

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

**DESEMPENHO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)  
CULTIVADO COM USO DE PROBIÓTICOS QUANDO SUBMETIDO À INFECÇÃO  
COM *Vibrio harveyi***

**DANIELLI MATIAS DE MACÊDO DANTAS**

Recife, PE  
Fevereiro - 2008

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

**DESEMPENHO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)  
CULTIVADO COM USO DE PROBIÓTICOS QUANDO SUBMETIDO À INFECÇÃO  
COM *Vibrio harveyi***

Mestranda: Danielli Matias de M. Dantas

Plano de Pesquisa apresentado ao Programa de  
Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e  
Aqüicultura da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco.

Orientador: Alfredo Olivera Gálvez, Dr.  
Co-orientador: Silvio Maurano Peixoto, Dr.

Recife, PE  
Fevereiro – 2008



## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por toda dedicação e estímulo e ao meu Tio Pedro (in memoriam), pela juventude transmitida e por todos os momentos de alegria divididos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus;

À minha família, meus pais, aos meus irmãos Giovanni e Dinarte e à minha cunhada Naylla, por serem a base de minha vida e por todo amor incondicional;

Ao Dr. Alfredo Olivera pela orientação, confiança e por todas as oportunidades durante todos os anos de convívio;

Ao Dr. Silvio Peixoto e Dra. Roberta Soares pela amizade e pelo apoio imensurável na realização deste trabalho;

A Dra. Alitiane Pereira por ter aceito o convite para compor a banca examinadora e pelas valiosas considerações;

A Dr. Luis Vinatea pelas sugestões de grande valia para este trabalho;

A Carlos Mello Junior e Felipe Vieira pelas importantes informações para realização do experimento;

A Patrícia Fernandes pela disponibilidade e pelas contribuições;

A Marcelo Rego, Leônidas Cardoso, Renata Daniela e Egídio Alves pelo apoio na realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, em nome do coordenador Paulo Travassos e da secretária Selma Santiago pelo apoio logístico;

Aos colegas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo e Laboratório de Maricultura Sustentável: Rodolfo Nascimento, Emília Carneiro, Weruska Costa, Iru Guimarães, Ícaro Gomes, André Batista, Henrique Lavander, Ricardo Mendes, Sérgio Rodrigues, Nathalia Calazans, Elizabeth Santos, Roberta Nery, Renata Alencar, Suzana Maria, Gláucia Brito, Emanuell Felipe e Isabela Bacalhau;

As amigas Ana Cecília Mamede e Wanessa de Melo por toda força e companheirismo dispensada no desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos do mestrado pelos momentos divididos, em especial a Suely Bezerra, Fernando Kim, José Carlos, Mônica Soares, Juliana Santos, Danielle Viana, Diogo Bessa, Ugo, Aprígio Neto e Mirela Assunção;

Aos amigos João Neto, Reginaldo Junior e Aline Rocha pela amizade e por compartilhar todos os momentos dentro e fora da Universidade com muito carinho;

A Kleybiana Dantas, minha prima e irmã, por tudo que vivemos desde o primeiro dia de nossas vidas;

A Jaqueline Medeiros e José Carlos Gastelú por todo apoio e confiança depositados.

## RESUMO

A rápida expansão da indústria do camarão na aquicultura durante poucas décadas tem proporcionado a muitos países altos rendimentos. Entretanto, o surgimento de doenças tem causado sérios prejuízos econômicos ao setor produtivo. Este trabalho verificou o efeito do uso de probiótico no cultivo de juvenis de *Litopenaeus vannamei* quando submetidos à infecção ao *Vibrio harveyi*. A exposição ao *V. harveyi* foi realizada durante 15 dias nos camarões provenientes de um cultivo de 30 dias em sistema fechado sem renovação de água com utilização de um probiótico comercial (*Bacillus sp.*) adicionado na água e na ração (PAR), somente na água (PA), somente na ração (PR) e sem adição de probiótico (SP). Foram analisadas as respostas de consumo alimentar, concentração total de hemócitos, crescimento e sobrevivência. A análise do consumo alimentar dos camarões não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, sendo a única exceção o tratamento SP onde ocorreu uma redução no consumo na segunda semana. Os tratamentos PAR e PA apresentaram valores menores e mais constantes de concentração total de hemócitos durante o período do experimento. As maiores taxas de crescimento foram verificadas nos tratamentos PAR ( $0,34 \pm 0,19$  g/semana) e SP ( $0,45 \pm 0,04$  g/semana), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os camarões apresentaram valores de sobrevivência acima de 98% em todos os tratamentos. Os resultados sugerem que a utilização do *Bacillus sp.* adicionados na água ou na ração separadamente, aumentam o consumo alimentar por um maior período de tempo em camarões infectados pelo *V. harveyi* e interferem positivamente na resposta imune de *L.vannamei*.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio harveyi*, probiótico, hemócitos, crescimento.

## ABSTRACT

The fast expansion of farmed shrimp industry during the last decades has been offering high profitable deal to many countries. However, diseases appearing have caused lots of serious economic damage on productive sector. The effect of probiotic in *Litopenaeus vannamei* juveniles when submitted to the infection by *Vibrio harveyi* was evaluated in the present study. The exposure to *V. harveyi* was carried out during 15 days using individuals reared for one month in a closed recirculation system with a commercial probiotic (*Bacillus sp.*) added to water and food (PAR), only in the water (PA), only in food (PR) and without probiotic (SP). Were examined the responses of food consumption, total concentration of hemocytes, growth and survival. The food consumption did not differ significantly among the treatments, but in the SP treatment a significant reduction occurred in the second week. The PAR and PA treatments showed inferior and more constants values in the total hemocits concentrations during the experimental period. The highest growth rates were observed in the PAR ( $0.34 \pm 0.19$  g/week) and SP ( $0.45 \pm 0.04$  g/week) treatments, but did not differ statistically within these treatments. Shrimp survival values were higher than 98% in all treatments. The results suggest that the addition of *Bacillus sp.* to the water or food separately, could increase the food consumption during a longer period of time in shrimp infected by *V. harveyi* and interfere positively in the immune response of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio harveyi*, probiotic, hemocits, growth.

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água durante o período experimental.....	25
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do consumo alimentar (grama de ração/refeição) do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema fechado com a inoculação de <i>Vibrio harveyi</i> .....	28
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros zootécnicos do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema fechado com a inoculação de <i>Vibrio harveyi</i> .....	28

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Média e desvio padrão da contagem total de hemócitos nos respectivos dias de coleta. Letras distintas nos dias de coleta indicam diferenças significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ ).....	26
Figura 2. Pesos inicial e final e as respectivas taxas de crescimentos do <i>Litopenaeus vannamei</i> nos diferentes tratamentos.....	29

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3. ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO .....	19
Artigo Performance of <i>Litopenaeus vannamei</i> from heterotrophic culture when submit to infection by <i>Vibrio harveyi</i> (Submetido à Revista Brasileira de Ciências Agrárias)	
Resumo.....	19
Abstract.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
CONCLUSÕES .....	30
LITERATURA CITADA.....	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
5. REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO (Diretrizes para autores - Revista Brasileira de Ciências Agrárias) .....	40

## INTRODUÇÃO

Alimentos marinhos constituem uma parte essencial na dieta de muitas pessoas no mundo e a necessidade de aumentar a produção em diversos países persistirá com o aumento da população humana (ABREU, 1999). A produção aquícola mundial em 1995 foi de 31.196.000 toneladas e em 2005 duplicou, alcançando uma produção de 62.960.000 toneladas (ABCC, 2007). O cultivo de crustáceos, principalmente de camarões, desponta neste contexto como uma importante alternativa para a produção rápida e em alta escala, auxiliando ainda a proteger as populações naturais de uma extração excessiva (BARRACO, 2004).

A espécie de maior importância na carcinicultura brasileira é *Litopenaeus vannamei*. Sua classificação taxonômica segundo Pérez-Farfante e Kensley, (1997) é:

Filo: Arthropoda

Subfilo: Crustacea

Classe: Malacostraca

Ordem: Decapoda

Subordem: Dendobranchiata

Superfamília: Penaeoidea

Família: Penaeidae

Gênero: *Litopenaeus*

Espécie: *vannamei*

Segundo Rocha et al. (2004), a produção global de camarões cultivados em 2003 foi de 1.630.000 toneladas. A produção aquícola brasileira em 2003 foi de 277.640 toneladas (FAO, 2005) e a carcinicultura atingiu a marca de 90.000 toneladas, obtendo um crescimento médio anual da atividade superior a 60% (ROCHA, 2007).

Entretanto, o surgimento de doenças tem causado sérios prejuízos econômicos ao setor produtivo. Dados mais recentes mostram que a produção de 2006 foi de 65.000 toneladas colocando o Brasil em 8º lugar na produção mundial (ABCC, 2007).

Em muitos países, as enfermidades são as maiores restrições para produção aquícola (BRAAK, 2002). Especialmente na carcinicultura, o principal fator limitante para um maior desenvolvimento consiste atualmente no controle das infecções. As altas densidades populacionais, usualmente requeridas nos cultivos, propiciam o rápido alastramento dos agentes infecciosos, resultando geralmente em mortalidades maciças e levando por consequência a prejuízos econômicos incalculáveis. No momento presente, a profilaxia e o controle de doenças em carcinicultura restringem-se basicamente a práticas adequadas de manejo e à redução das condições de estresse, uma vez que os fatores que determinam o estado de saúde dos camarões são ainda muito pouco conhecidos (BARRACO, 2004).

No cultivo de camarão os vibrios e a maioria de outros patógenos bacterianos são Gram-negativos (YAP, 2001; MORIARTY, 1990). Gomez-Gil et al. (2004) citam que essas bactérias são um dos patógenos infectantes mais importantes de organismos aquáticos, tais como camarões peneídeos, várias espécies de peixes, moluscos e corais. Os gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* formam o segundo principal grupo de bacilos Gram-negativos,

fermentativos, anaeróbios facultativos, isto é, crescem em condições aeróbias e anaeróbias. Esses microrganismos foram também classificados juntos, não só por serem encontrados principalmente na água, mas também por serem capazes de causar doença gastrointestinal (MURRAY et al., 2004).

O tratamento com probióticos pode ser considerado como um método de controle biológico chamado “Biocontrole”, que provoca a limitação ou eliminação de pragas pela introdução de organismos competidores, como parasitas semelhantes ou patógenos específicos (GATESOUBE, 1999). Microorganismos probióticos são freqüentemente usados como aditivos em alimentos para animais cultivados ou de estimação. Adicionadas ao alimento do camarão, as bactérias probióticas podem facilitar a digestão das proteínas constituintes, por causa das enzimas produzidas pelas bactérias que podem complementar a atividade de proteases do camarão, aumentando a digestibilidade alimentar. Além disso, as enzimas probióticas têm uma faixa de pH mais amplo que as enzimas do camarão, o que poderia prolongar o tempo de digestão mesmo quando está no hospedeiro (OLMOS-SOTO, 2006). Segundo Moriarty (1998), cepas de *Bacillus* possuem atividade antibiótica contra *Vibrio* sp. luminescente, mas o autor enfatiza a multiplicidade do efeito probiótico, como por exemplo excreção enzimática, competição por nutrientes e por espaço.

Os crustáceos têm um sistema imune inato caracterizado pela ausência de imunoglobina e memória imunológica, mas é bastante eficiente para protegê-los e preservá-los da invasão de patógenos. Os hemócitos dos crustáceos representam um papel principal na resposta imune, realizando funções como fagocitose, encapsulação, formação de nódulo e mediação de citotoxicidade (JOHANSSON et al., 2000).

A resposta imune celular dos crustáceos está basicamente relacionada às células da hemolinfa, ou hemócitos, e incluem a fagocitose de microrganismos, a formação de nódulos e cápsulas celulares em torno de partículas estranhas e os mecanismos microbicidas e/ou citotóxicos utilizados por estas células para lisar e degradar os patógenos invasores. A contagem total de hemócitos ou THC (do inglês, *total hemocyte count*) é um dos parâmetros mais utilizados para monitorar o estado de saúde em crustáceos. A THC pode aumentar ou diminuir seus valores, dependendo do tempo e tipo de estresse. Durante estresse e processos infecciosos, a THC usualmente diminui durante as primeiras horas, devido provavelmente à migração e infiltração de hemócitos nas regiões invadidas, havendo em seguida um aumento de seus valores, possivelmente devido à liberação de novas células a partir dos órgãos hematopoiéticos (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002).

A realização de pesquisas com intuito de conhecer aspectos biológicos, proporcionando um melhor desempenho e melhores resultados na produção do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, bem como o entendimento de seu sistema imune é de grande importância para limitar o impacto de doenças.

O presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito do probiótico no cultivo de juvenis de *Litopenaeus vannamei* quando submetidos à infecção ao *Vibrio harveyi*.

## REVISÃO DE LITERATURA

A rápida expansão da indústria do camarão na aquicultura durante poucas décadas tem proporcionado a muitos países altos rendimentos. O crescimento da indústria do cultivo de camarão é simultâneo a ocorrência de doenças virais e bacterianas como o vírus da mancha branca (WSV) e bactérias luminescentes. Isto frequentemente conduz a perdas financeiras significantes para muitas fazendas de camarão (THAITHONGNUM et al., 2006). Vibrioses luminescentes são causadas principalmente pelos *V. harveyi*, *Vibrio campbellii* e ocasionalmente pelo *V. splendidus*, os quais podem infectar larvas, juvenis e estágios adultos de camarões peneídeos (GÓMEZ GIL et al., 1998).

*Vibrio harveyi* é uma bactéria luminescente gram-negativa, distribuída frequentemente em ambientes aquáticos e é considerado um importante agente causador de doenças luminosas em organismos marinhos. Durante a década passada, esta espécie foi reportada por ser um agente patogênico significativo e uma das causas de mais altas taxas de mortalidade na indústria do camarão cultivado no mundo inteiro (LIU et al., 1996).

*V. harveyi* tem causado grandes perdas na produção do camarão em todo o mundo. Na Tailândia a presença deste vibrio tem provocado altas mortalidades em *P. monodom* e *P. vannamei* (MEUNPOL et al, 2003; THAITHONGNUM et al, 2006), no México, em *L.*

*vannamei* (SOTO-RODRIGUÉS et al, 2006) e no Reino Unido em *Penaeus indicus* (ALABI et al, 1999). Nas Filipinas, cepas virulentas de *V. harveyi* têm causado perdas de 100% na produção larval de *Penaeus monodon* com densidades tão baixas quanto  $10^2$  cel.mL<sup>-1</sup> (LAVILLA-PITOGO et al., 1990). No Equador uma das enfermidades mais comuns nos laboratórios produtores de larvas é a “síndrome das bolitas”, cujo agente etiológico é o *Vibrio harveyi*, associado a grandes mortalidades de larvas de *Penaeus vannamei* e de *P. stylirostris* (ZHERDMANT, 1991).

Assim como outros invertebrados, os crustáceos contam apenas com um sistema imune inato ou natural, diferentemente dos vertebrados, que possuem, além deste, um sistema adaptativo ou adquirido. O primeiro, filogeneticamente mais antigo e considerado mais simples, é encontrado em todos os organismos multicelulares. O sistema adaptativo deriva basicamente da linhagem celular linfocítica, que ocorre exclusivamente nos vertebrados e que se encontra na base das respostas imunológicas específicas. Sua ausência nos invertebrados inviabiliza qualquer tentativa de desenvolvimento de vacinas, na concepção clássica da palavra, diminuindo assim, de forma substancial, a possibilidade de se prevenirem e controlarem doenças nestes animais (BARRACO, 2004).

Os probióticos vêm sendo utilizados na aquicultura e há indicações de que seu uso aumenta a resistência ou previne doenças em diversos crustáceos (GATESOUBE, 1999; ALAVANDI et al, 2004). Rengpipat et al. (1998) observaram exclusão competitiva utilizando o *Bacillus* sp. adicionado a ração, obtendo melhores resultados de ganho de peso e sobrevivência no cultivo de *P. monodon*. Villamil et al. (2003), utilizando tratamento com bactérias probióticas, observaram que no cultivo de artêmia, as cepas de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei* eliminaram completamente o *Vibrio alginolyticus* deste microcrustáceo, entretanto, a eliminação do *Vibrio* na água só foi possível com o uso de *L. brevis*. A utilização

de cepas de *Pseudomonas* I-2 tem a propriedade de agir no controle de *Vibrio* spp. em sistema de aquicultura, assim como biocontrole em laboratórios e fazendas de camarão (CHYTHANYA et al, 2002). Moriarty (1998) observou um aumento na sobrevivência de camarões de água doce em tanques onde algumas cepas de *Bacillus* spp. foram introduzidas. Este tratamento diminuiu a proporção do patógeno *Vibrio* spp. no sedimento e, em menor extensão, na água. No cultivo de camarões o efeito do probiótico vem sendo reportado (VASEEHARAN & RAMASAMY, 2003; WANG, 2007). Ochoa Solano & Olmos-Soto (2006) isolaram cepas de *Bacillus* sp. e encontraram uma potencial aplicação tanto para fermentação de alimento como cepas probióticas, aumentando a digestibilidade do camarão. Gomez-Gil et al. (2002) obtiveram melhores resultados de crescimento nos estágios de mysis e protozoa de camarões peneídeos quando foram alimentados com a microalga *C. muelleri* e bactérias probióticas. Montero-Rocha (2006) encontrou efeitos positivos no sistema imunológico e fisiológico do *L. vannamei* quando alimentados com um suplemento bacteriano.

Vários procedimentos quantitativos são utilizados para avaliar a expressão da resposta imune em crustáceos. A contagem total de hemócitos (THC) e a atividade fenoloxidase (PO) têm sido consideradas como marcadores de saúde, uma vez que mudanças nestes parâmetros podem estar relacionadas a infecções por patógenos e condições adversas (SRITUNYALUCKSANA e SÖDERHÄLL, 2000). Diversos autores reportam o sistema imune através da contagem de hemócitos. Segundo Bachère (2000) para a prevenção de doenças de camarão é fundamental a avaliação e monitoramento do seu estado de saúde, e neste sentido, a contagem de hemócitos é uma importante resposta do sistema imune. Lopés et al. (2003) encontrou mudanças na THC ao submeter juvenis de *L. vannamei* a diferentes tipos de dietas, onde a THC aumentou em camarões alimentados com uma dieta com glucanos e diminuiu quando alimentados com uma dieta com de vitamina C. Rengpipat et al. (2000),

avaliando o aumento da imunidade de *Penaeus monodon* alimentado com a bactéria probiótica *Bacillus* sp., detectou uma diminuição nos hemócitos após a infecção tanto do grupo controle quanto o grupo onde foi utilizado *Bacillus* sp., mas com uma significativa diminuição para o tratamento onde se utilizou a cepa probiótica. Sarathi et al. (2007) observou uma diminuição na contagem total de hemócitos em *F. indicus* indicando uma resposta do sistema imune inato contra patógenos.

Desta forma, o estudo do sistema imune de crustáceos desponta como uma estratégia recente e promissora, visto que permite conhecer as bases da susceptibilidade e resistência destes animais a microrganismos patogênicos e parasitas, além de fornecer subsídios valiosos para o estabelecimento de parâmetros de saúde e imunomarcadores para seleção genética de animais mais resistentes a infecções (BARRACO, 2004).

ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*

Danielli Dantas<sup>1</sup>, Egídio Alves, Marcelo Rego, Roberta Soares, Silvio Peixoto, Alfredo O. Gálvez

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aqüicultura, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, CEP 52171-900. Fone: 81-3320-6504. Fax: 81-3320-6502. danielli\_matias@yahoo.com.br

Resumo

O trabalho verificou o efeito do uso de probiótico no cultivo de juvenis de *Litopenaeus vannamei* quando submetidos à infecção ao *Vibrio harveyi*. A exposição ao *V. harveyi* foi realizada durante 15 dias em camarões provenientes de um cultivo de 30 dias em sistema fechado sem renovação de água com utilização de um probiótico comercial (*Bacillus sp.*). Os probióticos foram adicionados na água e na ração (PAR), somente na água (PA), somente na ração (PR) e sem adição de probiótico (SP). A análise do consumo alimentar dos camarões não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, sendo a única exceção o tratamento SP onde ocorreu uma redução no consumo na segunda semana. Os tratamentos PAR e PA apresentaram valores menores e mais constantes de concentração total de hemócitos durante o período do experimento. As maiores taxas de crescimento foram verificadas nos tratamentos PAR ( $0,34 \pm 0,19$  g/semana) e SP ( $0,45 \pm 0,04$  g/semana), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os camarões apresentaram valores de sobrevivência acima de 98% em todos os tratamentos. Os resultados sugerem que a utilização do *Bacillus sp.* adicionados na água ou na ração mantém o consumo alimentar por um maior período de tempo em camarões infectados pelo *V. harveyi* e interferem positivamente na resposta imune de *L.vannamei*.

Palavras-chave: probiótico, camarão, *Litopenaeus vannamei*, imunologia

Performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultured probiotic when submit to infection by *Vibrio harveyi*

Abstract

The effect of probiotic in *Litopenaeus vannamei* juveniles when submitted to the infection by *Vibrio harveyi* was evaluated in the present study. The exposure to *V. harveyi* was carried out during 15days using individuals reared for one month in a closed recirculation system with a commercial probiotic (*Bacillus sp.*) The Probiotics were added to water and food (PAR), only in the water (PA), only in food (PR) and without probiotic (SP). The food consumption did not differ significantly among the treatments, but in the SP treatment a significant reduction occurred in the second week. The PAR and PA treatments showed inferior and more constants values in the total hemocits concentrations during the experimental period. The highest growth rates were observed in the PAR ( $0.34 \pm 0.19$  g/week) and SP ( $0.45 \pm 0.04$  g/week) treatments, but did not differ statistically within these treatments. Shrimp survival values were higher than 98% in all treatments. The results suggest that the addition of *Bacillus sp.* to the water or food, keeps the food consumption during a longer period of time in shrimp infected by *V. harveyi* and interfere positively in the immune response of *L. vannamei*.

Key words: probiótic, shrimp, *Litopenaeus vannamei*, imunology

## INTRODUÇÃO

Uma das maiores restrições em fazendas de camarão são as doenças causadas por patógenos infecciosos entre os quais os patógenos virais e bacterianos são os responsáveis por várias perdas econômicas na indústria aquícola mundial (Sarathi et al., 2007). Vibrioses têm sido a causa das maiores mortalidades em camarões peneídeos juvenis (Gomez-Gil et al., 2000 e Bachère, 2000). Doenças causadas por *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi* deixam sérios problemas no cultivo do camarão *Penaeus monodum* na Índia, sendo ofuscado apenas pela infecção causada pelo vírus síndrome da mancha branca, que são a causa dos mais sérios problemas em todos os países Asiáticos (Sarathi et al., 2007).

A sustentabilidade da indústria do camarão depende em grande parte do controle de doenças e do estado de saúde do camarão. Diversos autores têm trabalhado na quantificação de diferentes parâmetros celular e humoral na resposta imune de espécies de camarões cultivados (Rengpipat et al., 2000; Lopés et al., 2003; Hsu & Chen, 2007). Uma das ferramentas disponíveis para avaliações imunológicas é a contagem de hemócitos (Le Moullac et al., 2000).

O uso de bactérias probióticas para inibir patógenos pela liberação de substâncias antimicrobianas vem ganhando importância em fazendas de camarão como uma alternativa mais eficaz que administração de antibióticos no gerenciamento da saúde dos camarões (Verschuere et al., 2000). Probióticos vêm sendo usados na aquicultura e seu uso tem sido indicado aumentando a resistência ou prevenindo doenças em diversos crustáceos (Rengpipat et al., 1998; Gatesoupe, 1999; Montero-Rocha et al., 2006). Rengpipat et al. (2000) observaram que *Bacillus* S11 fornecem proteção a doenças pela ativação da defesa celular imune e humoral, assim como estabelece uma exclusão competitiva no intestino do camarão.

Segundo Horowitz & Horowitz (2000) probiótico é um suplemento bacteriano que é adicionado a um sistema de produção para modificar ou manipular as comunidades microbianas na água e sedimento, reduzir ou eliminar microorganismos patógenos selecionados, e aumentar o crescimento e sobrevivência de espécies cultivadas. Fabricantes

afirmam que, além disso, aumenta a qualidade da água e diminui os níveis de matéria orgânica. Porém, a eficácia da adição de probiótico na água em sistema de ainda é polêmico.

Os crustáceos têm um sistema imune inato, caracterizado pela ausência de imunoglobina e memória imunológica, mas são bastante eficientes para protegê-los e preservá-los da invasão de patógenos. Os hemócitos dos crustáceos representam o papel principal na resposta imune, realizando funções como fagocitose, encapsulação, formação de nódulo e mediação de citotoxicidade (Johansson et al., 2000).

Quando os patógenos penetram na hemolinfa, são englobados pelos hemócitos e geram uma série de substâncias antimicrobianas chamadas oxigênio reativo tal como anion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). A liberação de anion superóxido é conhecida como explosão respiratória, e tem um importante papel na atividade microbiana (Munoz et al., 2000 apud Sarathi et al., 2007).

Desta forma, o estudo do seu sistema imune desponta como uma estratégia promissora, visto que permite conhecer as bases da susceptibilidade e resistência destes animais a microrganismos patogênicos e parasitas, além de fornecer subsídios valiosos para o estabelecimento de parâmetros de saúde e imunomarcadores para seleção genética de animais mais resistentes a infecções. (Barraco, 2004).

O presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito do uso de probiótico no cultivo de juvenis de *Litopenaeus vannamei* provenientes de um sistema fechado sem renovação de água quando submetidos à infecção ao *V. harveyi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Pesca e Aqüicultura (DEPAq) em conjunto com o Laboratório de Maricultura Sustentável (LAMARSU), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado em Recife, Pernambuco e teve uma duração de 15 dias.

Juvenis de *L. vanammei* ( $2,26 \pm 0,02$  gramas) foram obtidos de uma Fazenda de Camarão Marinho no Litoral Norte de Pernambuco e mantidos no LAMARSU por 30 dias em sistema de cultivo fechado heterotrófico e autotrófico. No sistema heterotrófico, a administração dos probióticos nos devidos tratamentos foi ministrada de acordo com a recomendação do fabricante. O probiótico comercial ministrado no cultivo anterior ao experimento é composto por cepas liofilizadas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. No Cultivo autotrófico foi realizado inóculo da diatomácea *Chaetoceros muelleri* em uma densidade de  $10^3$  células/ml utilizando a fertilização com os fertilizantes inorgânicos Nitrato, Fosfato e Silicato para a

manutenção da densidade algal. Após 30 dias de cultivo, os camarões foram transportados para Laboratório de Bionésaios do DEPAq e separados nas devidas unidades experimentais.

Cada unidade experimental consistiu de caixas plásticas (0,56 X 0,36 X 0,31m) com área de 0,20m<sup>2</sup> e volume de 35 litros cada. A densidade de estocagem de camarões foi de 100/m<sup>2</sup>, totalizando 20 indivíduos por caixa com salinidade 25‰, aeração constante e temperatura ambiente.

O modelo experimental contou com quatro tratamentos em tréplica, totalizando 12 unidades experimentais inteiramente casualizadas. Os tratamentos foram ministrados com camarões advindos de um cultivo heterotrófico (tratamento PAR, PA e PR) e autotrófico (Tratamento SP), onde:

Tratamento PAR - Camarão advindo de cultivo com utilização de probiótico na água e na ração;

Tratamento PA - Camarão advindo de cultivo com utilização de probiótico na água;

Tratamento PR - Camarão advindo de cultivo com utilização de probiótico na ração;

Tratamento SP - Camarão advindo de cultivo sem utilização de probiótico;

A água utilizada no experimento foi proveniente do Laboratório Maricultura Netuno, onde recebeu uma prévia filtração. No Laboratório de Maricultura Sustentável, a água foi desinfetada com hipoclorito de sódio (5 ppm).

O *V. harveyi* utilizado para infecção da água das unidades experimentais foi obtido no Laboratório de Camarões Marinhos – Setor Microbiologia, Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina.

No laboratório de Bacteriologia do Lamarsu o *V. harveyi* foi cultivado em meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion – Infusão de Coração e Cérebro, Oxoid) e mantido em estufa bacteriológica a 30°C. Após 24h do início da cultura, a cepa foi inoculada serialmente (1/10) 5 vezes em solução salina estéril (NaCl 3,5%). A concentração de *V. harveyi* nesta solução foi estimada por contagem das colônias formadas em placas contendo meio de cultura Agar TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) após um período de 24 horas de incubação a 30 °C. Foi realizado inoculação de 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no primeiro dia do experimento e uma segunda inoculação de 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no sétimo dia.

Foram mensuradas as variáveis físico-químicas de temperatura (°C), salinidade, condutividade (µs/cm), porcentagem de saturação de oxigênio (%), oxigênio dissolvido (mg/L) e pH diariamente às 09h, utilizando um multi-parâmetros Multi Probe System 5565.

As amostras de hemolinfa foram coletadas do sinus ventral de um camarão por unidade experimental antes da inoculação do *V. harveyi* e posteriormente a cada três dias. As amostras

foram coletadas com seringas estéreis de 1mL (21G), fixadas em solução de 4% de formol-MAS (10 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) e armazenadas em ependorf para posterior contagem total de hemócitos (THC).

Ao final do experimento foi verificado o número total de hemócitos (THC), o qual foi estimado através de contagens diretas em Câmara de Neubauer e microscópio Óptico.

Durante o experimento, foi utilizada ração comercial com 35% de proteína bruta. A alimentação (10% da biomassa) foi fornecida duas vezes ao (manhã/tarde) em bandejas. Diariamente, antes da primeira alimentação, foi retirado sobras de ração e fezes do fundo das unidades através de sifonamento. A água foi filtrada e devolvida para as devidas caixas.

O consumo alimentar foi avaliado no 7° e 14° dia do experimento, as sobras de ração foram recolhidas, colocadas em filtros pré-pesados e levadas à estufa com temperatura de 60° C até atingirem um peso constante. Além disso, três unidades experimentais sem camarões foram utilizadas para determinar a lixiviação da ração. O consumo alimentar foi calculado de acordo com o método adaptado de NUNES & PARSONS (2000):  $CA = (R_0 - R_r) \times R_p$ . Onde CA= Consumo alimentar (g de ração/tratamento/refeição); R<sub>0</sub> = ração ofertada corrigida (g); R<sub>r</sub>= ração recolhida (g) R<sub>p</sub>= lixiviação da ração.

A taxa de sobrevivência foi avaliada através de checagem diária de camarões das unidades experimentais até o final do experimento. Para determinar a taxa de crescimento foi realizada biometria inicial e final do experimento. Os camarões foram pesados em balança eletrônica com precisão de 0,1g. O ganho de peso e biomassa foi avaliado através da diferença do peso final e peso inicial e da diferença da biomassa final e biomassa inicial, respectivamente.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade, teste de Cochran para homogeneidade da variância e, em seguida, ANOVA. Quando houve diferenças significativas entre as médias (p<0,05) foi utilizado o teste de Duncan.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros físico-químicos da água

Os valores de qualidade de água mensurados antes dos camarões serem expostos ao *V. harveyi* estiveram dentro dos padrões que foram observados após a infecção, não havendo desta forma interferência no desempenho dos camarões. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto aos parâmetros físico-químicos da água (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) durante o período experimental (Tab. 1).

Tabela 1. Médias e desvio padrão das variáveis físico-químicas da água durante o período experimental.\*

Table 1. Mean and standard deviation of water physic-chemicals variables during the experimental period\*

	Tratamentos			
	PAR	PA	PR	SP
Temperatura (°C)	25,8 ± 0,20 <sup>a</sup>	25,8 ± 1,60 <sup>a</sup>	25,6 ± 0,20 <sup>a</sup>	25,6 ± 0,20 <sup>a</sup>
pH	7,28 ± 0,30 <sup>a</sup>	7,27 ± 0,31 <sup>a</sup>	7,28 ± 0,30 <sup>a</sup>	7,27 ± 0,32 <sup>a</sup>
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	4,91 ± 0,47 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,35 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,44 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,41 <sup>a</sup>
Salinidade (g.L <sup>-1</sup> )	25,8 ± 0,94 <sup>a</sup>			

\* Letras distintas entre colunas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )\* Different letters between columns indicates significant different ( $p < 0,05$ )

A temperatura e a salinidade estiveram dentro da faixa adequada ao cultivo de *L. vannamei*, com médias de 25,6 °C e 25,8 g.L<sup>-1</sup>. Nunes (2002), sugere que a temperatura ideal para o cultivo desta espécie é de 26 a 33 °C e que temperaturas superiores a 35 °C e inferiores a 25 °C podem afetar negativamente o desempenho dessa espécie e que uma grande variação na salinidade pode causar estresse nos animais cultivados.

A concentração de oxigênio exerce grande influência sobre a atividade, o consumo de alimento, o crescimento e a conversão alimentar de peixes e camarões. No cultivo de camarões as concentrações de oxigênio dissolvido devem ser mantidas acima de 4mg/L (Kubitza, 2003; Boyd, 2002). As médias das concentrações de oxigênio dissolvido encontradas no experimento foram no mínimo 4,91 ± 0,47 e máximo de 5,00 ± 0,35. Da mesma forma, o valor observado de pH (média de) encontrou-se dentro dos limites ideais para o crescimento de camarões que varia de 6 a 9, segundo Boyd (s/d).

### Contagem Total de Hemócitos

O tratamento SP diferiu significativamente dos demais tratamentos, apresentando concentração média superior de hemócitos totais (37,60 ± 37,79 x 10<sup>4</sup> cel.mL<sup>-1</sup>). A menor média da contagem total de hemócitos foi verificada no tratamento PAR (15,13 ± 5,12).

A contagem total de hemócitos do tratamento SP foi superior em todas as datas de amostragem, com exceção do 6º dia do experimento, onde apresentou o menor número de hemócitos totais. Esta queda acentuada pode ser justificada pela diminuição da infecção nos animais nesta data. Segundo Motedeosca et al. (2002) quanto mais aguda a infecção, maior o número de hemócitos produzidos. Em *P. japonicus* a infecção com *Fusarium solani* provocou o aumento de até 6 vezes os hemócitos circulantes (Sequeira et al., 1996). Já os tratamentos PAR e PA apresentaram os menores e mais constantes valores de concentração total de hemócitos durante o período do experimento, não sendo observado grandes alterações no

sistema imunológico (Fig. 1). No 6º dia do experimento foi encontrada uma redução significativa de THC. Segundo Le Moullac & Haffner (2000), um número menor do que o normal de hemócitos em crustáceos correlaciona-se com redução da resistência à patógenos (Fig. 1).

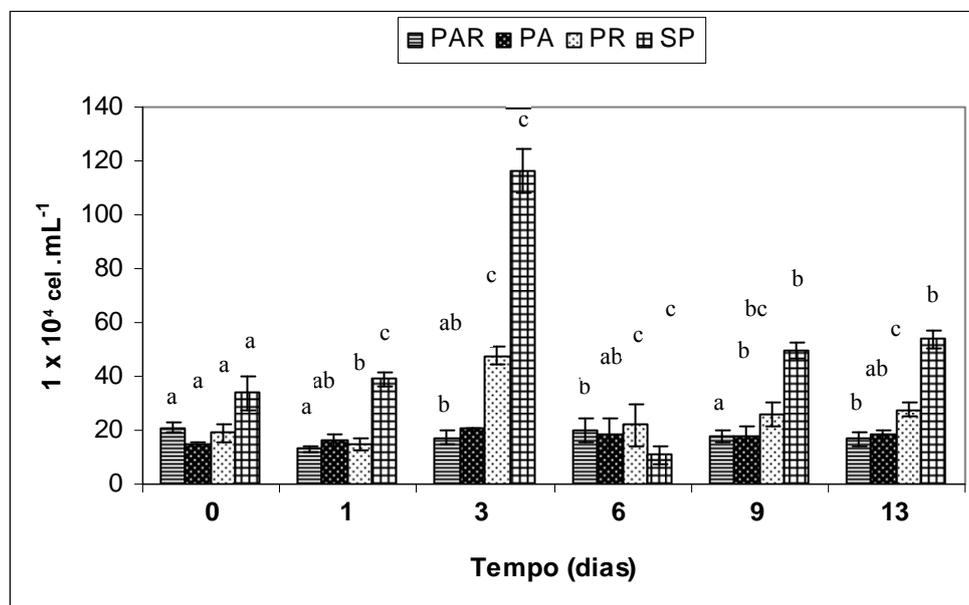


Figura 1. Média e desvio padrão da contagem total de hemócitos nos respectivos dias de coleta.

Letras distintas nos dias de coleta indicam diferenças significativas em cada tratamento ( $p < 0,05$ ).

Figure 1. Mean and standard deviation of total count hemócitos in the respective samples days

Different letters indicates significant different in the respective samples days in treatments. ( $p < 0,05$ )

Segundo Braak et al. (2002), a THC em crustáceos pode aumentar ou diminuir seus valores, dependendo do tempo e tipo de estresse. Segundo estes autores, durante estresse e processos infecciosos, a THC usualmente diminui durante as primeiras horas, devido provavelmente à migração e infiltração de hemócitos nas regiões invadidas, havendo em seguida um aumento de seus valores, possivelmente devido à liberação de novas células a partir dos órgãos hematopoiéticos.

Após a primeira inoculação do *V. harveyi* foi observada uma mudança quantitativa na THC, ocorrendo um aumento para todos os tratamentos na coleta realizada no terceiro dia. Sarathi et al. (2007) observou em camarões injetados com *V. alginolyticus* a diminuição significativa na THC nos estágios iniciais da injeção e em seguida um aumento dos níveis de THC, provavelmente devido à migração dos hemócitos para a área injetada. Estes mesmos autores atribuíram a diminuição na THC dos camarões infectados por WSSV pelo acúmulo de hemócitos nas áreas da injeção para a cicatrização do ferimento e fagocitose de corpos estranhos. Estas afirmações confirmam que a THC é um parâmetro útil como indicador da saúde de camarões.

Após o inóculo inicial (1<sup>o</sup> dia do experimento) de *V. harveyi* ( $10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup>), a maior infecção foi observada no 3<sup>o</sup> dia, onde foram observados as maiores concentrações de hemócitos totais, com exceção do tratamento PAR. A partir do 7<sup>o</sup> dia do experimento, onde foi realizada uma nova inoculação de *V. harveyi* ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>), foi observado uma nova infecção demonstrado pelo aumento na concentração total de hemócitos apresentado no 9<sup>o</sup> dia. Resultados diferentes foram encontrados por Rengpipat et al. (2000), que analisando o sistema imune do *Penaeus monodom* cultivado com inóculo de *Bacillus* sp e infectado com o *V. harveyi*, observou que o número de hemócitos totais diminuíram após a infecção em ambos os grupos com uma significativa diminuição no tratamento probiótico. Contudo, estes autores afirmam que a resposta imune foi substancial em ambos os tratamentos, mas mostrando que após 10 dias do desafio com *V. harveyi*, foi mais pronunciada com o camarão tratado com probiótico (*Bacillus* sp). Os resultados encontrados por Rengpipat et al. (2000) podem ser justificados pelo fato das amostras de hemolinfa terem sido coletadas no início da infecção, onde os valores de THC são inferiores.

As concentrações de *V. harveyi* estabelecidas para inóculo durante o experimento estão de acordo com o que foi sugerido por Soto-Rodrigués et al. (2006). Este autor avaliando a patogenicidade e colonização de vibrios luminescentes em *L. vannamei* concluiu que larvas de crustáceos marinhos tem uma capacidade de ingerir  $10^2$ - $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *V. harveyi* por nauplio e que a colonização de bactérias no intestino de larvas do camarão é estabilizada após 13 horas na região do cefalotórax e trato digestivo.

### **Consumo alimentar**

Com relação ao consumo alimentar no 7<sup>o</sup> dia, foi observado valor inferior para o tratamento PAR (0,79g/refeição), o qual diferiu significativamente apenas do tratamento SP que apresentou valor médio de 1,26g/refeição. Silva et al. (2007) encontraram resultados similares, com valores inferiores de consumo alimentar de juvenis de *L. vannamei* para os tratamentos com probiótico na água e na ração e probiótico na água.

Já no 14<sup>o</sup> dia, houve uma redução significativa do consumo alimentar no tratamento SP (0,83g/refeição), o qual diferiu significativamente dos tratamentos PA e PR. Os camarões submetidos ao tratamento sem utilização de probiótico parece não ter obtido a mesma resistência a longo prazo com relação aos camarões que foram cultivados com utilização de probiótico.

Não ocorreram diferenças significativas no consumo alimentar dos tratamentos em relação ao tempo, sendo a única exceção o tratamento SP onde ocorreu uma redução. Este

resultado indica que os camarões cultivados com utilização de probiótico foram menos afetados a longo prazo com relação à resposta obtida de consumo alimentar (Tab. 2).

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do consumo alimentar (grama de ração/refeição) do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema fechado com a inoculação de *Vibrio harveyi* \*

Table 2. Mean and standard deviation of the *Litopenaeus vannamei* shrimp feed consume (gram of feed/food) in closed system with *Vibrio harveyi* inoculation \*

Período	PAR	PA	PR	SP
7º dia	0,79 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,12 <sup>ab</sup>	1,07 ± 0,23 <sup>ab</sup>	1,26 ± 0,25 <sup>b</sup>
14º dia	0,84 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,30 <sup>ab</sup>	0,97 ± 0,29 <sup>ab</sup>	0,83 ± 0,33 <sup>a</sup>

\* Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

\* Different letters indicates significant different ( $p < 0,05$ )

Os valores médios de consumo alimentar também se mostrou bastante homogêneo para todos os tratamentos, como exceção do SP que apresentou uma queda considerável do 7º para o 14º dia do experimento.

### Crescimento e sobrevivência

Os camarões submetidos ao tratamento SP apresentaram melhores resultados de ganho de peso e de biomassa (Tab. 3).

Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Patnaik et al. (2007) que encontraram maiores valores de biomassa e peso final em *L. vannamei* infectados com *V. harveyi* e cultivados sem adição de probiótico quando comparados com o cultivo onde se utilizou probiótico na água. Mesmos resultados foram obtidos com as espécies *Penaeus setiferus* e *L. vannamei* por Horowitz & Horowitz (2000) e McIntosh et al. (2000), porém sem a presença do *V. harveyi*.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros zootécnicos do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema fechado com a inoculação de *Vibrio harveyi* \*

Table 3. Mean and standard deviation of shrimp *Litopenaeus vannamei* zootecnics parameters in closed system with *Vibrio harveyi* inoculation \*

	PAR	PA	PR	SP
Consumo Alimentar final (g)	0,84 ± 0,33 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,30 <sup>ab</sup>	0,97 ± 0,29 <sup>ab</sup>	0,83 ± 0,33 <sup>b</sup>
Sobrevivência (%)	100 ± 0 <sup>a</sup>	98 ± 0,58 <sup>a</sup>	100 ± 0,58 <sup>a</sup>	98 ± 0,58 <sup>a</sup>
Crescimento (g/semana)	0,34 ± 0,19 <sup>ab</sup>	0,25 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,04 <sup>a</sup>
Ganho de peso (g)	0,69 ± 0,39 <sup>ab</sup>	0,50 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,35 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,08 <sup>a</sup>
Ganho de biomassa (g)	9,63 ± 0,39 <sup>ab</sup>	6,93 ± 0,39 <sup>ab</sup>	4,93 ± 0,39 <sup>b</sup>	12,70 ± 0,39 <sup>a</sup>

\* Letras distintas entre colunas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

\* Different letters between columns indicates significant different ( $p < 0,05$ )

Devaraja et al. (2002) avaliando a utilização de dois tipos de probiótico no cultivo de camarão, não encontraram diferenças significativas na taxa de crescimento, peso final, sobrevivência e produção final em comparação com o tratamento controle sem probiótico.

Com relação ao crescimento dos camarões no presente estudo, houve diferença estatística entre os tratamentos PR e SP. Os maiores crescimentos (g/semana) foram verificados nos tratamentos PAR ( $0,34 \pm 0,19$  g/semana) e SP ( $0,45 \pm 0,04$  g/semana), que não diferiram estatisticamente (Fig 2). Contudo, Rengpipat et al. (1998) observaram um aumento no crescimento e na sobrevivência no cultivo de *P. monodon* com a utilização de *Bacillus* S11 e infectados com o *V. harveyi*.

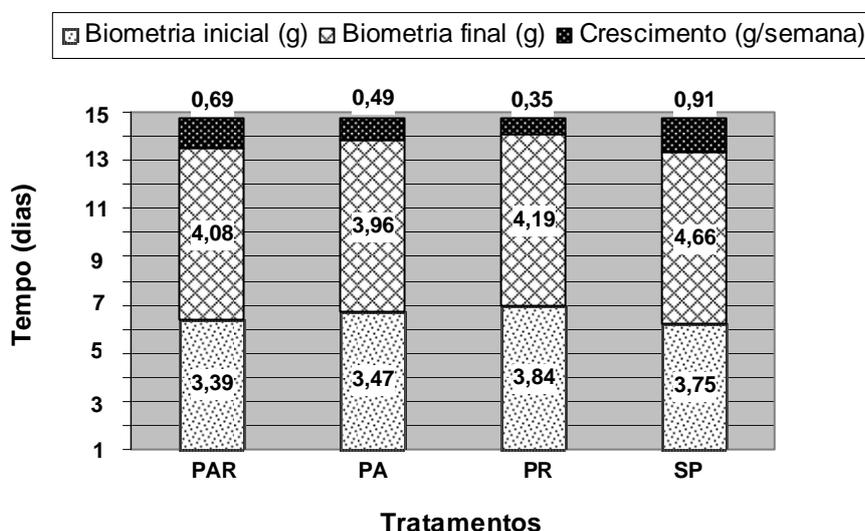


Figura 2. Pesos inicial e final e as respectivas taxas de crescimentos do *Litopenaeus vannamei* nos diferentes tratamentos

Figure 2. Initial and final weight and respective growth rate of *Litopenaeus vannamei* in the different treatments

Os camarões apresentaram valores de sobrevivência acima de 98% em todos os tratamentos. Meunpol, et al. (2003) analisando o cultivo de *Penaues monodon* infectados por *V. harveyi* encontraram melhor resultados de sobrevivência para os camarões alimentados com a utilização de probiótico na ração quando comparados com o grupo alimentados com ausência de probiótico. Patnaik et al. (2007), testando o efeito da adição de probiótico na água de cultivo, não encontraram diferença estatística na sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* quando infectados pelo *V. harveyi*.

## CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a utilização do probiótico comercial (*Bacillus sp.*) adicionado na água ou na ração separadamente, aumenta o consumo alimentar durante um período de tempo mais prolongado em camarões infectados pelo *V. harveyi*. Este fato parece estar associado a uma maior resistência adquirida pelos camarões, tendo em vista a manutenção de sua atividade alimentar e constância na contagem total de hemócitos para os tratamentos cultivados com probiótico. Apesar da utilização de probiótico ter interferido positivamente na resposta imune dos camarões, os melhores resultados de crescimento foram observados no tratamento sem probiótico. Entretanto, acredita-se que a resposta imune poderia refletir em melhores resultados de crescimento em camarões expostos ao *V. harveyi* cultivados por um maior tempo.

## LITERATURA CITADA

- Bachère E. Introduction Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, v.191, p.3–11, 2000.
- Barraco, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M. (Eds). *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Editora Varela, 2004, p. 49 – 72.
- Boyd, C. E. Parâmetros da qualidade de água: Oxigênio dissolvido. *Revista da associação brasileira de criadores de camarão*, ano 4, n.1, p.66-69, 2002.
- Boyd, C. E. Manejo da Qualidade da Água na Aqüicultura e no Cultivo do Camarão Marinho. Recife: *Revista da associação brasileira de criadores de camarão*, p.157 s/d.
- Braak, K. V. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Wageningen University, The Netherlands, 2002 , 159p. Tese Doutorado.
- Chythanya, R. ; Karunasagar, I. ; Karunasagar, I. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain . *Aquaculture*, v. 208, p. 1– 10, 2002.

Devaraja, T. N.; Yusoff, F. M.; Shariff, M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture*, v.206, p.245–256, 2002.

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

Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, v.191, p.259–270, 2000.

Horowitz, A.; Horowitz, S. Efficacy of probiotics in growout systems. *The advocate*. p.12, 2000.

Hsu, S.; Chen, J. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture*, v.271, p.61-69, 2007.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyaluksana, K., Soderhall, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, v.191, p.45–52, 2000.

Kubitza, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. 1. ed. Jundiaí-SP: F. Kubitza, 2003. 229 p.

Le Moullac, G., Haffner, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture*, v.191, p.121–131, 2000.

López, N.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Taboada, G.; Valenzuela, M.; Pascual, M.; Sánchez, A.; Rosas, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary h 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. v.224, p.223-243. 2003.

McIntosh, D.; Samocha, T. M.; Jones, E. R.; Lawrence, A. L.; McKee, D.A.; Horowitz, S.; Horowitz, A. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. v.21, p.215-227, 2000.

Meunpol, A. O.; Lopinyosirib, K.; Menasvetac, P. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. v.220, p.437–448, 2003.

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

Motesdeoca, M.; Amano, Y.; Echeverr, F.; Betancourt, I.; Panchana, F.; Sotomayor, M.; Rodrguez, J. La Respuesta Inmunitaria Celular Del Camarón *Litopenaeus Vannamei* Al Wssv Y Su Utilidad En El Control De La Enfermedad En Los Estanques. In: Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 6, 2002, Guayaquil: v.8, n1.

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

Nunes, A.J.P., Parsons, G.J., Size related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187, p.133–151, 2000.

Patnaik, S.; Samocha, T. M.; Kilgen, M. B. Probiotics found ineffective against *Vibrio harveyi* in limited-exchange shrimp pond study. *Global aquaculture advocate*, p.94-96, 2007.

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

Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasaveta, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, n.191, p.271–288, 2000.

Sarathi, M.; Ishaq Ahmed, V.; Venkatesan, C.; G. Balasubramanian, G.; Prabavathy, J.; Sahul Hameed, A. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio.alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, v.271, p. 8–20, 2007.

Sequeira, T.; Tavares, D.; Arala-Chaves, M. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 20, n.2, p.97-104, 1996.

Silva, E. F. B.; Souza Junior, E. A.; Soares, R.; Olivera, A.; Peixoto, S. Avaliação do consumo alimentar do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema fechado com a utilização de probióticos. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007. 15p. Monografia.

Soto-Rodríguez, S. A.; Simoes, N.; Roque, A.; Gómez Gil, B. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, v.258, p.109–115, 2006.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.64, p.655–671, 2000.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados sugerem que a utilização do probiótico comercial (*Bacillus sp.*) adicionado na água ou na ração separadamente, aumenta o consumo alimentar durante um período de tempo mais prolongado em camarões infectados pelo *V. harveyi*. Este fato parece estar associado a uma maior resistência adquirida pelos camarões, tendo em vista a manutenção de sua atividade alimentar e constância na contagem total de hemócitos para os tratamentos cultivados com probiótico. Apesar da utilização de probiótico ter interferido positivamente na resposta imune dos camarões, os melhores resultados de crescimento foram observados no tratamento sem probiótico. Entretanto, acredita-se que a resposta imune poderia refletir em melhores resultados de crescimento em camarões expostos ao *V. harveyi* cultivados por um maior tempo.

## REFERÊNCIAS

Abreu, M.D. **Cultivo de bivalves – Ostreidae (Rafinesque, 1815) e Pectinidae s.s., na Baía da Ilha Grande** – RJ. 1999. Monografia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Estatísticas internacionais. Principais países produtores de camarão cultivado. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/> Acessado em 5/1/2008.

Alabi, A.O; Jones, D.A; Latchford, J.W. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harleyi*. Latchford. Aquaculture. V.178, p.1-11, 1999.

Alavandi, S.V.; Vijayan, K.K.; Santiago, T.C.; Poornima, M.; Jithendran, K.P.; Ali, S.A.; Rajan, J.J.S. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology. V.17, p.115-120. 2004.

Bachere E. Introduction Shrimp immunity and disease control. Aquaculture. v.191, p. 3–11, 2000.

Barraco, M.A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos, In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M. de los A.P. (Eds) **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Editora Varela, 2004, p. 49 – 72.

Boyd, C. E. Parâmetros da qualidade de água: Oxigênio dissolvido. Recife: Revista ABCC. ano 4, n. 1, p. 66-69. 2002.

Boyd, C. E. Manejo da Qualidade da Água na Aqüicultura e no Cultivo do Camarão Marinho. Recife: ABCC, 157p. s/d.

Braak, K. V. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**, Wageningen University. 2002. PhD tese. Wageningen Institute of Animal Sciences, The Netherlands 159p.

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

Devaraja, T. N.; Yusoff, F. M.; Shariff, M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture*, v.206, p.245–256, 2002.

FAO. 2005.Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus: Universal Software For Fishery Statistical Time Series.Version 2.3.

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

Gómez Gil, B., Tron Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J.F., Ingis, V., Guerra Flores, A.L.,. Species of *Vibrio* isolated from the hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. V.163, p.1–9. 1998.

Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* v.191, p.259–270. 2000.

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

Gomez-Gil, B. et al. Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, New York, v.150, p.1769-1777, 2004.

Horowitz, A.; Horowitz, S. Efficacy of probiotics in growout systems. *The advocate*. p.12, 2000.

Hsu, S.; Chen, J. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture*, v.271, p.61-69, 2007.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Soderhall, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. v.191, p.45–52. 2000.

Kubitza, F. **Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões**. 1º edição, Jundiaí-SP: F. Kubitza. 2003. 229 p.

Lavilla-Pitogo, C.R., Leaño, E.M., Paner, M.G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture*. V.164, p.337–349. 1998

Le Moullac, G., Haffner, P. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture*. V.191, p.121–131. 2000.

Liu, P.-C., Lee, K.-K., Chen, S.-N. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* V.22, p.413–416. 1996.

López, N.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Taboada, G.; Valenzuela, M.; Pascual, M.; Sánchez, A.; Rosas, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary h 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. v.224, p.223-243. 2003.

McIntosh, D.; Samocha, T. M.; Jones, E. R.; Lawrence, A. L.; McKee, D.A.; Horowitz, S.; Horowitz, A. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. v.21, p.215-227, 2000.

Meunpol, A. O.; Lopinyosirib, K.; Menasvetac, P. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*.V.220, p.437–448. 2003.

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

Moriarty, D.J.W. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Le'sel, R. Ed., *Microbiology in Poecilothers*. Elsevier, Amsterdam, pp. 217–222. 1990

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

Motesdeoca, M.; Amano, Y.; Echeverr, F.; Betancourt, I.; Panchana, F.; Sotomayor, M.; Rodriguez, J. La Respuesta Inmunitaria Celular Del Camarón *Litopenaeus Vannamei* Al Wssv Y Su Utilidad En El Control De La Enfermedad En Los Estanques.VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, v.8, n1. 2002.

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

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

Nunes, A.J.P., Parsons, G.J., Size related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subitilis*. *Aquaculture* 187, p.133–151, 2000.

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

Patnaik, S.; Samocha, T. M.; Kilgen, M. B. Probiotics found ineffective against *Vibrio harveyi* in limited-exchange shrimp pond study. *Global aquaculture advocate*, p.94-96, 2007.

Pérez-Farfante, I & Kensley, B. Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and sengestoid shrimps and prawns of the world. *Mémoires du museum national d histoire naturelle*. 1997. pp 233.

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

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

Rocha. I. P. Carcinicultura Brasileira: Desenvolvimento Tecnológico, Sustentabilidade Ambiental e Compromisso Social. Obtido via base de dados ABCC. 2007. Data da consulta: 22 nov. 2007. Disponível na Internet <http://www.abccam.com.br>.

Rocha. I. P.; Rodrigues, J.; Amorim, L. A. Carcinicultura Brasileira em 2003. *Revista da ABCC.Recife*, n.1, p.30-36, 2004.

Rodriguez, J.; Le Moullac, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. v.191, p.109–119, 2000.

Sarathi, M.; Ishaq Ahmed, V.; Venkatesan, C.; G. Balasubramanian, G.; Prabavathy, J.; Sahul Hameed, A. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*. V.271, p. 8–20, 2007

Sequeira, T.; Tavares, D.; Arala-Chaves, M. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Develelopmental and Comparative Immunology*. V. 20, n.2, p.97-104. 1996.

Silva, E. F. B.; Souza Junior, E. A.; Soares, R.; Olivera, A.; Peixoto, S. Monografia. **Avaliação do consumo alimentar do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em sistema fechado com a utilização de probióticos.** 2007. Recife. 15 pag.

Soto-Rodríguez, S. A.; Simoes, N.; Roque, A.; Gómez Gil, B. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*. V.258, p.109–115, 2006.

Sritunyalucksana, K.; Söderhäll, K. The proPO and clotting system in crustaceans, *Aquaculture*, v.191, p.53–69, 2000.

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

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

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v.64, p.655–671. 2000

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

Zherdemant, M.T. **Caracterización de una cepa bacteriana de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio in vitro con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico.** Monografía, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior y Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. 1991.80 p.

Yap, W.G. The lowdown on world shrimp culture – II INFOFISH International, Kuala Lumpur, v. 3, p. 20–27, 2001

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

## ANEXO

## Diretrizes para autores - Revista Brasileira de Ciências Agrárias

O trabalho submetido à publicação deverá ser cadastrado no portal da revista. O cadastro deverá ser preenchido apenas pelo autor correspondente que se responsabilizará pelo artigo em nome dos demais autores.

Só serão aceitos trabalhos depois de revistos e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados ou submetidos em publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo.

Os trabalhos subdivididos em partes I, II..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos mesmos revisores. Solicita-se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos.

## Composição seqüencial do artigo

a) Título: no máximo com 15 palavras, em que apenas a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula. Como chamada referente ao título, deve-se usar nº-índice que poderá indicar se foi trabalho extraído de tese, ou apresentado em congresso, entidades financiadoras do projeto e, necessariamente, a data (Recebido para publicação em // ) em que o trabalho foi recebido para publicação;

b) Nome(s) do(s) autor(es): por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome e separados por vírgula, e somente a primeira letra do nome e dos sobrenomes deve ser maiúscula. Colocar referência de nota no final do último sobrenome de cada autor para fornecer, logo abaixo, endereço institucional, incluindo telefone, fax e e-mail. Os autores pertencentes a uma mesma instituição devem ser referenciados por uma única nota. A condição de bolsista poderá ser incluída. Não deve ser colocado ponto ao final de cada nota;

c) Os artigos deverão ser compostos por, no máximo, 6 (seis) autores;

d) Resumo: no máximo com 15 linhas;

e) Palavras-chave: no mínimo três e no máximo cinco, não constantes no Título;

f) Título em inglês no máximo com 15 palavras, ressaltando-se que só a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula;

g) Abstract: no máximo com 15 linhas, devendo ser tradução fiel do Resumo;

h) Key words: no mínimo três e no máximo cinco;

i) Introdução: destacar a relevância do artigo, inclusive através de revisão de literatura;

j) Material e Métodos;

k) Resultados e Discussão;

l) Conclusão devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se nos objetivos da pesquisa;

m) Agradecimentos (facultativo);

n) Literatura Citada.

Quando o artigo for escrito em Inglês ou em Espanhol, o título, resumo e palavras-chave deverão também constar, respectivamente, em Português e em Inglês, mas com a seqüência alterada, vindo primeiro no idioma principal.

## Edição do texto

a) Processador: Word for Windows;

b) Texto: fonte Times New Roman, tamanho 12. Não deverá existir no texto palavras em negrito;

c) Espaçamento: duplo entre o título, nome(s) do(s) autor(es), resumo e abstract; simples entre item e subitem; e no texto, espaço 1,5;

d) Parágrafo: 0,5 cm;

e) Página: Papel A4, orientação retrato, margens superior e inferior de 2,54 cm, e esquerda e direita de 3,00 cm, no máximo de 20 páginas não numeradas;

f) Todos os itens em letras maiúsculas, em negrito e centralizados, exceto Resumo, Abstract, Palavras-chave e Key words, que deverão ser alinhados à esquerda e apenas as primeiras letras maiúsculas. Os subitens deverão ser alinhados à esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula;

g) As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão;

h) Tabelas e Figuras (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos);

- Títulos de tabelas e figuras deverão ser escritos em português e inglês. O título em português deverá ser escrito em fonte Times New Roman, estilo normal e tamanho 9. O título em inglês deverá ser inserido logo abaixo com fonte Times New Roman, estilo itálico e tamanho 8;

- As tabelas e figuras devem apresentar larguras de 9 ou 18 cm, com texto em fonte Times New Roman, tamanho 9, e ser inseridas logo abaixo do parágrafo onde foram citadas pela primeira vez. Exemplo de citações no texto: Figura 1; Tabela 1. Tabelas e figuras que possuem praticamente o mesmo título deverão ser agrupadas em uma única tabela ou figura criando-se, no entanto, um indicador de diferenciação. A letra indicadora de cada sub-figura numa figura agrupada deve ser maiúscula e com um ponto (exemplo: A.), e posicionada ao lado esquerdo superior da figura e fora dela. As figuras agrupadas devem ser citadas no texto da seguinte forma: Figura 1A; Figura 1B; Figura 1C.

- As tabelas não devem ter tracejado vertical e o mínimo de tracejado horizontal. Exemplo do título, o qual deve ficar acima: Tabela 1. Estações do INMET selecionadas (sem ponto no final). Em tabelas que apresentam a comparação de médias, mediante análise estatística, deverá existir um espaço entre o valor numérico (média) e a letra. As unidades deverão estar entre parêntesis.

- As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, e ser diferenciadas através de marcadores de legenda diversos e nunca através de cores distintas. Exemplo do título, o qual deve ficar abaixo: Figura 1. Perda acumulada de solo em função do tempo de aplicação da chuva simulada (sem ponto no final). Para não se tornar redundante, as figuras não devem ter dados constantes em tabelas. Fotografias ou outros tipos de figuras, deverão ser escaneadas com 300 dpi e inseridas no texto. O(s) autor(es) deverá(ão) primar pela qualidade de resolução das figuras, tendo em vista uma boa reprodução gráfica. As unidades nos eixos das figuras devem estar entre parêntesis, mas, sem separação do título por vírgula.

Exemplos de citações no texto

a) Quando a citação possuir apenas um autor: ... Freire (1997) ou ... (Freire, 1997).

b) Quando possuir dois autores: ... Freire & Nascimento (1997), ou ... (Freire & Nascimento, 1997).

c) Quando possuir mais de dois autores: Freire et al. (1997), ou (Freire et al., 1997).

#### Literatura citada

As referências citadas no texto deverão ser dispostas em ordem alfabética pelo último sobrenome do primeiro autor e conter os nomes de todos os autores, separados por ponto e vírgula. As citações devem ser, preferencialmente, de publicações em periódicos dos últimos dez anos, as quais deverão ser apresentadas conforme os exemplos a seguir:

a) Livros

Michereff, S.J.; Andrade, D.E.G.T. de; Menezes, M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. 1.ed. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 398p.

b) Capítulo de livros

Ribeiro, M.R.; Freire, F.J.; Montenegro, A.A. de A. Solos halomóxicos no Brasil: ocorrência, gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: Alvares V., V.H.; Melo, J.W.V. de (org.). Tópicos especiais em ciência do solo. Viçosa/MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. v.3, p.165-208.

c) Revista

Santana, D.F.Y.; Lira, M. de A.; Santos, M.V.F. dos; Dubeux J<sup>o</sup>, J.C.B.; Silva, M. da C. da; Santos, V.F. dos; Fernandes, A. de P. Métodos de recuperação de pastagens de *Brachiaria decubens* Stapf no agreste pernambucano. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.35, n.3, p.699-705, 2006.

d) Citações no prelo (aceitas para publicação) devem ser evitadas e só referenciadas quando forem imprescindíveis à elaboração dos artigos

Costa, J.V.T; Lira Junior, M.A.; Ferreira, R.L.C.; Stamford, N.P.; Campanharo, M.; Souza, C.A. Relacionamento entre tamanho do nódulo e medições convencionais da nodulação. Acta Scientiarum, Maringá, 2007. No prelo.

e) Dissertações e teses

Santos, M.H.B dos. Diagnóstico precoce do sexo de fetos caprinos e ovinos pela ultrasonografia em tempo real. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006. 193p. Tese Doutorado.

f) Trabalhos apresentados em congressos (Anais, Resumos, Proceedings, Disquetes, CD ROMS)

Fischer, A.F.; Hazin, F.H.V.; Viana, D.; Albanez, F.; Carvalho, F.C de; Pacheco, J.C. Dados preliminares da biologia reprodutiva do tubarão flamengo (*Carcharhinus acronotus*) capturados na costa pernambucana. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2, 2005, Vitória. Resumos ... Vitória: SBOC, 2005. p. 130.

No caso de disquetes ou CD Rom, o título da publicação continuará sendo Anais, Resumos ou Proceedings, mas o n<sup>o</sup> de páginas serão substituídas pelas palavras Disquetes ou CD Rom.

g) WWW (World Wide Web) e FTP (File Transfer Protocol) Burka, L.P. A hipertext history of multi-user dimensions; MUD history. <http://www.ccs.neu.edu/home/lpb/mud-history-html>. 10 Nov. 1997.

h) Citações de comunicação pessoal deverão ser referenciadas como notas de rodapé, quando forem imprescindíveis à elaboração dos artigos.

Outras informações sobre a normatização de artigos

1) Os títulos das bibliografias listadas devem ter apenas a primeira letra da primeira palavra maiúscula, com exceção de nomes próprios. O título de eventos deverá ter apenas a primeira letra de cada palavra maiúscula;

2) O nome de cada autor deve ser por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome, sendo apenas a primeira letra maiúscula;

3) Não colocar ponto no final de palavras-chave, key words e títulos de tabelas e figuras. Todas as letras das palavras-chave devem ser minúsculas, incluindo a primeira letra da primeira palavra-chave;

4) No Abstract, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto em vez de vírgula;

5) A Introdução deve ter, preferencialmente, no máximo 2 páginas. Não devem existir na Introdução equações, tabelas, figuras, e texto teórico sobre um determinado assunto;

6) Evitar parágrafos muito longos;

7) Não deverá existir itálico no texto, em equações, tabelas e figuras, exceto nos nomes científicos de animais e culturas agrícolas, assim como, nos títulos das tabelas e figuras escritos em inglês;

8) Não deverá existir negrito no texto, em equações, figuras e tabelas, exceto no título do artigo e nos seus itens e subitens;

- 9) Em figuras agrupadas, se o título dos eixos x e y forem iguais, deixar só um título centralizado;
- 10) Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a primeira letra de cada nome;
- 11) Nos exemplos seguintes o formato correto é o que se encontra no lado direito da igualdade: 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 l (litros) = 5 L; 45 ml = 45 mL; l/s = L s<sup>-1</sup>; 27°C = 27 °C; 0,14 m<sup>3</sup>/min/m = 0,14 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup>; 100 g de peso/ave = 100 g de peso por ave; 2 toneladas = 2 t; mm/dia = mm d<sup>-1</sup>; 2x3 = 2 x 3 (deve ser separado); 45,2 - 61,5 = 45,2-61,5 (deve ser junto). A % é a unidade que deve estar junta ao número (45%). Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, colocar a unidade somente no 1º valor (Exs.: 20 e 40 m; 56, 82,5 e 90,2%). Quando for pertinente, deixar os valores numéricos com no máximo duas casas decimais;
- 12) No texto, quando se diz que um autor citou outro, deve-se usar apud em vez de citado por. Exemplo: Walker (2001) apud Azevedo (2005) em vez de Walker (2001) citado por Azevedo (2005);
- 13) Na definição dos parâmetros e variáveis de uma equação, deverá existir um traço separando o símbolo de sua definição. A numeração de uma equação deve estar entre parêntesis e alinhada esquerda. Uma equação deve ser citada no texto conforme os seguintes exemplos: Eq. 1; Eq. 4.;
- 14) O artigo deve ter, preferencialmente, no máximo 25 citações bibliográficas, sendo a maioria em revistas/periódicos recentes (últimos 5 anos). Seguir rigorosamente os exemplos, apresentados nestas normas, dos formatos das citações bibliográficas no texto e da listagem.
- 15) Quando o artigo for submetido não mais será permitida mudança de nome dos autores, seqüência de autores e quaisquer outras alterações que não sejam por solicitado do editor.