **5. References**

- Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Tech.* 33, 139-155.
- Arellano, C.F., Olmos, S.J., 2002. Thermostable  $\alpha$ -1,4- and  $\alpha$ -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus* sp. Isolated from a marine environment. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 791-795.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boul, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17-32.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173-186.
- Boyd, C.E., Massaaut, L., 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquac. Eng.* 20, 113-132.

- Boyd, C.E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Auburn, AL.
- Decamp, O., Moriarty, D.J.W., Lavens, P., 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquac. Res.* 39, 334-338.
- Downes, M.P., Ito, K., 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association (APHA), 4th edition, Washington.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259-270.
- Guo, J., Liu, K., Cheng, S., Chang, C., Lay, J., Hsu, Y., Yang, J., Chen, T., 2009. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. *Aquac. Res.* 40, 609-618.
- Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2006. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 813-835.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 25, 633-642.
- Lakshmanan, R., Soundarapandian, P., 2008. Effect of commercial probiotics on large scale culture of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Res. J. Microbiol.* 3, 198-203.
- Lee, K., Yu, S., Chen, F., Yang, T., Liu, P., 1996. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Curr. Microbiol.* 32, 229-231.
- Li, K., Zheng, T., Tian, Y., Xi, F., Yuan, J., Zhang, G., Hong, H., 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.* 29, 525-530.
- Lizárraga-Partida, M., Montoya-Rodríguez, L., Gentrop-Funes, V., 1997. The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries. *Cienc. Mar.* 23, 129-140.

- Lopez-Torres, M.A., Lizárraga-Partida, M.L., 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture* 194, 11-20.
- Menasveta, P., Fast, A.W., Piyatiratitivorakul, S., Rungsupha, S., 1991. An improved closed seawater recirculation maturation system for giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquac. Eng.* 10, 173-181.
- Menasveta, P., Aranyakanonda, P., Rungsupha, S., Moree, N., 1989. Maturation and larviculture of penaeid prawns in closed recirculation seawater system. *Aquac. Eng.* 8, 357-368.
- Mialhe, E., Bachère, E., Boulo, V., Cadoret, J.P., 1995. Strategy for research and international cooperation in marine invertebrate pathology, immunology and genetics. *Aquaculture* 132, 33-41.
- Moriarty, D.J.W., 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Eds.), *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, pp. 237-243.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351-358.
- Moriarty, D.J.W., 1996. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. *Infofish Int.* 4, 29-33.
- Ninawe, A.S., Selvin, J., 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 43-66.
- Ochoa, S.J.L., Olmos, S.J., 2006. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiol.* 23, 519-525.

- Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T.R., 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 37, 105-118.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271-288.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 1998a. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167, 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: Flegel, T.W. (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Selvin, J., Huxley, A.J., Lipton, A.P., 2004. Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. *Aquaculture* 230, 241-248.
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333-343.
- Verdonck, L., Swings, J., Kersters, K., Dehasque, M., Sorgeloos, P., Leger, P., 1994. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. *J. World Aquac. Soc.* 25, 55-59.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 655-671.
- Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S., 2005. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. *Fish. Sci.* 71, 1034-1039.

- Wilkenfeld, J.S., 1992. Commercial hatchery status report: an industry panel viewpoint. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 71–86.
- Wyban, J.A., Sweeney, J.N., 1991. Intensive Shrimp Production Technology. The Oceanic Institute, Honolulu, 158 pp.
- Zhou, X., Wang, Y., Li, W., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture 287, 349-353.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252, 516-524.

Table 1: Mean ( $\pm$  SE) values of temperature ( $^{\circ}$ C) dissolved oxygen (mg/L) (D.O), pH, salinity ( $\%$ ), NO<sub>2</sub> (mg/L) and NH<sub>3</sub> (mg/L) of *L. vannamei* reared with and without *Bacillus* added to water and microalgae for N<sub>4-5</sub> to Z<sub>3</sub> (Experiment I), added to water and *Artemia* for M<sub>1</sub> to M<sub>3</sub> (Experiment II) and for PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub> (Experiment III)

|                | Treatments      | Temp.            | D.O             | pH               | Sal. | NO <sub>2</sub>   | NH <sub>3</sub>  |
|----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|------|-------------------|------------------|
| Experiment I   | P <sub>w</sub>  | 28.28 $\pm$ 0.19 | 4.72 $\pm$ 0.06 | 8.15 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.03              | 0.12 $\pm$ 0.009 |
|                | P <sub>m</sub>  | 28.22 $\pm$ 0.19 | 4.71 $\pm$ 0.05 | 8.16 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.05 $\pm$ 0.006  | 0.06 $\pm$ 0.01  |
|                | P <sub>wm</sub> | 28.23 $\pm$ 0.19 | 4.65 $\pm$ 0.05 | 8.16 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.039 $\pm$ 0.006 | 0.06 $\pm$ 0.02  |
|                | C               | 28.16 $\pm$ 0.22 | 4.58 $\pm$ 0.05 | 8.16 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.03              | 0.10 $\pm$ 0.02  |
| Experiment II  | P <sub>w</sub>  | 27.47 $\pm$ 0.16 | 5.46 $\pm$ 0.04 | 8.16 $\pm$ 0.01  | 34   | ND                | 0.07 $\pm$ 0.01  |
|                | P <sub>a</sub>  | 27.41 $\pm$ 0.17 | 5.50 $\pm$ 0.02 | 8.16 $\pm$ 0.006 | 34   | ND                | 0.08 $\pm$ 0.01  |
|                | P <sub>wa</sub> | 27.40 $\pm$ 0.18 | 5.52 $\pm$ 0.02 | 8.17 $\pm$ 0.005 | 34   | ND                | 0.09 $\pm$ 0.01  |
|                | C               | 27.42 $\pm$ 0.17 | 5.49 $\pm$ 0.02 | 8.16 $\pm$ 0.006 | 34   | ND                | 0.10 $\pm$ 0.01  |
| Experiment III | P <sub>w</sub>  | 28.15 $\pm$ 0.19 | 4.98 $\pm$ 0.05 | 8.26 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.03 $\pm$ 0.009  | 0.75 $\pm$ 0.10  |
|                | P <sub>a</sub>  | 28.05 $\pm$ 0.19 | 4.85 $\pm$ 0.08 | 8.26 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.03 $\pm$ 0.006  | 0.76 $\pm$ 0.07  |
|                | P <sub>wa</sub> | 28.08 $\pm$ 0.19 | 4.91 $\pm$ 0.05 | 8.24 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.06 $\pm$ 0.01   | 0.74 $\pm$ 0.10  |
|                | C               | 28.19 $\pm$ 0.17 | 4.90 $\pm$ 0.08 | 8.26 $\pm$ 0.01  | 34   | 0.03 $\pm$ 0.009  | 0.80 $\pm$ 0.09  |

ND = Not detected

Table 2: Mean ( $\pm$  SE) values of final growth and survival of *L. vannamei* reared with and without *Bacillus* added to water and microalgae for N<sub>4-5</sub> to Z<sub>3</sub> (Experiment I), added to water and *Artemia* for M<sub>1</sub> to M<sub>3</sub> (Experiment II) and for PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub> (Experiment III)

|                | Treatments      | Wet weight (mg)              | Total length (mm)            | Survival (%)                 |
|----------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Experiment I   | P <sub>w</sub>  | 0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 2.62 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 80.6 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>  |
|                | P <sub>m</sub>  | 0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 2.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 80.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>  |
|                | P <sub>wm</sub> | 0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 2.62 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 76.1 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup> |
|                | C               | 0.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> | 2.62 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 67.5 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>  |
| Experiment II  | P <sub>w</sub>  | 1.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 3.43 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> | 85.6 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>  |
|                | P <sub>a</sub>  | 0.61 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> | 3.46 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> | 83.4 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>  |
|                | P <sub>wa</sub> | 0.45 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup> | 3.37 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> | 83.7 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>  |
|                | C               | 0.48 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup> | 3.34 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> | 62.9 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>  |
| Experiment III | P <sub>w</sub>  | 2.31 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup> | 7.55 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> | 77.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>  |
|                | P <sub>a</sub>  | 2.41 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup> | 7.65 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | 73.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>  |
|                | P <sub>wa</sub> | 2.37 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> | 7.42 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> | 80.7 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>  |
|                | C               | 2.39 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 7.68 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 74.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>  |

Different superscript letters in the same column within the same experiment indicate significant differences ( $p < 0.05$ )



Table 3: Mean ( $\pm$  SE) values of total *Vibrio* spp. count in water and shrimp *L. vannamei* reared with and without *Bacillus* added to water and microalgae for N<sub>4-5</sub> to Z<sub>3</sub> (Experiment I), added to water and *Artemia* for M<sub>1</sub> to M<sub>3</sub> (Experiment II) and for PL<sub>1</sub> to PL<sub>10</sub> (Experiment III)

|                   | Stages             | Treatments      | <i>Vibrio</i> spp. counts         |   |
|-------------------|--------------------|-----------------|-----------------------------------|---|
|                   |                    |                 | Water<br>(10 <sup>4</sup> CFU/ml) | Shrimp<br>(10 <sup>4</sup> CFU/sample)* |
| Experiment<br>I   | Zoea <sub>3</sub>  | P <sub>w</sub>  | ND                                | 0.27 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | P <sub>m</sub>  | ND                                | 0.41 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | P <sub>wm</sub> | ND                                | 0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | C               | ND                                | 0.34 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>            |
| Experiment<br>II  | Mysis <sub>3</sub> | P <sub>w</sub>  | 4.24 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>      | ND <sup>a</sup>                         |
|                   |                    | P <sub>a</sub>  | 4.15 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>      | 0.19 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | P <sub>wa</sub> | 5.53 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>      | 0.18 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | C               | 3.13 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>      | 0.75 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>            |
| Experiment<br>III | PL <sub>10</sub>   | P <sub>w</sub>  | 2.51 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>      | 71.3 $\pm$ 31.4 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | P <sub>a</sub>  | 2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>      | 82.0 $\pm$ 35.0 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | P <sub>wa</sub> | 2.04 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>      | 88.6 $\pm$ 62.7 <sup>a</sup>            |
|                   |                    | C               | 4.12 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>      | 792.0 $\pm$ 327.3 <sup>b</sup>          |

Different superscript letters in the same column (within the same ontogenic stage and experiment) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). ND = Not detected

\* in experiment I and II, “CFU/larvae”, in experiment III, “CFU/g”

## 4.2. ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo científico a ser submetido para publicação na Revista *Ciência Rural*.

### Utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco

*Litopenaeus vannamei*

The use of probiotic and antibiotic in the culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei*  
postlarvae

Emanuell Silva<sup>1,II\*</sup>, Marcelo Soares<sup>II</sup>, Nathalia Calazans<sup>III</sup>, Joana Vogeley<sup>II</sup>, Roberta  
Nery<sup>III</sup>, Roberta Soares<sup>IV</sup>, Silvio Peixoto<sup>IV</sup>

### RESUMO

Este estudo teve como objetivo comparar o efeito da utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. O experimento consistiu de três tratamentos com quatro repetições cada, correspondendo a um tratamento biológico (TB), onde foi adicionado probiótico (*Bacillus* spp.), tratamento químico (TQ), com adição de antibiótico (eritromicina) e controle (TC), sem adição de ambos os produtos na água de cultivo. Pós-larvas no primeiro dia após a metamorfose (PL<sub>1</sub>) foram estocadas na densidade de 50 pós-larvas L<sup>-1</sup> em cada recipiente experimental de 5 litros. O experimento teve duração de 10 dias, onde diariamente foram monitorados os parâmetros de qualidade de água e ao final foram feitas análises morfológicas dos animais. A concentração de *Vibrio* spp. na água e

---

<sup>I\*</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Departamento de Pesca e Aqüicultura – Laboratório de Maricultura Sustentável. Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: emanuelfelipe@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Mestrando em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura – UFRPE.

<sup>III</sup>Graduando em Engenharia de Pesca – UFRPE.

<sup>IV</sup>Professor adjunto do Departamento de Pesca e Aqüicultura – UFRPE.

nas pós-larvas foi quantificada no início e final do experimento. Não houve diferença significativa quanto aos parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao peso final (2,31 a 2,67 mg), comprimento final (7,55 a 7,68 mm) e sobrevivência dos camarões (74,8 a 77,7%). Porém, as concentrações finais de *Vibrio* spp. na água de cultivo e nas pós-larvas foram reduzidas significativamente com a utilização de probiótico (TB) comparado com os outros tratamentos. Os resultados sugerem que o emprego do probiótico *Bacillus* spp. tem grande potencial para substituir o antibiótico eritromicina no cultivo de pós-larvas de *L. vannamei*, com possíveis benefícios para a sanidade das pós-larvas cultivadas, além de seguir princípios de aquicultura responsável.

**Palavras-chave:** larvicultura, probiótico, *Vibrio*, sobrevivência, *Bacillus*, crescimento.

## ABSTRACT

This study aimed to compare the effect of the use of probiotic and antibiotic in the culture of white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. The experiment consisted of three treatments with four replicates each, corresponding to a biological treatment (TB), which was added probiotic (*Bacillus* spp.), chemical treatment (TQ) with the addition of antibiotic (erythromycin) and control (CT) without addition of both products in the culture water. Postlarvae in the first day after metamorphosis (PL<sub>1</sub>) were stocked at a density of 50 postlarvae L<sup>-1</sup> in each of the 5 liter experimental containers. The experiment lasted 10 days, where daily were monitored water quality parameters and at the final were performed morphological analysis of the animals. The concentration of *Vibrio* spp. in the water and postlarvae was measured at the beginning and final of the experiment. There was no significant difference in the water quality parameters among treatments. Similarly, no significant difference among treatments was observed for the final weight (2.31 to 2.67 mg),

final length (7.55 to 7.68 mm) and survival of shrimp (74.8 to 77.7%). However, the final concentrations of *Vibrio* spp. in the water and postlarvae were significantly reduced with the use of probiotic (TP) compared with the other treatments. The results suggest that the use of probiotic *Bacillus* spp. has great potential to replace the antibiotic erythromycin in the culture of *L. vannamei* postlarvae, with potential benefits to the postlarvae health and following the principles of responsible aquaculture.

**Key words:** larviculture, probiotic, *Vibrio*, survival, *Bacillus*, growth.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversas doenças infecciosas vêm provocando diminuição na produção de *Litopenaeus vannamei* (GULLIAN et al., 2004). Durante a fase de larvicultura, as doenças provocadas por bactérias são tidas como a maior causa de mortalidade (WYBAN & SWEENEY, 1991), dentre estas, as do gênero *Vibrio* vem sendo as mais associadas com essa problemática (RUANGPAN & KITAO, 1991).

As bactérias do gênero *Vibrio* são consideradas importantes, uma vez que têm grande capacidade de infectar diversos organismos aquáticos, como os camarões peneídeos (LIGHTNER, 1993). No entanto, existem espécies de *Vibrio* que são caracterizadas tanto como benéficas quanto patogênicas para o cultivo de camarões peneídeos. Em estudos realizados com estas bactérias, GOMEZ-GIL et al. (2000) caracterizaram o *Vibrio alginolyticus* como benéfico ao *L. vannamei*, enquanto LEE et al. (1996) classificaram essa mesma espécie como patogênica ao camarão *Penaeus monodon*. Para a espécie luminescente *Vibrio harveyi*, sua presença em tanques de cultivo vem sendo associada como causadora de doenças e de muitas perdas durante a larvicultura de peneídeos (VANDENBERGHE et al., 1999).

Na tentativa de controlar infecções bacterianas, ou mesmo da presença de potenciais bactérias patogênicas nos sistemas de larvicultura, a utilização de componentes antimicrobianos (antibióticos) vem sendo realizada principalmente na América Latina e no Sudeste Asiático, onde existem poucas restrições para o uso destes produtos (GOMEZ-GIL et al., 2000). Entretanto, o emprego de antibióticos tem um sucesso limitado na prevenção ou cura das doenças em animais aquáticos (RAVI et al., 2007). Muitas vezes, o antibiótico é aplicado como tratamento profilático, mesmo sem a evidência de algum patógeno, esse fato possibilita a resistência dos vírios ou de outras bactérias aos antibióticos, aumentando a virulência desses patógenos (MORIARTY, 1999).

Como uma estratégia no controle de doenças, o uso de bactérias benéficas (probióticos) tem sido sugerido em substituição ao uso de antibióticos (GATESOUBE, 1999; RAVI et al., 2007). O termo probiótico foi definido por GATESOUBE (1999) para aquelas células microbianas que são administradas de modo a entrar no trato gastrointestinal e manterem-se vivas, com a finalidade de melhorar a saúde do hospedeiro. De acordo com VIEIRA et al. (2000), as bactérias probióticas tem potencial para substituir os antibióticos por não poluir o ambiente, não selecionar cepas resistentes, além de possibilitar um melhor crescimento de pós-larvas de camarão em laboratório.

As bactérias do gênero *Bacillus* têm sido usadas como probiótico nos cultivos de camarão, atuando como um biocontrole para reduzir a carga de vírios no hospedeiro e no ambiente de cultivo (RENGPIPAT et al., 2000). Algumas espécies de *Bacillus* são facilmente encontradas em sedimentos marinhos e naturalmente presentes nas brânquias, cutícula e trato intestinal de organismos bentônicos, tais como os camarões (SHARMILA et al., 1996). A partir de estudos sobre a utilização de bactérias probióticas no cultivo do *L. vannamei*, GULLIAN & RODRÍGUEZ (2002) evidenciaram que as bactérias benéficas da microflora intestinal são competidoras em potencial de cepas patogênicas.

Na larvicultura de camarões peneídeos, embora exista um consenso sobre os benefícios da redução ou eliminação do uso de antibióticos em substituição ao emprego de probióticos nos tanques de cultivo, as informações ainda são dispersas e dependem principalmente das recomendações dos fabricantes destes produtos.

Considerando a importância deste tema, o presente estudo teve como objetivo comparar o efeito da utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Procedência dos animais**

As pós-larvas utilizadas no experimento foram obtidas no setor de larvicultura da empresa Netuno, localizada em Sirinhaém, Pernambuco. Larvas no estágio de Mísis<sub>3</sub> foram mantidas em um tanque de 80 litros de volume útil sob aeração constante, temperatura de 28°C e salinidade 34‰. A alimentação consistiu de ração comercial para *L. vannamei* (INVE-Frippak, 2CD) ofertada a cada duas horas e náuplios de *Artemia* congelados ofertados *ad libitum* uma vez ao dia (18:00h). A microalga *Chaetoceros calcitrans* foi mantida no tanque na concentração de  $12 \times 10^4$  células ml<sup>-1</sup>. Quando atingiu o estágio de PL<sub>1</sub> (1 dia de vida na fase de pós-larva), os animais foram transferidos para as parcelas experimentais.

### **Delineamento experimental**

O experimento consistiu de três tratamentos com quatro repetições cada, correspondendo a um tratamento biológico (TB), onde foi adicionado probiótico (*Bacillus* spp.), tratamento químico (TQ), com adição de antibiótico (eritromicina) e controle (TC), sem adição de ambos os produtos na água de cultivo.

Foram utilizados como parcelas experimentais potes plásticos com volume útil de 5 litros, onde 50 pós-larvas L<sup>-1</sup> (PL<sub>1</sub>) foram estocadas em cada recipiente. A água utilizada no experimento foi previamente filtrada (0,5 µm) e clorada (15 ppm) por 24 horas. As parcelas experimentais foram distribuídas de forma aleatória em sala com fotoperíodo controlado (12h claro: 12h escuro). Uma aeração suave com pedra porosa foi mantida constantemente em cada recipiente.

No tratamento TB foi adicionado diariamente na água de cultivo 1 ppm de probiótico comercial (INVE Sanolife<sup>®</sup> MIC), contendo cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* na concentração de 5x10<sup>10</sup> UFC g<sup>-1</sup>, conforme recomendado pelo fabricante. No tratamento TQ, os procedimentos adotados seguiram a metodologia de acordo com Ballester (2009 - Informe verbal). A eritromicina foi utilizada como substância antibiótica, onde 1 ppm foi adicionado na água apenas no primeiro dia do experimento, e a partir do segundo foi adicionada formalina diariamente na quantidade de 10 ppm. A água de todos os tratamentos teve uma renovação diária de 10%.

A alimentação consistiu de rações comerciais (INVE-Frippak 3CD e INVE-Frippak PL+300) ofertada dez vezes ao dia (a cada duas horas) e 15 náuplios de *Artemia* por pós-larva ofertados duas vezes ao dia (16:00 e 20:00 h). A microalga *C. calcitrans* foi mantida nos tratamentos na concentração de 12x10<sup>4</sup> células ml<sup>-1</sup>.

Durante o experimento, os parâmetros de qualidade de água como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade foram mensurados diariamente através de um medidor multiparâmetro (YSI 556). Os compostos nitrogenados como nitrito (NO<sub>2</sub>) e amônia (NH<sub>3</sub>) foram mensurados no primeiro, quinto e décimo dia de experimento através de um fotocolorímetro (ALFAKIT-AT10P).

O experimento foi finalizado após 10 dias quando os camarões atingiram o estágio de PL<sub>10</sub>. Nesta oportunidade, pós-larvas foram quantificadas para determinação da sobrevivência

(%), e o peso final (mg) foi obtido através da pesagem conjunta de 100 animais de cada parcela experimental em uma balança de precisão (0,0001 g), após a remoção do excesso de umidade em papel absorvente. Para avaliação do comprimento total (medida entre as extremidades do rostro e do telson, mm), 15 animais de cada parcela experimental foram mensurados com um paquímetro digital.

### **Análise bacteriológica**

A concentração de *Vibrio* spp. na água de cultivo e no camarão foi monitorada no primeiro e último dia do experimento, sendo a água inicial analisada antes do povoamento das parcelas experimentais. Para estimar a concentração de *Vibrio* spp. na água foram realizadas diluições seriadas decimais das amostras das parcelas experimentais em solução salina esterilizada (3,5% NaCl) e posterior plaqueamento de uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição em Agar TCBS (Agar TCBS, Himedia). Após o período de incubação de 24h em estufa a 30°C, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC ml<sup>-1</sup>) nas placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias (DOWNES & ITO, 2001).

Para contagem de *Vibrio* spp. nos animais, tanto a amostragem inicial, como a final, foi realizada pela amostra aleatória de 100 indivíduos, sendo a primeira feita antes da estocagem dos tratamentos e a segunda nas parcelas experimentais ao término do experimento. As amostras de camarão foram lavadas com água destilada esterilizada, seguida de solução salina esterilizada (3,5% NaCl) para remoção das bactérias externas. Em seguida as amostras foram maceradas, diluídas e plaqueadas, seguindo a mesma metodologia descrita para a análise de água.



### **Análise dos dados**

Para determinar diferenças significativas entre os tratamentos, os valores dos parâmetros de qualidade de água, peso, comprimento, sobrevivência e concentração de *Vibrio* spp. foram submetidos à análise de variância (ANOVA) levando em consideração as premissas necessárias. O teste Tukey de separação de médias foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Statistica 7.0.

### **RESULTADOS**

Os parâmetros de qualidade de água não diferiram significativamente entre os tratamentos. Os valores médios e erros padrões ( $\pm$  EP) dos dados agrupados apresentaram temperatura de  $28,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , pH de  $8,25 \pm 0,01$  e oxigênio dissolvido de  $5,0 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ . A salinidade de todos os tratamentos foi mantida em 34‰. A amônia ( $\text{NH}_3$ ) e o nitrito ( $\text{NO}_2$ ) apresentaram valores médios gerais de  $0,74 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,03 \pm 0,009 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

Para as variáveis peso e comprimento dos camarões, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Essa mesma tendência foi observada para a sobrevivência, que apresentou valores de 74,8 a 77,7% (Tabela 1).

A análise bacteriológica inicial não constatou a presença de *Vibrio* spp. na água de cultivo, entretanto, as pós-larvas ( $\text{PL}_1$ ) apresentaram uma concentração média de  $11,54 \times 10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$ . Para a análise bacteriológica final, a concentração de *Vibrio* spp. na água de cultivo dos tratamentos TB e TQ não apresentaram diferenças significativas entre si, no entanto, os mesmos apresentaram valores significativamente inferiores quando comparados com o tratamento TC (Tabela 2).

Com relação à quantidade de *Vibrio* spp. nas pós-larvas ao final do experimento, o tratamento TB apresentou uma concentração significativamente inferior em comparação com os tratamentos TQ e TC, os quais não diferiram entre si (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Os parâmetros de temperatura e salinidade obtidos nesse estudo estiveram dentro das faixas adequadas para o cultivo de pós-larvas do camarão *L. vannamei*, recomendadas por PONCE-PALAFIX et al. (1997). Estes autores observaram que o cultivo de pós-larvas em temperaturas entre 28 a 30°C e salinidades entre 33 a 40‰ resultou em melhores taxas de sobrevivência e crescimento para a espécie. Da mesma forma, o oxigênio dissolvido, pH, amônia e nitrito registrados no presente estudo estiveram de acordo com o recomendado para o cultivo de camarões (BOYD, 1990).

A sobrevivência das pós-larvas no tratamento com adição de probiótico (*Bacillus* spp.) na água não diferiu dos demais tratamentos testados. Este resultado corrobora com o estudo realizado por GUO et al. (2009) para *P. monodon*, onde a adição diária de *B. fusiformis* na água ( $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>) durante os estágios Zoa<sub>1</sub> e PL<sub>1</sub>, não resultou em diferença significativa na taxa de sobrevivência (88,7%) quando comparado com o tratamento controle (73,3%). Entretanto, estes autores observaram que quando o mesmo procedimento foi realizado na larvicultura de *L. vannamei*, houve uma maior sobrevivência no tratamento com adição de *B. fusiformis* (87,9%), o qual diferiu significativamente do controle (41,2%). Os autores sugerem que esta baixa sobrevivência das larvas sem adição de *B. fusiformis* ocorreu devido à presença de espécies de *Vibrio* spp. na larvicultura.

Os valores de ganho de peso encontrados no presente estudo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, entretanto, ZIAEI-NEJAD et al. (2006) observaram que o camarão *Fenneropenaeus indicus* cultivados com probiótico (*Bacillus*

spp.), entre os estágios de Mísis<sub>1</sub> a PL<sub>14</sub>, apresentou um maior ganho de peso quando comparado com o tratamento sem uso de probiótico. Por outro lado, esses autores não observaram diferenças significativas quanto ao comprimento dos camarões, o que está de acordo com os resultados desse estudo.

Os tratamentos TQ e TC apresentaram uma concentração mais elevada de *Vibrio* spp. no camarão do que o tratamento TB, porém, esta maior concentração não afetou a sobrevivência dos mesmos. Em muitos casos, os víbrios são oportunistas, causando doenças e mortalidades em animais apenas quando esses se encontram fisiologicamente estressados (ALDERMAN & HASTINGS, 1998). Provavelmente, os resultados obtidos para o crescimento e sobrevivência, os quais não diferiram entre os tratamentos, se deve a manutenção de condições ambientais e alimentares adequadas durante o experimento, onde os camarões não foram submetidos ao estresse fisiológico. De acordo com RENGPIPAT et al. (2000), a redução do estresse pode ser usada para aumentar a resistência dos camarões a doenças, sendo que estresse causado pela má qualidade de água, por exemplo, pode deixar os camarões suscetíveis aos patógenos presentes no meio.

A redução da concentração inicial de *Vibrio* spp. nas larvas de  $11,54 \times 10^6$  para  $0,71 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> ao final do experimento com utilização de probiótico está provavelmente relacionada com a atividade das bactérias do gênero *Bacillus*, as quais são capazes de competir com outras bactérias por nutrientes e espaço, como também podem excluir outras bactérias através da produção de antibióticos (MORIARTY, 1998; VERSCHUERE et al., 2000). Em experimento conduzido *in vitro*, a atividade inibitória de bactérias do gênero *Bacillus* contra as do gênero *Vibrio* foi avaliada em meio TCBS, indicando que cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e outras espécies mostraram atividade inibitória contra um grande número de cepas de *Vibrio* (DECAMP et al., 2008). Estes autores também compararam a adição de probiótico (*Bacillus* spp.) com um tratamento profilático (antibiótico) e um

controle, no cultivo de *P. monodon* entre os estágios de Náuplio e PL<sub>10</sub>. Os resultados indicaram que a adição de probiótico ou antibiótico diminuiu consideravelmente a concentração de *Vibrio* spp. na água em comparação com o tratamento sem estes produtos, o que corrobora com os resultados observados no presente estudo.

Os resultados obtidos nesse estudo indicaram que a utilização de antibiótico através da água de cultivo parece não ser eficiente contra o crescimento de *Vibrio* spp. nas pós-larvas de *L. vannamei*. Outro fato relevante é que os antibióticos podem favorecer o surgimento de bactérias resistentes a esses medicamentos, podendo ocorrer ineficiência desses até mesmo na água onde os animais estão sendo cultivados (DEFOIRDT et al., 2007). COSTA et al. (2008) detectaram cepas de *Vibrio* multiresistentes aos antibióticos, coletadas nas águas e nos camarões *L. vannamei* cultivados em fazendas no estado do Ceará, Brasil.

## CONCLUSÕES

O uso de probiótico ou antibiótico no cultivo de pós-larvas de *L. vannamei* não influenciou no crescimento e sobrevivência dos animais, entretanto, a adição de probiótico foi mais eficiente para a diminuição da concentração de possíveis bactérias patogênicas do gênero *Vibrio*, tanto na água como nas pós-larvas cultivadas. Sugere-se que o emprego do probiótico *Bacillus* spp. seja adequado para substituir a utilização do antibiótico eritromicina no cultivo de pós-larvas de *L. vannamei*, devido aos possíveis benefícios para a sanidade das pós-larvas cultivadas, além de seguir princípios de aquicultura responsável.

Ballester (2009) - Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester - Técnico responsável pelo setor de larvicultura da Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Carcinicultura, CEP- 96201-900, Rio Grande, RS. E-mail: elcballester@yahoo.com.br - Informações prestadas durante visita técnica realizada na instituição.

## REFERÊNCIAS

- ALDERMAN, D.J.; HASTINGS, T.S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks. **International Journal of Food Science and Technology**, v.33, p.139-155, 1998.
- BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Auburn, AL, 1990. 482p.
- COSTA, R.A. et al. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp. isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, n.6, p.458-462, 2008.
- DECAMP, O. et al. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, v.39, p.334-338, 2008.
- DEFOIRDT, T. et al. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. **Trends in Biotechnology**, v.25, p.472-479, 2007.
- DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association (APHA)**, 4th edition, 2001. 600p.
- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147-165, 1999.
- GOMEZ-GIL, B. et al. 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.; RODRÍGUEZ, J. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Manejo de enfermedades em camarones. In: CONGRESO ECUATORIANO DE ACUICULTURA, 6., 2002, Ecuador. **Anais do Congresso Ecuatoriano de Acuicultura**, p.47-49.

- GULLIAN, M. et al. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, p.1-14, 2004.
- GUO, J. et al. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. **Aquaculture Research**, v.40, p.609-618, 2009.
- LEE, K. et al. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Current Microbiology**, v.32, p.229-231, 1996.
- LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: MCVEY, J.P. **CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture**, FL, v.1, p.393-486, 1993.
- MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164, p.351-358, 1998.
- MORIARTY, D.J.W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: BELL, C.R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999, p. 237-243.
- PONCE-PALAFOX, 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.
- 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. et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v.191, p.271-288, 2000.
- RUANGPAN, L.; KITAO, T. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. **Journal of Fish Diseases**, v.14, p.383-388, 1991.

SHARMILA, R. et al. Bacterial flora of semi-intensive pond reared *Penaeus indicus* (H.Milne Edwards) and the environment. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.11, p.193-203, 1996.

VANDENBERGHE, J. et al. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2592-2597, 1999.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.655-671, 2000.

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.

WYBAN, J.A.; SWEENEY, J.N. Intensive shrimp production technology: **the Oceanic Institute shrimp manual**, USA, 1991. 158p.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v.252, p.516-524, 2006.

Tabela 1: Valores finais médios ( $\pm$  EP) do peso (mg), comprimento (mm) e sobrevivência (%) de pós-larvas (PL<sub>10</sub>) do camarão *L. vannamei* cultivados nos tratamentos biológico (TB), químico (TQ) e controle (TC).

| Variáveis     | Tratamentos                  |                              |                              |
|---------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|               | TB                           | TQ                           | TC                           |
| Peso          | 2,31 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup> | 2,67 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> | 2,39 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> |
| Comprimento   | 7,55 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup> | 7,58 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup> | 7,68 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup> |
| Sobrevivência | 77,7 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>  | 75,9 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup> | 74,8 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>  |

Letras distintas entre mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



Tabela 2: Valores finais médios ( $\pm$  EP) da concentração de *Vibrio* spp. na água de cultivo (UFC mL<sup>-1</sup>) e nas pós-larvas (UFC g<sup>-1</sup>) do camarão *L. vannamei* cultivados nos tratamentos biológico (TB), químico (TQ) e controle (TC).

| Concentração de <i>Vibrio</i> spp. | Tratamentos                               |   |   |
|------------------------------------|---|---|---|
|                                    | TB  | TQ  | TC  |
| Água                               | 2,51 $\pm$ 0,18 $\times$ 10 <sup>4a</sup> | 2,72 $\pm$ 0,32 $\times$ 10 <sup>4a</sup> | 4,12 $\pm$ 0,26 $\times$ 10 <sup>4b</sup> |
| Pós-larvas                         | 0,71 $\pm$ 0,31 $\times$ 10 <sup>6a</sup> | 4,22 $\pm$ 1,58 $\times$ 10 <sup>6b</sup> | 7,92 $\pm$ 3,27 $\times$ 10 <sup>6b</sup> |

Letras distintas entre mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo indicaram que a utilização do probiótico *Bacillus* spp. na larvicultura do camarão *Litopenaeus vannamei* proporciona um incremento no crescimento e sobrevivência dos animais, mas principalmente reduz a carga de bactérias do gênero *Vibrio* no sistema de cultivo. Para o cultivo de pós-larvas, a comparação do uso de probiótico e antibiótico (eritromicina) no sistema não influenciou no crescimento e sobrevivência dos animais, entretanto, a adição de probiótico foi mais eficiente na redução da concentração de *Vibrio* spp. tanto na água como nas pós-larvas. Adicionalmente, dentro das condições de cultivo utilizadas no presente estudo, não foi detectada influência do probiótico *Bacillus* spp. nos parâmetros de qualidade de água.

Com os resultados obtidos, sugere-se que o probiótico comercial com cepas de *Bacillus* pode ser utilizado para incrementar a produção na larvicultura de *L. vannamei* e principalmente reduzir a concentração de possíveis bactérias patogênicas no cultivo, evitando com isso o uso de antibióticos. Entretanto, com a grande diversidade de probióticos comerciais, a realização de novos estudos é de fundamental importância para estabelecer os reais benefícios do uso desses produtos na larvicultura de *L. vannamei*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERMAN, D.J.; HASTINGS, T.S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 139-155, 1998.

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.

AUSTIN, B. Environmental issues in the control of bacterial diseases of farmed fish. In: Pullin, R.S.V.; Rosenthal, H.; Maclean, J.L. (Eds.). *Environment and Aquaculture in Developing Countries*. ICLARM Conference Proceedings 31. ICLARM, Manila, 1993, p. 237-251.

BACHÈRE, E. et al. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. **Aquaculture**, v. 132, p. 17-32, 1995.

BALCÁZAR, J.L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173-186, 2006.

BALCÁZAR, J.L. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador, 2003.

BALCÁZAR, J.L. Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In: DE BLAS, I. (Ed.). *Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, Zaragoza, Spain, 2002, p. 877-881.

BATICADOS, M.C.L. et al. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 9, p. 133-139, 1990.

BEIPING TAN, J.L. et al. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. **Aquaculture**, v. 253, p. 140-147, 2006.

BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v. 20, p. 113-132, 1999.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Auburn, AL, 1990. 482p.

BROWN, J.H. Antimicrobials: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture*, v. 20, p. 34-43, 1989.

COSTA, R.A. et al. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp. isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

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

DALMIN, G.; KATHIRESAN, K.; PURUSHOTHAMAN, A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 939-942, 2001.

DAS, S.; LYLA P.S.; KHAN, S.A. Application of Streptomyces as a Probiotic in the Laboratory Culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 58, p. 198-204, 2006.

DANIELS, H.V. Disease control in shrimp ponds and hatcheries in Ecuador. In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARAO, Brasil, 1993, p. 175-184.

DECAMP, O. et al. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 334-338, 2008.

DEFOIRDT, T. et al. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 472-479, 2007.

DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association (APHA)**, 4th edition, 2001.

EL-SERSY, N.A.; ABDELRAZEK, F.A.; TAHA, S.M. Evaluation of various probiotic bacteria for the survival of *Penaeus japonicus* larvae. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 15, p. 1506-1511, 2006.

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.

FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GARRIQUES, D.; WYBAN, J. Up to date advances on *Penaeus vannamei* maturation, nauplii and postlarvae production. In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, Associação Brasileira de Aqüicultura, Brasil, 1993, p. 217-235.

GATESOUBE, F.J. et al. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 83, p. 39-44, 1989.

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

GISMONDO, M.R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 287-292, 1999.

GOMEZ-GIL, B. et al. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, p. 259-270, 2000.

GRIFFITH, D.R.W. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: LAVENS, P.; JASPERS, E.; ROELANDS, I. (Eds.). Larvi '91—Fish and Crustacean Larviculture Symposium, Special Publication, vol. 24. European Aquaculture Society, Gent, 1995 p. 478.

GULLIAN, M.; RODRÍGUEZ, J. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Manejo de enfermedades em camarones. In: CONGRESO ECUATORIANO DE ACUICULTURA, 6., 2002, Ecuador. **Anais do Congresso Ecuatoriano de Acuicultura**, p. 47-49.

GULLIAN, M. et al. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, p. 1-14, 2004.

GUO, J. et al. Selection of probiotic bacteria for use in shrimp larviculture. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 609-618, 2009.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. (ed.). Probiotics: the scientific basis, Chapman and Hall, London, 1992, p. 209-224.

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, 2006.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 633-642, 2002.

LAKSHMANAN, R.; SOUNDARAPANDIAN, P. Effect of commercial probiotics on large scale culture of black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Research Journal of Microbiology**, v. 3, p. 198-203, 2008.

LEE, K. et al. Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Current Microbiology**, v. 32, p. 229-231, 1996.

LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: MCVEY, J.P. **CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture**, FL, v. 1, p. 393-486, 1993.

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.

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

LIZÁRRAGA-PARTIDA, M.; MONTOYA-RODRÍGUEZ, L.; GENTROP-FUNES, V. The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries. **Ciencias Marinas**, v. 23, p. 129-140, 1997.



LOPEZ-TORRES, M.A.; LIZÁRRAGA-PARTIDA, M.L. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. **Aquaculture**, v. 194, p. 11-20, 2001.

MENASVETA, P. et al. An improved closed seawater recirculation maturation system for giant tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquacultural Engineering**, v. 10, p.173-181, 1991.

MENASVETA, P. et al. Maturation and larviculture of penaeid prawns in closed recirculation seawater system. **Aquacultural Engineering**, v. 8, p. 357-368, 1989.

MIALHE, E. et al. Strategy for research and international cooperation in marine invertebrate pathology, immunology and genetics. **Aquaculture**, v. 132, p. 33-41, 1995.

MORIARTY, D.J.W. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: BELL, C.R.; BRYLINSKY, M.; JOHNSON-GREEN, P. (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999, p. 237-243.

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

MORIARTY, D.J.W. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. **Infofish International**, v. 4, p. 29-33, 1996.

NINAWA, A.S.; SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, p. 43-66, 2009.

OCHOA, S.J.L.; OLMOS, S.J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiology**, v. 23, p. 519-525, 2006.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antimicrobial story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

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.

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. et al. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 37, p. 105-118, 2003.

RENGPIPAT, S. et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, v. 191, p. 271-288, 2000.

RENGPIPAT, S. et al. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v. 167, p. 301-313, 1998a.

RENGPIPAT, S. et al. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: FLEGEL, T.W. (Ed.). *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 1998b.

RUANGPAN, L.; KITAO, T. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. **Journal of Fish Diseases**, v. 14, p. 383-388, 1991.

SELVIN, J.; HUXLEY, A.J.; LIPTON, A.P. Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. **Aquaculture**, v. 230, p. 241-248, 2004.

SHARMILA, R. et al. Bacterial flora of semi-intensive pond reared *Penaeus indicus* (H.Milne Edwards) and the environment. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 11, p. 193-203, 1996.

SKJERMO, J.; VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**, v. 177, p. 333-343, 1999.

TOWNER, K.J. The genetics of resistance. In: GREENWOOD, D. (Ed.). *Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, Oxford, 1995, p. 159-167.

VANDENBERGHE, J. et al. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2592-2597, 1999.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

VERDONCK, L. et al. Variability of the microbial environment of rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* production systems. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25, p. 55-59, 1994.

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.

VIJAYAN, K.K. et al. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. **Aquaculture**, v. 251, p. 192-200, 2006.

WANG, Y.B.; XU, Z.R.; XIA, M.S. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* iL.) ponds. **Fisheries. Science**, v. 71, p. 1034-1039, 2005.

WESTON, D.P. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: BAIRD, D.; BEVERIDGE, M.V.M.; KELLY, L.A.; MUIR, J.F. (Eds.). *Aquaculture and Water Resource Management*. Blackwell, Oxford, 1996. p. 140-165.

WILKENFELD, J.S. Commercial hatchery status report: an industry panel viewpoint. In: WYBAN, J. (Ed.). Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1992, p. 71–86.

WYBAN, J.A.; SWEENEY, J.N. Intensive shrimp production technology: **the Oceanic Institute shrimp manual**, USA, 1991. 158p.

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

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516-524, 2006.

## ANEXOS

### **Periódico *Aquaculture***

**Site:** <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00448486>

**ISSN:** 0044-8486/ **Fator de impacto:** 1.678

### **Normas**

#### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

#### **LaTeX**

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively the standard document class "article". The Elsevier LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

#### **Article structure**

##### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

##### ***Material and methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### ***Theory/calculation***

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### ***Appendices***

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

### ***Vitae***

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures.

### **Essential title page information**

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately

from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be not longer than 400 words.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

### **Accession numbers**

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the



following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup> and not Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. *Table footnotes* Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:  
 ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

##### **Please do not:**

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

##### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear

in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### ***Text graphics***

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further under Electronic artwork. Ensure that high-resolution graphics files are provided, even if the graphic appears as part of your normal wordprocessed text file.

### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **References**

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

#### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### ***Reference management software***

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (☞ <http://www.endnote.com>) and Reference Manager (☞ <http://www.refman.com>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...." *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. *Examples:* Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

### **Journal Abbreviations Source**

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Supplementary and multimedia data**

Elsevier accepts electronic supplementary and multimedia data to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ☞ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- ✓ E-mail address
- ✓ Full postal address
- ✓ Telephone and fax numbers All necessary files have been uploaded
- ✓ Keywords
  - All figure captions
- ✓ All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- ✓ Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- ✓ References are in the correct format for this journal
- ✓ All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
  - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- ✓ Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- ✓ If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

***Policy Statement of the Disease Section***

Please read. Does your manuscript comply with the Policy Statement of the Disease Section? In keeping with the scope of the journal, the Disease Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the diseases of aquatic animals and plants, so long as their content is relevant to solving aquaculture problems.

Please note, however, with respect to the probiotic potential of various bacteria and the antibacterial or immunostimulatory effects of herbal extracts a very large number of papers have already been published. As a result, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present further initial and preliminary investigations of these phenomena. Manuscripts addressing these topics will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

## **Revista Ciência Rural**

Site: <http://www.ufsm.br/ccr/revista/>

ISSN: 0103/8478 Fator de impacto: 0.1483

### **Normas**

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

**2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 25 linhas em espaço duplo, as margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações.** Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página (cada tabela também constituirá uma página). **Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.**

**3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, quando for necessário o uso deve aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo .doc, .pdf).

**4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo .doc, .pdf).

**5. A nota deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, caso existam devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo .doc, .pdf).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:  
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:  
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:  
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.  
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:  
Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

**9.5.** Resumos:  
RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

**9.6.** Tese, dissertação:  
COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

**9.7.** Boletim:  
ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

**9.8.** Informação verbal:  
Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

**9.9.** Documentos eletrônicos:  
MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadros. As figuras devem ser enviadas à parte, cada uma sendo considerada uma página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade



máxima com pelo menos 800 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda. Também devem apresentar a seguinte formatação que se encontra nesse exemplo.

- 11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
- 12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderão ser utilizados.
- 13.** Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).
- 14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
- 15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
- 16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.