

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE CULTIVO
HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931): AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AMIOLÍTICAS**

CAROLINA KROPNICZKI GOUVEIA

Recife, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE CULTIVO
HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931): AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AMIOLÍTICAS**

CAROLINA KROPNICZKI GOUVEIA

Dissertação de Mestrado apresentada
à Coordenação do Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito final para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas, área de
concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadores: Dra. Fabíola Helena dos Santos Fogaça

Dr. José de Paula Oliveira

Recife, abril de 2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

G719i Gouveia, Carolina kropniczki

Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas / Carolina Kropniczki Gouveia. – Recife: O Autor, 2012.

66 f.: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadores: Fabíola Helena dos Santos Fogaça, José de Paula Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices

1. Enzimas proteolíticas 2. Bactérias 3. Camarão – Criação I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Moraes Júnior, Marcos Antonio (orientador) III. Fogaça, Fabíola Helena dos Santos (coorientadora) IV. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-230

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE CULTIVO
HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931): AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E AMIOLÍTICAS**

CAROLINA KROPNICZKI GOUVEIA

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data da Aprovação ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Presidente)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Membro Interno – Titular)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (Membro Externo – Titular)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

*“Mantenham a mente aberta assim como a
capacidade de se preocupar com a humanidade
e a consciência de fazer parte dela.”*

Dalai Lama

DEDICATÓRIA

Dedico à toda minha família composta por meus verdadeiros mestres, modelos reais de perseverança, parceria, dedicação, paciência e ética.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos que recebi em minha vida.

Aos meus pais Gerson e Edna cujos ensinamentos e sábios conselhos foram essenciais para minha vida pessoal e profissional.

À minha irmã Catharina pelo carinho e amizade.

Ao meu orientador Professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pela confiança depositada em mim e pelo exemplo profissional que ele representa.

À toda equipe do IPA pelo acolhimento nesta grande família. Em especial aos que fazem parte do Laboratório de Biologia do Solo e do Laboratório de Genoma pela amizade, auxílio e ensinamentos.

Aos membros do Laboratório de Enzimologia (LABENZ): Anderson Henriques, Augusto Vasconcelos, Caio Rodrigo, Carolina Costa, Charles Rosemberg, Cybelle Marques, Danielli Matias, Douglas Holanda, Fábio Marcel, Flávia Thuane, Gilmar Cezar, Guilherme Firmino, Helane Costa, Ian Porto, Janilson Felix, Juliett Xavier, Kaline Campos, Kelma Sirleide, Marina Marcuschi, Mirella Assunção, Paula Maia, Paula Rayane, Raquel Pereira, Renata França, Ricardo Abadie, Robson Coelho, Thiago Cahú, Vagne Melo e Werlayne Mendes pelo agradável convívio e permuta de conhecimentos.

Ao Dr. José de Paula de Oliveira pela co-orientação e contribuições prestadas durante todo o trabalho, e ao Coordenador Geral da RECARCINA, Dr. Lourinaldo Cavalcanti, por toda atenção e presteza dedicadas ao desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos Rogério Portela e Arthur Lira do Projeto RECARCINA que se mostraram sempre dispostos a ajudar e pela grata colaboração na execução das atividades deste trabalho.

Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que nessa longa jornada demonstraram toda dedicação ao ensino.

À Adenilda pelos grandes favores prestados durante o curso do Mestrado.

Aos amigos Rosemary Moura, Marcela Vieira e João Scavuzzi da turma de Pós-graduação em Ciências Biológicas por terem tornado o curso mais prazeroso.

Aos amigos Julieta Guerra, Felipe Dias, Rodrigo Csillaz, Cláudia Csillaz, Carina Alves, Danilo Beltrão, Luiz Venceslau e Viviane Bôas pelo companheirismo e incentivo para o término do Mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq e FINEP pelo financiamento do projeto.

À todos que, de alguma forma, contribuíram nesta etapa importante da minha vida deixo o meu muito obrigada. Uma das coisas que aprendi foi que acasos e coincidências não existem, o que há de verdade são momentos e relações, únicos por excelência, que contribuíram de alguma forma, cada um, para que eu me tornasse o que sou hoje.

RESUMO

A produção de camarões marinhos na região Nordeste do Brasil vem crescendo principalmente pela introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*. Adicionadas à dieta ou diretamente na água, as bactérias probióticas têm sido utilizadas para controle biológico e aumento da digestibilidade alimentar e do sistema imune dos animais, elevando a lucratividade dos empreendimentos dedicados à carcinicultura. A influência de enzimas exógenas de bactérias na digestão dos camarões não está bem elucidada e ainda existe uma grande lacuna no que diz respeito a aspectos nutricionais tanto dos microrganismos, quanto dos animais cultivados. Dessa forma, objetivou-se avaliar as atividades proteolítica e amilolítica de cepas bacterianas isoladas do hepatopâncreas e estômago do *L. vannamei* e identificar as bactérias produtoras destas enzimas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Para estudo do ambiente em tanques heterotróficos experimentais utilizando dois probióticos comerciais (HP1 e HP2) e em tanques controles heterotrófico (Het) e autotrófico (Aut), amostras de água foram tomadas ao final do experimento para contagem de bactérias heterotróficas, autotróficas e víbrios por plaqueamento em meios específicos. As médias de população bacteriana foram submetidas à análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dos órgãos das amostras de camarão ($n=3$) foram retirados os materiais internos para isolamento das cepas bacterianas e seleção *in vitro* pela capacidade de produção de enzimas digestivas. Uma cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foi utilizada como testemunha na identificação utilizando os inicializadores universais para o domínio bactéria fD1 (*Forward*) e rD1 (*Reverse*). A população de bactérias heterotróficas foi mais representativa quando comparada às de autotróficas e víbrios, e o experimento Het atingiu a maior média ($1,91 \times 10^7$ UFC/mL). As menores cargas de víbrios foram encontradas nos tanques experimentais HP1 e HP2 com médias de $2,46 \times 10^4$ e $2,00 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente. De 64 cepas isoladas, 11 possuíam índices enzimáticos satisfatórios ($IE \geq 2,0$) para a produção de protease e amilase. Os amplicons após sequenciamento do DNA apresentaram tamanho maior que 1,4Kb e homologia com o *GenBank* e RDP, identificando bactérias como *Bacillus subtilis* e *Shewanella algae*. O incremento da população heterotrófica está relacionado à adição de melaço como fonte de carbono no sistema de cultivo e nos experimentos com os probióticos comerciais, a carga vibrionácea foi reduzida. A técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando os primers fD1 e rD1 foi eficiente na caracterização bacteriana a nível de espécie e até subespécie, revelando a presença de bactérias com potencial para utilização como probiótico.

Palavras-chave: carcinicultura; sistema heterotrófico, bactérias probióticas, enzimas digestivas, 16S rRNA.

ABSTRACT

The marine shrimps cash crop in the Northeast region of Brazil is raising due to the introduction of *Litopenaus vannamei*. The probiotics bacteria added in the diet or directly in the water have been used for biological control and augmentations in the alimental digestibility and in the immune system, increasing the profits of enterprises related to carciniculture. The influence of bacterial exogenic enzymes on shrimp digestion is not clear and still has a gap concerning the nutrition aspects of shrimps and microorganisms. Therefore, this study had as objective the evaluations of proteolytic and amylolytic activities of bacterial strains isolated from hepatopancreas and stomach of *L. vannamei* and identify the bacteria responsible for enzymes production by sequencing the 16S rRNA gene. For environmental study in heterotrophic tanks using two commercial probiotics (HP1 e HP2) and in heterotrophic (Het) and autotrophic (Aut) control tanks, water samples were collected at the end of the experiment in order to count the autotrophic and heterotrophic bacteria and vibrio by plating in specific media. The means of bacterial population were submitted to variance analysis (ANOVA) and complemented by Tukey's test ($p < 0.05$). Internal materials were extracted from shrimp organs samples ($n=3$) in order to isolate the bacterial strains and “*in vitro*” selection due to its capacity to produce digestive enzymes. One strain of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) was used as witness on the identification using the universal primers fD1 (*Forward*) e rD1 (*Reverse*). The population of heterotrophic bacteria was more representative compared with autotrophic and vibrio population and the Het experiment presented the greatest mean ($1,91 \times 10^7$ CFU.mL⁻¹). The minor loads of vibrio were found in the experimental tanks HP1 and HP2 with means $2,46 \times 10^4$ e $2,00 \times 10^4$ CFU.mL⁻¹ respectively. From sixty four strains, only eleven showed satisfactory enzymatic index ($EI \geq 2.0$) to protease and amylase production. The amplicons after the DNA sequencing showed sizes bigger than 1,4Kb and homology with GenBank e RDP, identifying bacteria as *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae*. The increment of heterotrophic population is related with the addition of molasses as carbon source in the crop system and the vibrio load were reduced in the experiments with commercial probiotics. The sequencing technique of 16S rRNA gene using fD1 and rD1 were efficient in the characterization of bacteria at the level of species and even at the level of subspecies, revealing the presence of bacteria with potential use as probiotic.

Keywords: carciniculture, heterotrophic system, probiotic bacteria, digestive enzymes, 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução (em toneladas) da produção nacional de camarão entre os anos 1995 e 2010. Fonte: (ABCC, 2010)....	4
Figura 2. Camarão branco <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
Figura 3. Esquema de microrganismo biorremediador, biocontrolador ou probiótico. Fonte: (modificado de VERSCHUERE et al., 2000)	10
Figura 4. Modelo da estrutura secundária do rRNA. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 a V9). Fonte: (DAMS et al. 1988 apud PAIXÃO, 2009)	17
 Artigo: Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas	
Figura 1: Fluxograma das etapas para seleção de cepas isoladas do <i>L. vannamei</i>	33
Figura 2: Padrão de amplificação do gene 16S rRNA utilizando os primers fD1 e rD1. Marcador Low Mass DNA Ladder e 1Kb.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas segundo a IUBMB.....	13
Tabela 2: Características de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sob diferentes parâmetros.....	15
Artigo: Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas	
Tabela 1: Média de população de bactérias heterotróficas, autotróficas e víbrios nos diferentes tratamentos.....	37
Tabela 2: Atividades semiquantitativas de protease e amilase produzidas pelas cepas.....	38
Tabela 3: Resultados de coloração de Gram e informações adicionais das bactérias isolada.....	39
Tabela 4: Análise das sequências pelo programa OligoCalculator.....	41
Tabela 5: Identificação mais provável das sequências comparadas ao <i>GenBank</i> (NCBI-BLASTn).....	41
Tabela 6: Identificação mais provável das sequências comparadas ao RDP (<i>Seqmath</i>) e número de acesso no banco de dados ribossomais.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
AM	Ágar Marinho
BLAST	sigla em inglês para Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EC	sigla em inglês para Comissão de Enzimas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ES	complexo Enzima-Substrato
FAO	sigla em inglês para Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IE	Índice Enzimático
IGS	sigla em inglês para Espaço Intergênico
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NCBI	sigla em inglês para Centro Nacional de Informação Biotecnológica
OD	sigla em inglês para Densidade Óptica
pb	Pares de Base
pH	Potencial Hidrogeniônico
pl	Pós-larvas
RDP	sigla em inglês para Projeto de Banco de Dados Ribossomal
RECARCINE	Rede de Carcinicultura do Nordeste
RNase	Ribonuclease
rRNA	RNA ribossomal

SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
Taq	Enzima extraída da bactéria <i>Termophylus aquaticus</i>
TBE	Solução tampão contendo Tris, ácido Bórico e EDTA
TCBS	Ágar de Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose
TE	Solução tampão de Tris-HCl e EDTA
TSA	sigla em inglês para Ágar Triptona de Soja
U	Unidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Carcinicultura nacional.....	4
3.2. <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931).....	5
3.3. Técnicas de cultivo	6
3.4. Cultivo em sistema heterotrófico	7
3.5. Importância das bactérias no cultivo	8
3.6. Probióticos na aquicultura	9
3.6.1. Histórico	9
3.6.2. Microrganismos probióticos	10
3.7. Enzimas	13
3.8. Coloração de Gram.....	15
3.9. O gene que codifica o 16S rRNA	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
5. ARTIGO CIENTÍFICO	29
Resumo.....	31
1. Introdução	31
2. Material e Métodos	32
2.1. Coleta de amostras de água e de camarões.....	33
2.2. Quantificação de bactérias.....	33
2.3. Obtenção das cepas bacterianas	34
2.4. Avaliação das atividades enzimáticas das cepas bacterianas	34
2.4.1. Avaliação da atividade proteolítica	34

2.4.2. Avaliação da atividade amilolítica.....	34
2.4.3. Determinação do Índice Enzimático (IE)	35
2.5. Coloração de Gram.....	35
2.6. Identificação por técnicas moleculares.....	35
2.6.1. Extração e purificação do DNA.....	35
2.6.2. Amplificação do gene 16S rRNA	36
2.6.3. Sequenciamento e análise dos fragmentos de DNA	36
3. Resultados e Discussão	37
3.1. Quantificação de bactérias no cultivo	37
3.2. Testes enzimáticos e coloração de Gram das cepas bacterianas	38
3.3. Caracterização molecular	40
5. Conclusões	43
6. Bibliografia	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
7. ANEXOS	48
7.1. Normas da revista – Aquaculture	48
8. APÊNDICES.....	66
8.1. Fotos das atividades extracelulares proteolítica (a) e amilolítica (b) da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> (cepa 56).	66
8.2. Foto da atividade extracelular proteolítica da bactéria <i>Shewanella algae</i> (cepa 252).	66
8.3. Foto da atividade extracelular amilolítica da bactéria <i>Bacillus sp.</i> não cultivável (cepa 272).	66

1. INTRODUÇÃO

Conhecido popularmente como camarão branco do Pacífico, o *Litopenaeus vannamei* é tido como espécie alvo da carcinicultura brasileira devido ao seu elevado grau de rusticidade (possui fácil adaptação a variações de temperatura e salinidade), rentabilidade, crescimento regular, conversão alimentar e grande aceitação no mercado internacional (ANDREATTA e BELTRAME, 2004). O estado de Pernambuco ocupa a quarta posição em produção no *ranking* brasileiro e a busca por tecnologias sustentáveis incentiva o desenvolvimento de novas formas de cultivo (ABCC, 2010).

O cultivo conduzido sob sistema heterotrófico associado a elevadas densidades de estocagem (cultivos intensivos ou super-intensivos) surge como medida biossegura, sustentável e de baixo impacto ambiental. Dentre as características desse modelo de criação de camarão, encontram-se: desenvolvimento de uma biota aeróbica e heterotrófica; pouca ou nenhuma troca de água, apenas reposição; maior rentabilidade; maior produção de matéria orgânica que serve de alimento direto para os camarões; eliminação ou diminuição do risco de introdução de água contaminada e diminuição do consumo de água e emissão de efluentes. Porém, a redução de O₂ dissolvido na água, apesar da forte aeração, e o acúmulo de compostos nitrogenados como amônia (NH₃) e nitrito (NO₂) são tidos como os possíveis pontos negativos (ARANTES, 2007).

Nos sistemas heterotróficos, onde o incremento das populações de microrganismos é feito através de fertilização orgânica aliada à inorgânica, o estudo das bactérias reveste-se de grande importância para o entendimento da dinâmica de mineralização dos compostos orgânicos, que liberam os nutrientes para estimular a produção primária e consequente aumento do alimento natural. A maior disponibilidade de alimento natural traduzida pelas altas concentrações de bioflocos permite a obtenção de maiores produtividades por área cultivada com menor consumo de rações comerciais, elevando assim, a lucratividade dos empreendimentos dedicados à carcinicultura (ARANTES, 2007). Porém, o aparecimento de doenças tem causado prejuízos econômicos incalculáveis ao setor produtivo, principalmente em cultivos com alta densidade populacional, o que remete a maiores investimentos em pesquisas que busquem práticas cada vez mais efetivas e ambientalmente seguras.

Desde a década de 80 os probióticos são utilizados mundialmente na aquicultura com diversas finalidades, entre elas o controle biológico e aumento da digestibilidade alimentar e do sistema imune dos camarões cultivados. Contudo, seu uso muitas vezes é feito de forma inadequada ou sem a comprovação de sua eficácia, gerando descrédito entre aquicultores (MOURIÑO et al., 2010). Probióticos têm sido definidos como suplementos microbianos dietários que beneficiam o hospedeiro através da melhora no valor dietético, na inibição de microorganismos patogênicos,

atividade antimutagênica e anticarcinogênica, estimulação de fatores de crescimento, aumento da resposta imune e na contribuição da digestão enzimática (FULLER, 1989; VERSCHUERE et al., 2000). Vários componentes microbianos e probióticos, tais como β -glicanos, lipopolissacarídeos, peptideoglicanos têm sido reportados como estimulantes da função celular em camarões (VARGAS-ALBORES et al., 1998; GULLIAN et al., 2004).

Segundo Wang (2007), o uso de probióticos induz um aumento na atividade das enzimas digestivas do camarão podendo vir a ser responsável por uma melhora no crescimento destes animais. As enzimas exógenas produzidas pelos probióticos possuem uma pequena contribuição na atividade enzimática total no sistema digestivo, e a presença destes microrganismos pode estimular a produção de enzimas endógenas pelo camarão. Entretanto, a influência das enzimas exógenas na digestão dos camarões necessita de mais estudos devido à ampla diversidade microbiológica nesses cultivos (ZIAEI-NEJAD et al., 2006). Ainda existe uma grande lacuna no que diz respeito a aspectos nutricionais tanto dos microrganismos, quanto dos animais cultivados. A avaliação da atividade de enzimas digestivas de cepas bacterianas encontradas no camarão representa uma informação valiosa para a seleção de microrganismos com potencial para probiótico que favoreça o animal cultivado.

O grande obstáculo para a compreensão destas relações tem sido a dificuldade na identificação das bactérias por técnicas convencionalmente utilizadas (OLIVEIRA et al. 2006), o que remete à utilização de técnicas moleculares que já têm sido extensivamente aplicadas em quase todos os ramos da microbiologia para este fim. O isolamento do DNA bacteriano deve ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo. Desta forma, técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando sequenciamento de regiões conservadas do DNA de bactérias contribuem para a identificação de grupos bacterianos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar cepas bacterianas presentes no hepatopâncreas e estômago do camarão marinho *L. vannamei* cultivado em tanques heterotróficos experimentais e avaliar a atividade de enzimas digestivas.

2.2. Específicos

- Quantificar bactérias heterotróficas, autotróficas e víbrios;
- Isolar morfologicamente cepas bacterianas do hepatopâncreas e estômago dos camarões;
- Avaliar a produção de protease e amilase por bactérias;
- Identificar os microrganismos com atividade enzimática através de técnicas moleculares.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Carcinicultura nacional

A carcinicultura no Brasil, emergida nos anos 70, surgiu como opção à extração de sal no estado do Rio Grande do Norte (ABCC, 2010). O cultivo inicial com a espécie *Marsupenaeus japonicus* logo cedeu espaço aos estudos com espécies nativas como *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis*. Com a evolução da produção do *Litopenaeus vannamei* no Equador, o Brasil adotou a espécie nos anos 90 e a atividade chegou ao atual estágio de desenvolvimento. Em pouco tempo, o camarão branco do Pacífico se destacou devido à sua capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo, altas taxas de crescimento e sobrevivência, boa produtividade e grande aceitação no mercado, transformando-se praticamente na única espécie cultivada comercialmente no país (OSTRENSKY e BARBIERI, 2002).

O cultivo de camarões se tornou uma atividade importante e bastante rentável (BURGOS-HERNÁNDEZ et al., 2005), especialmente no período que vai de 1998 a 2003, no qual a atividade apresentou um incremento de 1244% (Figura 1). Como pode ser visualizado, o aumento na produtividade sofreu uma retração no ano de 2004, principalmente devido ao surgimento de doenças como o vírus da mionecrose infecciosa, a queda no câmbio do dólar e a ação antidumping movida pelos EUA contra o camarão brasileiro (ABCC, 2010). A crise na carcinicultura brasileira se estendeu durante o período de 2004 a 2007 e provocou uma interrupção no crescimento exponencial de 71% ao ano (ROCHA, 2008). Porém, de acordo com os dados do ABCC (2010), o cultivo de camarões marinhos no Brasil retomou seu crescimento e a produção se manteve nos patamares de 80000,0t em 2010 (Figura 1).

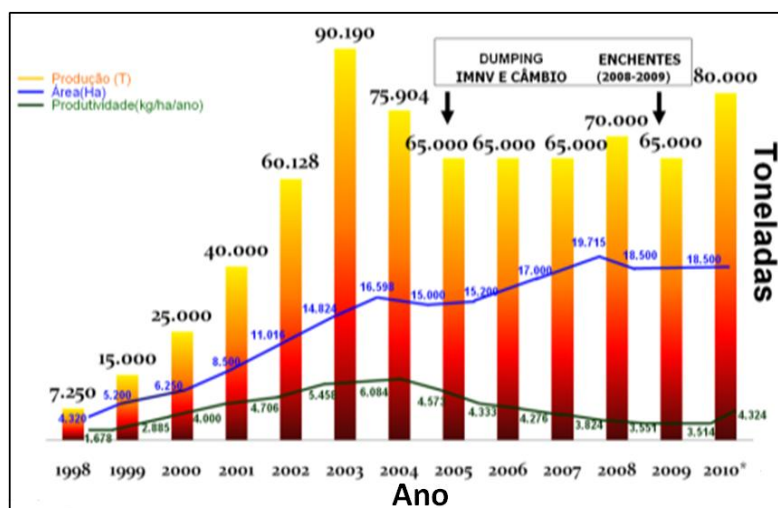


Figura 1: Evolução (em toneladas) da produção nacional de camarão entre os anos 1995 e 2010. Fonte: (ABCC, 2010).

Os investimentos e o aprimoramento de tecnologias no setor da carcinicultura impulsionaram o desenvolvimento da atividade e colocaram o Brasil numa posição de destaque na área de produção de camarões marinhos. Os avanços na área da genética, alimentação, reprodução, patologias e o aprimoramento do sistema de manejo estão amplamente referenciados no acervo tecnológico elaborado e organizados pela ABCC (MARTINS, 2006).

Apesar de o país dispor de condições climáticas, hidrobiológicas e topográficas favoráveis em toda a extensão de sua costa, o crescimento da carcinicultura foi mais perceptível nos estados do Nordeste, respondendo por cerca de 90% da produção nacional com a marca de 65.000 toneladas em 2006 equivalente a 3,1% da produção mundial (TAHIM, 2008). Concentrada a maior parte da produção nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, essa prática foi responsável por cerca de 80% do total produzido da aquicultura marinha entre 2008 e 2010 (MPA, 2011).

O litoral do estado de Pernambuco possui clima tropical e ecossistema extremamente produtivo, o que possibilitou o desenvolvimento de uma carcinicultura rentável e promissora em uma faixa de 187 km de extensão que vai desde o município de Goiana até o município de São José da Coroa Grande. Esta faixa litorânea é caracterizada, por apresentar: uma costa baixa, atingindo em vários pontos, cotas inferiores ao nível de preamar; um ecossistema extremamente produtivo, sendo considerada a região verde onde, ora se sucedem e ora se entrelaçam segmentos de planície recobertos por coqueirais, remanescentes de mata atlântica, restingas, estuários com extensos manguezais, recifes de coral, coroaas, ilhas entre outros (MANZO, 2003). Assume, atualmente, a quarta posição em produção no *ranking* nacional e possui cerca de 98 produtores onde, destes, 88 de pequeno porte (até 10 ha), sete de médio porte (10 a 50 ha) e três de grande porte (>50 ha), perfazendo uma área de 1.108 ha de viveiro (ABCC, 2010).

3.2. *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

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*

Conhecido popularmente como camarão branco, o *L. vannamei* (Figura 2) é uma espécie endêmica do oceano Pacífico sendo encontrada de Sonora no México até Thumbes no norte do Peru. O grande desenvolvimento no cultivo do *L. vannamei* deve-se, em parte, a sua adaptação fácil a condições físico-químicas adversas, como variações na temperatura e salinidade, além de sua taxa regular de crescimento. Com preferência por fundos lamosos, a espécie pode habitar desde a região do infralitoral até profundidades de 72 metros. Na natureza pode chegar a 23 cm de comprimento e apresenta hábito alimentar onívoro (BARBIERI e OSTRENSKY, 2001).



Figura 2: Camarão branco *Litopenaeus vannamei*.

De acordo com Sá (2003), o *L. vannamei* tem uma excelente performance em cultivo, se desenvolvendo muito bem em uma salinidade entre 15 e 30‰, com temperatura entre 23 e 30°C. O requerimento alimentar para o cultivo em confinamento, em termos de ração peletizada, contempla uma carga de proteínas que pode variar entre 22 e 40%, em dependência da intensificação do cultivo nos viveiros; da capacidade de tolerância em alta densidade de estocagem; do baixo requerimento proteico da sua dieta alimentar; e da produtividade natural das águas em uso. Quanto à aceitação comercial da espécie, que garante o custeio de todo o ciclo produtivo, o *L. vannamei* é significativamente preferido entre as demais espécies no mercado nacional e internacional, com forte demanda compradora.

Atualmente são cultivados em todos os países ocidentais produtores de camarão branco do mundo (SANTOS, 2009) e apresentou produção mundial em torno de 2.300.000 toneladas em 2007 (FAO, 2010).

3.3. Técnicas de cultivo

Dentro das técnicas de crescimento utilizadas atualmente na aquicultura estão presentes as técnicas extensiva, semi-intensiva, intensiva e super-intensiva.

A técnica extensiva e semi-intensiva de cultivo, frequentemente utilizadas em países latino-americanos, são caracterizadas pela implantação de fazendas de criação de *L. vannamei* em regiões entre marés sem ventilação ou bombeamento de água. Caracteriza-se o sistema extensivo pela baixa densidade de camarões, alimentação natural acrescida de ração de baixo teor protéico uma vez por dia e densidade de 4 a 10 pós-larvas/m². No sistema de cultivo semi-intensivo ocorre renovação de água e baixa ventilação artificial. A alimentação dos camarões é realizada por adubação dos viveiros e a oferta de ração peletizada é realizada três vezes ao dia e densidade entre 10 a 30 pl/m² (FAO, 2010).

Tradicionalmente o cultivo extensivo de camarão demanda elevados volumes d'água para renovação sendo necessários entre 39 a 199 toneladas de água para produção de um quilo de camarão em viveiro de engorda (ARANTES, 2007; HOPKINS e VILLALÓN, 1992). Adicionalmente, toda água saturada de matéria orgânica é eliminada diretamente nos rios sem nenhum tipo de remediação alterando o equilíbrio do ecossistema agredido (ARANTES, 2007; HOPKINS et al, 1995; BAIRD et al, 1996).

A técnica intensiva, diferentemente da extensiva e semi-intensiva, é geralmente localizada distante de regiões litorâneas. O cultivo é realizado com densidades altas, em torno de 60 a 300 pl/m². Neste, há uma grande demanda de aeração artificial devido à elevada densidade de povoamento. A técnica baseia-se no desenvolvimento de bactérias heterotróficas e formação de bioflocos, monitorando a relação entre Carbono e Nitrogênio (C:N) a fim de manter a relação 10:1, o que favorece o desenvolvimento bacteriano. Já a super-intensiva desenvolve-se em estufas sem troca de água. Ambas as técnicas caracterizam-se pelo baixo impacto ambiental, por serem biosseguras, sustentáveis e por desenvolverem camarões de alta qualidade (FAO, 2010).

3.4. Cultivo em sistema heterotrófico

O meio mais utilizado, tanto em água doce quanto em água salgada, para o cultivo de camarões é o autotrófico, que consiste na utilização de baixas densidades de estocagem, trocas regulares de água para controlar a superpopulação de algas e a utilização de rações com altos níveis de proteína (GROSS et al., 2003). No entanto, sistemas baseados no controle de organismos autotróficos têm sido responsabilizados pelas organizações ambientais pela deterioração dos ecossistemas costeiros e tem sofrido grandes perdas econômicas, resultado de doenças decorrentes de sua auto-poluição (SAMOCHA et al., 2007). Segundo Kautsky e colaboradores (2000), muitas das doenças são originadas em complexos de fazendas que praticam cultivos intensivos e compartilham efluentes de baixa qualidade.

Apontado com alternativa ao sistema intensivo tradicional, o sistema heterotrófico é considerado o sistema mais vantajoso em termos econômicos e sociais devido à sua maior rentabilidade por área e maior necessidade de mão-de-obra (NUNES, 2008). Além disso, esse tipo de sistema de cultivo trabalha em condições super-intensivas, em viveiros pequenos, com alta taxa de aeração, rações com baixo teor protéico, camarões livres de patógenos específicos e pouca ou nenhuma troca de água (BOYD e CLAY, 2002). Apresenta também baixíssimo impacto ambiental quando comparado aos outros modelos de cultivo.

O desenvolvimento do meio heterotrófico também pode ser obtido através de probióticos, baseado no princípio da exclusão competitiva, onde bactérias patogênicas são substituídas por um suplemento simples ou uma cultura mista de bactérias selecionadas (GULLIAN et al., 2004).

Sistemas de produção com troca zero de água buscam eliminar a introdução de água contaminada, sendo apropriados na melhoria da biossegurança das fazendas e na forma de lidar com o uso da água e com a descarga de efluentes dos cultivos intensivos (MCNEIL, 2000). Em sistemas de cultivo heterotróficos sem troca de água ocorre um grande acúmulo de compostos nitrogenados como amônia (excretas dos camarões e decomposição de detritos) e nitrito. Desta forma, o princípio desse tipo de sistema é estimular o crescimento de bactérias heterotróficas que podem atuar como importantes agentes na retirada de formas orgânicas e inorgânicas da amônia através do enriquecimento do ambiente com compostos ricos em carbono (fertilização orgânica), aumentando, assim, a absorção dos compostos tóxicos por bactérias e favorecendo a produção de bioflocos, matéria orgânica que serve de alimento direto para os camarões (AVNIMELECH et al., 1994; AVNIMELECH, 1999; BROWDY et al., 2001).

3.5. Importância das bactérias no cultivo

Os microrganismos que compõem o alimento natural no ambiente de viveiro desempenham papel preponderante no processo de alimentação dos camarões. Microrganismos como plânctons, bactérias e algas são de grande importância para os sistemas aquícolas, particularmente com respeito à produtividade primária, ciclagem dos nutrientes, nutrição dos animais cultivados, qualidade da água, controle de doenças e do impacto dos efluentes ao meio ambiente (MONTAYA e VELASCO, 2000).

A formação de bioflocos, segundo Burford e colaboradores (2004), proporciona um alimento em potencial ao camarão. Este comenta que sistemas ricos em floculados podem contribuir substancialmente para nutrição do *L. vannamei*. No cultivo apenas 15 a 30% da alimentação oferecida ao camarão é incorporada em sua biomassa, entretanto estima-se que 53 a 77% do incremento do peso dos camarões está relacionada a bioflocos e outros alimentos naturais

(ARANTES, 2007). Segundo outros autores, o filme bacteriano e outros organismos geralmente constituem de 5 a 10% da massa das partículas de detritos (CHAMBERLAIN et al., 2001a).

Partículas floculadas possuem elevados níveis de proteínas, aminoácidos e outros elementos alimentares essenciais em níveis satisfatórios (TACON et al., 2002; DECAMP et al., 2003; BURFORD et al., 2004). Contêm também vitaminas e minerais em bons níveis, sendo desnecessária a adição destes fatores de crescimento na ração, reduzindo em 30% os custos destes insumos (CHAMBERLAIN et al., 2001b). Segundo Avnimelech (2006), uma alimentação baseada em microrganismos é de alta qualidade. Entretanto, a utilização da proteína microbiana vai depender da habilidade do animal em capturar a bactéria e de digerir a proteína.

O grupo das α , β e γ -proteobactéria estão relacionados com a oxidação da amônia a nitrato via nitrito (nitrificação) e seguido pela desnitrificação, que reduz o nitrato a nitrogênio gasoso, vias redutoras do nível de amônia nos tanques de cultivo. As subclasses β e γ da classe *Proteobacteria*, contém a maior parte das espécies de bactérias nitrificantes destacando-se os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (OLIVEIRA et al., 2006; BOTHE et al. 2000).

3.6. Probióticos na aquicultura

3.6.1. Histórico

O termo probiótico tem origem das palavras gregas “pro” e “bios” e significa “à favor da vida”. A definição mais aceita de uma forma geral de probiótico, segundo Fuller (1989), é microrganismo vivo utilizado na alimentação que afeta beneficemente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de microrganismos da microbiota intestinal.

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 microrganismos patógenos selecionados, e aumentar o crescimento e sobrevivência de espécies cultivadas (Horowitz e Horowitz, 2000). Em concordância, Verschuere e colaboradores (2000) o definiram como microrganismos vivos que ao serem ministrados a tanques de cultivo atuam beneficemente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico, balanço de bactérias no trato intestinal, ou o ambiente de cultivo (viveiro). Segundo os mesmo autores, os probióticos atuam como biorremediadores e biocontroladores. Os microrganismos biorremediadores são capazes de atuar na melhoria dos parâmetros de qualidade da água e do solo, reduzindo os “rejeitos” produzidos pela aquicultura. Já os microrganismos biocontroladores possuem a capacidade de reduzir a carga de bactérias patogênicas presentes na água e nos biofilmes formados nas paredes dos tanques de cultivo.

Biorremediadores e biocontroladores atuam diretamente no ambiente de cultivo e a melhoria dos animais é observada indiretamente. Os probióticos atuam diretamente nos animais cultivados, seja melhorando a eficiência alimentar, crescimento e sistema imunológico, ou atuando no balanço da relação entre bactérias benéficas e patogênicas no trato intestinal, diminuindo as possibilidades de entrada de patógenos (Figura 3).

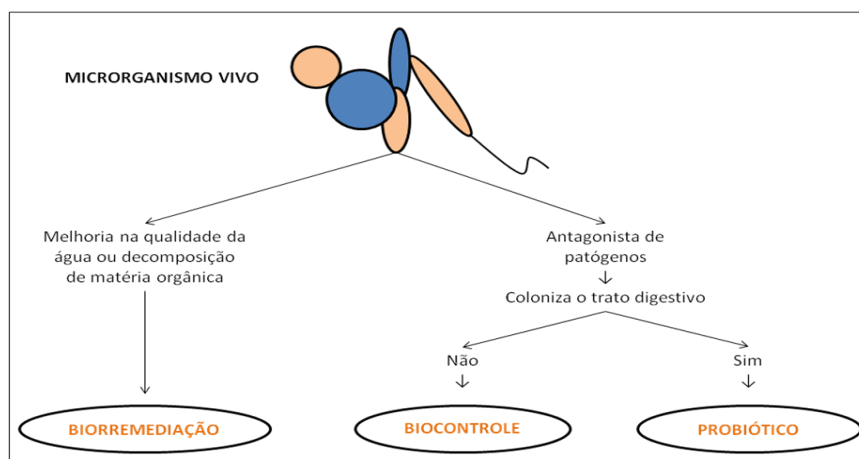


Figura 3: Esquema de microrganismo biorremediador, biocontrolador ou probiótico. Fonte: (modificado de VERSCHUERE et al., 2000).

Com um ambiente mais estável (parâmetros físicos, químicos e biológicos adequados) e com diminuição dos agentes patogênicos bacterianos, os animais cultivados estarão consequentemente mais saudáveis. O importante é entender o funcionamento de cada microrganismo e o modo como ele irá atuar no sistema de cultivo (direta ou indiretamente no animal cultivado). Concomitantemente, a clara definição da finalidade do uso do probiótico é essencial para a correta escolha do produto que irá melhorar os índices zootécnicos do camarão desejados como ganho de biomassa, ganho de peso, dentre outros (MOURIÑO et al., 2010).

3.6.2. Microrganismos probióticos

Diversos microrganismos são utilizados como probióticos na aquicultura, podendo ser utilizados de forma individual (apenas um microrganismo) ou em combinação com outros, porém o isolamento de um microrganismo específico com características benéficas para ser utilizado como probiótico demanda tempo e é um trabalho árduo (MOURIÑO et al., 2010).

Microrganismos probióticos são frequentemente usados como aditivos em alimentos para animais cultivados ou de estimação. Adicionadas ao alimento do camarão, as bactérias probióticas podem facilitar a digestão das proteínas constituintes na própria ração, 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 diminuir o tempo de digestão mesmo quando está no hospedeiro (OCHOA-SOLANO e OLMOS-SOTO, 2006).

Wang (2007) em estudo sobre o efeito da adição de probióticos em rações fornecidas aos camarões *Penaeus vannamei*, observou aumento na atividade enzimática das enzimas proteases, amilases, lipases e celulases dos camarões submetidos à dieta enriquecida com probióticos, comparadas àqueles submetidos à dieta controle. Gomez-Gil e colaboradores (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.

Um grande número de bactérias Gram-negativas são utilizadas como probiótico na aquicultura, destacando-se: *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, entre outros.

Centros de pesquisa equatorianos isolaram diversas cepas de víbrios provenientes de ambientes marinhos com a finalidade de controlar as mortalidades em cultivo de *L. vannamei* e, depois de utilizar cepas isoladas de *Vibrio alginolyticus*, registrou-se uma redução de mais de 90% na utilização de antibióticos, seguido de um incremento de 35% na produção das larviculturas do país (MOURIÑO et al., 2010). Segundo Balcázar e colaboradores (2006), cepas de *V. alginolyticus* têm sido utilizadas para o aumento da sobrevivência e crescimento do camarão branco *L. vannamei*. Apesar de fazer parte da microbiota natural do camarão, bactérias vibrioláceas são consideradas os principais patógenos bacterianos e causa de perda de produção especialmente na larvicultura e engorda (COSTA, 2006). As principais espécies deste gênero que apresentam risco ao cultivo são *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahemolyticus* e *V. harveyi* (COSTA, 2006; LIGHTNER, 1996). Frequentemente as espécies *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* estão associadas à mortalidade (GULLIAN et al., 2004). 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). O gênero *Shewanella* é um dos mais estudados dentro do grupo de bactérias redutoras de ferro (SILVA, 2009). Estudos realizados por Shakibazadeh e colaboradores (2008) apontam a *Shewanella algae* como alternativa no combate aos *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, apresentando razoável potencial antimicrobiano em ampla gama de temperatura e pH.

As bactérias Gram-positivas possuem o maior número de representantes quando se trata de microrganismos probióticos, a dizer: *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*.

Contudo, estas não são dominantes no intestino de organismos aquáticos e muitos estudos têm sido realizados no intuito de induzir uma dominância artificial dessas bactérias (MOURIÑO et al., 2010).

Bacillus possuem a capacidade de reduzir a quantidade de patógenos presentes na água e diminuir as concentrações de nutrientes na água, melhorando o ambiente de cultivo. Adicionalmente, algumas espécies de *Bacillus sp.* colonizam o trato intestinal de organismos aquáticos quando incorporados às dietas, atuando como probióticos. Uma grande vantagem do uso deste tipo bacteriano é tida na sua capacidade de esporular, pois quando se encontram em condições adversas, formam esporos (cistos) que as mantêm inativas até as condições do meio externo se restabelecerem, o que facilita a manipulação deste microrganismo devido à resistência dos esporos ao processo de peletização. Além, são facilmente produzidos em escala comercial através do processo *spray-dryer* (MOURIÑO et al., 2010). 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. Dantas e colaboradores (2009) afirmam que a utilização do *Bacillus spp.* como probiótico pode influenciar na resistência do camarão quando submetido ao *V. harveyi*. Estudos realizados por Far e colaboradores (2009) com o *L. vannamei* também relatam um aumento da taxa de sobrevivência e rendimento. Rengpipat e colaboradores (1998) observaram exclusão competitiva utilizando o *Bacillus spp.* adicionado a ração, obtendo melhores resultados de ganho de peso e sobrevivência no cultivo de *P. monodon*.

Lactobacillus têm a capacidade de colonizar o trato intestinal, alterando a dominância natural da microbiota intestinal e promovendo uma melhora no sistema imunológico dos animais, de acordo com estudos realizados por alguns autores em robalos, tilápias, salmões, trutas e camarões (CARNEVALI et al., 2006; JATOBÁ et al., 2008; VIEIRA et al., 2008). Adicionalmente, estão relacionados ao aumento de crescimento e eficiência alimentar, prevenção de desordens intestinais e pré-digestão de fatores anti-nutricionais presentes em ingredientes da dieta (MOURIÑO et al., 2010). Villamil e colaboradores (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*.

Bactérias ácido-láticas também usadas como probióticos por sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas por meio da produção de compostos antibacterianos e de sua capacidade de aumentar a imuno-competência dos animais afetados por alguma enfermidade (MOURIÑO et al., 2010).

O efeito probiótico da utilização de leveduras é questionável por estas, provavelmente, não se manterem vivas no trato intestinal dos animais. Pode-se relacionar às leveduras efeitos de imunoestimulação, assim como os β -glucanos, não sendo incluídas e classificadas como probióticos (MOURIÑO et al., 2010).

3.7. Enzimas

Enzimas são biomoléculas catalisadoras que atuam diminuindo o nível de energia de ativação, implicando no aumento da velocidade das reações bioquímicas (HARVEY et al., 2009). Todas as enzimas conhecidas, com exceção de certos RNAs catalíticos, são proteínas (NELSON e COX, 2004), e estão presente em todos os organismos vivos, sendo essenciais, tanto para a manutenção, como para o crescimento e a diferenciação celular (GUPTA et al., 2002).

As enzimas agem em sequências organizadas e catalisam centenas de reações sucessivas. Essas biomoléculas catalisadoras não reagem quimicamente com as substâncias sobre as quais atuam, nem alteram o equilíbrio das reações. De uma maneira geral, uma enzima liga-se ao seu substrato formando um complexo Enzima-Substrato (ES), de caráter transitório. Provavelmente, apenas uma fração da molécula denominada sítio ativo é a responsável pela ligação da enzima ao substrato, e essa fração determina a especificidade enzimática (NELSON e COX, 2004).

Uma vez que a reação química catalisada por uma enzima é a propriedade específica que distingue uma enzima de outra, a IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) dividiu as enzimas em seis grandes classes (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

CLASSE	REAÇÕES QUE CATALISAM
1. Oxidorredutases	Reações de oxidação-redução
2. Transferases	Reações de grupos contendo C, N ou P -
3. Hidrolases	Clivagem das reações adicionando água
4. Liasas	Clivagem de C-C, C-S e certas ligações de C-N
5. Isomerases	Racemização de isômeros ópticos ou geométricos
6. Ligases	Formação de pontes entre C e O, S, N acoplados a hidrólise de fosfatos de alta energia.

C, carbono; N, nitrogênio; P-, íon fosfato; S, enxofre; O, oxigênio. Fonte: (NELSON e COX, 2004).

Enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana, depois dos antibióticos, para inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos (PANDEY et al., 1999). Devido à vasta aplicação de enzimas hidrolíticas nesses setores industriais, as proteases formam o grupo mais estudado das hidrolases, e

as amilases e celulasas representam o segundo maior grupo de enzimas (GODFREY e WEST, 1996).

Em conjunto, enzimas digestivas presentes nos hepatopâncreas de *L. vannamei* são capazes de hidrolisar uma variedade de substratos e vários fatores estão implicados em sua regulação. Entre esses fatores destacam-se a dieta (LE MOULLAC et al. 1996; GUZMAN et al., 2001; BRITO et al., 2001), variações ontogênicas (LOVETT e FELDER, 1990; LEMOS e RODRIGUEZ, 1998), tamanho corporal (LEE e LAWRENCE, 1985), ritmo circadiano (GONZALEZ et al., 1995; MOLINA et al., 2000), fases da muda (MOLINA et al., 2000; SÁNCHEZ-PAZ et al., 2003) e até mesmo um efeito estimulante da água de tanques tem sido reportado (MOSS et al., 2001).

O êxito no cultivo depende, em grande parte, de uma nutrição adequada e de um bom manejo alimentar. As proteases estão entre as enzimas de crustáceos que recebem maior atenção (FERNÁNDEZ-GIMENEZ et al., 2002), pois são responsáveis pela digestão de proteínas dos alimentos ingeridos, os componentes mais caros da alimentação de camarões (SÁNCHEZ-PAZ et al., 2003). Microrganismos produzem vários tipos de proteases que podem ser intracelulares (importantes nos processos celulares como esporulação e diferenciação, maturação de enzimas, reciclagem de proteínas e manutenção do “pool” de proteínas) e extracelulares (importantes na hidrólise de proteínas e habilitam a célula a absorver e utilizar os produtos dessa hidrólise) (GUPTA et al., 2002). A produção de proteases por microrganismos é grandemente influenciada pelos componentes do meio, como carbono, nitrogênio, íons metálicos, fatores físicos como temperatura, pH e tempo de incubação (PURI et al., 2002).

Para a realização da digestão do amido há a atuação de diversas enzimas. A α -amilase [EC 3.2.1.1] é uma endocarbohidrase encontrada em eubactérias a eucariotos (OUDJERIOU et al., 2003) responsável pela hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ no amido e glicogênio. Nesse processo são produzidos oligossacarídeos, α -dextrinas e maltose (VAN WORMHOUDT e FAVREL, 1988), que são hidrolisados à glicose pela ação complementar da α -glicosidase [EC 3.2.1.20], da sacarase-isomaltase [EC 3.2.1.48] e da α -dextrinase [EC 3.2.1.20]. Dentre essas, a α -glicosidase está diretamente relacionada à exo-hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ da maltose e demais oligossacarídeos formados após a atuação da α -amilase (LE CHEVALIER e VAN WORMHOUDT, 1998; DOUGLAS et al., 2000; ROSAS et al., 2000). Muitos microrganismos estão relacionados à produção de amilases neutras ou ácidas, especialmente do gênero *Bacillus* (HAGIHARA et al., 2001; IGARASHI et al., 1998). Muitas enzimas extracelulares são obtidas a partir de bactérias desse gênero Gram-positivo pela facilidade de secreção de proteínas para o meio extracelular devido à ausência de uma membrana externa (STEPHESON e HARWOOD, 1998).

3.8. Coloração de Gram

O teste de Gram é uma técnica de largo emprego em Microbiologia que foi idealizada por Gram (1884) e Roux (1886) que verificou que espécies bacterianas se comportavam diferentemente quanto à coloração de Gram e dividiu as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas (BROCK, 1974; STANIER et al., 1986; GERHARDT, 1994).

As bactérias Gram-positivas apresentam parede celular com várias camadas de proteoglicanos, formando uma estrutura rígida e grossa. Também é possível encontrar nas paredes celulares de Gram-positivas ácidos teicóicos aderidos à camada de peptidoglicano unida à membrana plasmática, como ácido lipoteicóico, e ácido teicóico da parede unida ao peptidoglicano, como teicóico. Nas bactérias Gram-negativas a parede celular consiste em poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos (TORTORA, 2010). As diferenças entre ambas podem ser observadas na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Características de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sob diferentes parâmetros.

CARACTERÍSTICAS	GRAM-POSITIVA	GRAM-NEGATIVA
Reação de Gram	Azul ou roxo	Rosa ou vermelho
Camada de peptidoglicano	Grossa	Fina
Ácidos teicóicos	Presente na maioria	Ausente
Espaço periplásmico	Ausente	Presente
Membrana externa	Ausente	Presente
Conteúdo lipopolissacarídico	Quase nenhum	Alto
Conteúdo lipídico e lipoprotéico	Baixo	Alto
Estrutura flagelar	2 anéis no corpo basal	4 anéis no corpo basal
Toxinas produzidas	Exotoxinas	Exotoxinas e Endotoxinas
Resistência à ruptura física	Alta	Baixa
Ruptura da parede celular por lisozimas	Alta	Baixa
Susceptibilidade à penicilina e sulfonamida	Alta	Baixa
Susceptibilidade a estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina	Baixa	Alta
Inibição por corantes básicos	Alta	Baixa
Susceptibilidade a detergentes aniônicos	Alta	Baixa
Resistência à azida de sódio	Alta	Baixa
Resistência ao ressecamento	Alta	Baixa

A investigação das atividades metabólicas das bactérias “*in vitro*” denominadas Provas Bioquímicas servem para auxiliar a identificação de grupos ou espécies de bactérias ou leveduras através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação das enzimas de um dado microrganismo. Uma vez que, os microrganismos possuem um sistema enzimático específico, promovendo transformação bioquímica específica, as provas bioquímicas podem ser utilizadas na prática para a sua caracterização. Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultivo especiais contendo o substrato a ser analisado e

fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento. (RIBEIRO e SOARES, 2002).

3.9. O gene que codifica o 16S rRNA

A base dos critérios de agrupamento e de classificação taxonômica passou de apenas classificação morfológica para critérios moleculares em análises filogenéticas. Sequências de nucleotídeos altamente conservados em bactérias têm sido o fundamento para a revisão das inter-relações entre espécies, gêneros ou até mesmo famílias (OLSEN et al., 1994).

O uso da sequência de nucleotídeos do gene que codifica o 16S rRNA (subunidade menor do ribossomo) foi estabelecido como método padrão de análise para bactérias. Os genes que codificam para RNAs ribossômicos são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, uma vez que ocorre nas organelas responsáveis pela síntese protéica. A sequência destes genes corresponde a regiões altamente conservadas (AMANN et al., 1995). Desta forma, estudos têm utilizado o sequenciamento total ou parcial dos genes (16S rRNA e 23S rRNA), bem como regiões intergenicas (IGS) para estudos de filogenia (GURTLE e STANISH, 1996). Os ribossomos são estruturas pequenas, com cerca de 20 a 30 nm de diâmetro, consistindo de duas subunidades de tamanhos desiguais, referentes às subunidades maior e menor. Uma subunidade é composta por um complexo formado por moléculas de RNA e proteínas e cada molécula contém pelo menos uma subunidade de RNA ribossômico e uma grande quantidade de proteínas ribossomais. O ribossomo procarioto em *Escherichia coli* tem um tamanho de 70S e aproximadamente dois terços dele consiste de rRNA e o restante de proteínas ribossômicas. Assim, as subunidades 50S (contém o rRNA 16S) e 30S (contém os rRNAs 5S e 23S) combinadas originam a estrutura 70S (IKEDA, 2010).

A sequência do gene 16S rRNA é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos e certos atributos podem favorecê-lo como marcadores moleculares (WOESE et al., 1983). Além de corresponder a regiões altamente conservadas, estas regiões conservadas estão alternadas entre 9 regiões variáveis (V1 a V9) (Figura 4).

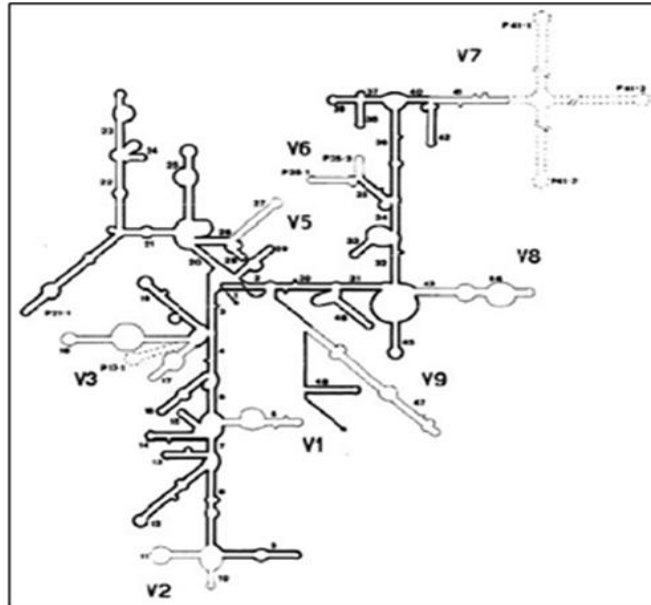


Figura 4: Modelo da estrutura secundária do rRNA. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 a V9). Fonte: (DAMS et al. 1988 apud PAIXÃO, 2009).

A região correspondente a V4 não é encontrada em procariotos. Estas regiões variáveis são utilizadas para determinação de filogenia entre os procariotos (WOESE et al. 1983).

Os amplicons obtidos através da região 16S rDNA são sequenciados e analisados usando um banco de dados onde estão depositadas sequências do gene 16S rRNA por meio de softwares apropriados, permitindo rápida identificação de bactérias com base na sequências ribossomais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC (2010). **Estatística Nacional**. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: 09 fevereiro 2010.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.

ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. **Aquicultura – Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, p. 200-207. 2004.

ARANTES, R. F. **O efeito da relação carbono-nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação**. Dissertação de Mestrado, Florianópolis: UFSC, 2007. 39p.

AVNIMELECH, Y.; KOCHVA, M.; DIAB, S. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted C to N ratio. **Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgheh, v.46, p.119-131, 1994.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v.176, p.227-235, 1999.

AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering**, v. 34, 172-178. 2006.

BAIRD, D. J.; BEVERIDGE, M. C. M.; KELLY, L. A.; MUIS, J. F. **Aquaculture and water resource management**. Thesis. London: Blackwell Science, 1996. 219p.

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

BARBIERI, R. C.; OSTRENSKY, A. **Camarões Marinhos (Reprodução, Maturação e Larvicultura)**. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2001.

BOTHE, H.; JOST, G.; SCHLOTER, M.; WARD, B. B.; WITZEL, K. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Review**, v.24, p.673-690, 2000.

BOYD, C. E.; CLAY, J. W. "Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Superintensive Shrimp Aquaculture System". Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. **Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium**. 17 p., 2002.

BRITO, R.; ROSAS, C.; CHIMAL, M. E.; GAXIOLA, G. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 257-266, 2001.

BROCK, T. D. **Biology of Microorganisms**. 4th edition. Prentice Hall, Inc, Englewood Cliffs, 852p, 1974.

BROWDY, C. L.; BRATVOLD, D.; STOKES, A. D.; MCINTOSH, R. P. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: THE NEW WAVE, OF THE SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE, 2001, Baton Rouge. **Proceedings...**, Baton Rouge: The World Aquaculture Society, p.20-34, 2001.

BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J.; MCINTOSH, R. P.; BAUMAN, R. H.; PEARSON, D. C. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v.232, p.525–537, 2004.

BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; FARIAS, S. I.; TORRES-ARREOLA, W.; EZQUERRABRAUER, J. M. *In vitro* studies of effects of aflatoxin B1 and fimonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 250, p. 399-410, 2005.

CARNEVALI, O.; VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus*

labrax, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**. v. 258, p. 430-438, 2006.

CHAMBERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; MACINTOSH, R. P.; VELASCO, M. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - I: Nutrient transformation and water quality benefits. **Global Aquaculture Advocate**, April, p. 53-56, 2001a.

CHAMBERLAIN, G.; AVNIMELECH, Y.; MACINTOSH, R. P.; VELASCO, M. Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C:N - II: Composition and nutritional value of organic detritus. **Global Aquaculture Advocate**, June, p. 23-24, 2001b.

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.

COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará**. Tese de Mestrado, Fortaleza: UFCE, 2006. 102p.

DANTAS, D.; ALVES, E.; REGO, M.; SOARES, R.; PEIXOTO, S.; GÁLVEZ, A. Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.85-90, jan.-mar. 2009.

DECAMP, O.; CODY, J.; CONQUEST, L.; DELANOY, G.; TACON, A. G. J. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Bonne), with experimental zero exchange culture systems. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 345-355, 2003.

DOUGLAS, S. E.; MANDLA, S.; GALLANT, J. W. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture** [S.I.], v. 190, n. 3-4, p. 247-260, 2000.

FAO (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Cultured aquatic species information programme**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/em>. Acesso em: 31 maio 2010.

FAR, H. Z.; SAAD, C. R. B.; DAUD, H. M.; HARMIN, S. A.; SHAKIBAZADEH, S. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.14, p. 3369-3376, 2009.

FERNÁNDEZ-GIMENEZ, A. V.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE DEL TORO, M. A.; FENUCCI, J. L. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, *Penaeidae*) and relationship with molting. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** [S.I.], v. 132, n. 3, p. 593-598, 2002.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365–378, 1989.

GERHARDT, P. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington, 791p, 1994.

GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey, T. (ED). **Industrial Enzymology**. 2nd ed. London, Macmillan Press, p. 120-138, 1996.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; VELASCO-BLANCO, G. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. **Aquaculture**, v. 211, p. 43-48, 2002.

GONZALEZ, R.; GOMEZ, M.; CARRILLO, O. Variaciones cronobiológicas de la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 16, n. 1-3, p. 177-183, 1995.

GRAM, C. Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. **Fortschr. Med.**, v. 2, p. 185-189, 1884.

GROSS, A.; NEMIROVSKY, A.; ZILBERG, D.; KHAIMOU, A.; BRENNER, A.; SNIR, E.; RONEN, Z.; NEJIDAT, A. Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture. **Aquaculture**, v. 223, p. 51-62, 2003.

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

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GURTLER, V.; STANISH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology (Reading)**, v. 142, p. 3-16, 1996.

GUZMAN, C.; GAXIOLA, G.; ROSA, C.; TORRE-BLANCO, A. The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 7, p. 113-122, 2001.

HAGIHARA, H.; IGARASHI, K.; HAYASHI, Y.; ENDO, K.; IKAWA-KITAYAMA, K.; OZAKA, K.; KAWAI, S.; ITO, S. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1744-1750, 2001.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4a. ed.: Artmed, 2009.

HOPKINGS, J. S.; VILLALÓN, J. Synopsis of industrial panel input on shrimp pond management. In: WINBAN, J.A. (Ed.). **Proceedings of the special session on shrimp Farming**. World Aquaculture Society, p.138-143, 1992.

HOPKINGS, J. S.; SANDIFER, P. A.; DEVOE, M. R.; HOLLAND, A. F.; BROWDY, C. L.; STOKES, A. D. Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States. **Estuaries**, v. 18, p. 25-42, 1995.

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

IGARASHI, K.; HATADA, Y.; HAGIHARA, H.; SAEKI, K.; TAKAIMA, M.; UERMURA, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3280-3282, 1998.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. Tese de mestrado, Curitiba: UFP, 2010. 100p.

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

KAUTSKY, N.; RÖNNBÄCK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspective on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

LE CHEVALIER, P.; VAN WORMHOUDT, A. Alpha glucosidase from the hepatopâncreas of the shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea - Decapoda). **Journal of Experimental Zoology** [S.I.], v. 280, p. 384-394, 1998.

LE MOULLAC, G.; KLEIN, B.; SELLOS, D.; VAN WORMHOUDT, A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 208, p. 107-125, 1996.

LEE, P. G.; LAWRENCE, A. L. Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus). **Journal of the World Mariculture Society**, v. 16, p. 257-287, 1985.

LE MOS, D.; RODRIGUEZ, A. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. **Aquaculture**, v. 160, p. 103-116, 1998.

LIGHTNER, D. V. Diseases of penaeid shrimp. In: MCVEY, J. P. (Ed.). **Handbook of mariculture: crustacean aquaculture**. Boca Raton: CRC Press, p.393-486, 1996.

LOVETT, D. L.; FELDER, D. L. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) **Biology Bulletin**, v. 178, p. 144-159, 1990.

MANSO, V. A. V. **Definição dos pontos de contorno da linha de preamar máxima atual do município de Ipojuca-PE**. Disponível em: <www.cprh.pe.gov.br/downloads/pnma2/relatorio-final.pdf> (2003). Acesso em: 17 nov. 2011.

MARTINS, P. C. C. Cultivo de Camarão marinho. **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**, p. 121- 135, 2006.

MCNEIL, R. Zero exchange, aerobic, heterotrophic systems: key considerations. **The Advocate**, p.72-76, June, 2000.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura (Brasil 2008-2009)**, 2011.

MOLINA C.; CADENA, E.; ORELLANA, F. **Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda**. In:V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola (ed. by L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa & R. Civera-Cerecedo). Mérida, Yucatán, México, p. 358-380, 2000.

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.

MONTOYA, R.; VELASCO, M. O papel das bactérias nas estratégias de alimentação e de manejo em sistemas de aqüicultura. **Revista da ABCC**, Recife, v. 2, n. 2, p. 22-23, agosto, 2000.

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

MOSS, S. M.; DIVAKARAN, S.; KIM, B. G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 125-131, 2001.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; VIEIRA, F. N. Utilização de probióticos na aqüicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 20, p. 52-59, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lenhinger: Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1119p, 2004.

NUNES, A. J. P. **Estudo de estocagem do camarão do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* em cultivo heterotrófico. Relatório técnico parcial**. (LABOMAR), UFCE, Fortaleza – Ceará. Setembro, 2008.

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

OLIVEIRA, S. S.; WASIELESKY, W.; BALLESTER, E. L. C.; ABREU, P. C. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 28, n. 1, p. 33-45, 2006.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p. 1-12, 1994.

OSTRENSKY, N. A.; BARBIERI, R. C. J. **Camarões marinhos**. Aprenda fácil, 367p. Viçosa. 2002.

OUDJERIOUAT, N.; MOREAU, Y.; SANTIMONE, M.; SVENSSON, B.; MARCHIS-MOUREN, G.; DESSEAUX, V. On the mechanism of α -amylase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 3871-3879, 2003.

PAIXÃO, D. A. A. **Prospecção gênica e diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel**. Dissertação de Mestrado, São Paulo, UNESP, 2009. 70p.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGRAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY. **Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera**. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, v. 175, 233p, 1997.

PURI, S.; BEG, Q. K.; GUPTA, R. Optimiation of alkaline protease production from *Bacillus sp.* by response surface methodology. **Current Microbiology**, v. 44, p. 286-290, 2002.

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.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática : Roteiro e Manual**. Atheneu, Rio de Janeiro, 2002.

ROCHA, I. P. Desempenho da Carcinicultura Brasileira em 2007: Desafios e oportunidades para 2008. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC)**, Março, 2008.

ROSAS, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; ARENA, L.; LEMAIRE, P.; SOYEZ, C.; VAN WORMHOUDT, A. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** [S.I.], v. 249, n. 2, p. 181-198, 2000.

ROUX, G. Sur un procédé technique de diagnose des gonococci. **Arch. générales de Médecine**. v. 2, p. 757, 1886.

SÁ, T. D. Projeto de carcinicultura Salina Nova Vida Beberibe/CE. Ceará Aquacultura Ltda. Estudo de Impacto Ambiental (EIA). **Geoconsult Consultoria, Geologia e Meio Ambiente**, v. I, tomo A, Fortaleza, 2003.

SAMOCHA, T. M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; ALI, A.; BURGER, J. M.; ALMEIDA, R. V.; AYUB, Z.; HARISANTO, M.; HOROWITZ, A.; BROCK, D. L. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and growout systems for *Litopenaeus vannamei*, **Aquacult. Eng.**, doi:10.1016/j.10.004, 2007.

SÁNCHEZ-PAZ, A.; GARCÍA-CARREÑO, F.; MUHLIA-ALMAZÁN, A.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation condition. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 292, p. 1–17, 2003.

SANTOS, E. C. B. **Desempenho produtivo do camarão cinza *Litopenaeus vannamei*, utilizando técnicas de povoamento direto e indireto.** Dissertação de Mestrado, Recife: UFRPE, 2009. 47p.

SHAKIBAZADEH, S.; SAAD, C. R.; CHRISTIANUS, A.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K.; SHAMSUDIN, M. N.; NEELA, V. K. Evaluation of *in vitro* *Vibrio* static activity of *Shewanella algae* isolated from healthy *Penaeus monodon*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3952-3961, Nov., 2008.

SILVA, A. L. S. **Estudos ecogenômicos e bioprospectivos de *Shewanella* spp.** Dissertação de Mestrado. Natal: UFRN, 2009. 30p.

STANIER, R. Y; INGRAHAM, J. L; WHEELIS, M. L; PAINTER, P. R. **The Microbial World.** 5th ed. Prentice Hall, New Jersey, 689p, 1986.

STEPHENSON, K.; HARWOOD, C. Influence of a cell-wall-associated protease on production of α -amylase by *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2875-2881, 1998.

TACON, A. G. J.; CODY, J.; CONQUEST, L.; DIVAKARAN, S.; FORSTER, I. P.; DECAMP, O. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 121-137, 2002.

TAHIM, E. F. **Inovação e meio ambiente: o desafio dos arranjos produtivos de cultivo de camarão em cativeiro no estado do Ceará.** Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: UFRJ/IE, 2008. 318 p.

TORTORA, G. J. **Microbiology: an introduction.** TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 10th ed, p. 87, 2010.

VAN WORMHOUDT, A.; FAVREL, P. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda) amylase system: study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** [S.I.], v. 89, p. 201-207, 1998.

VARGAS-ALBORES, F.; HERNÁNDEZ, L. J.; GOLLAS, G. T.; MONTAÑO, P. K.; JIMENEZ, V. F.; YEPIZ, P. G. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In: Flegel, T.W. (Ed.), **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, 1998.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 655–671, 2000.

VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; RAMIRES, C.; MARTINS, M. L.; BARRACCO, M. A. A. M.; VINATEA, L. A. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 763-769, 2008.

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.

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

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology. Rev.**, v. 51, p. 221-271, 1983.

ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M. H.; TAKAMI, G. A.; LOVETT, D. L.; MIRVAGHEFI, A. R.; SHAKOURI, M. 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.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação serão apresentados no artigo “**Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas**” (manuscrito), que será submetido à publicação para a “**Aquaculture**” (ISSN: 0044-8486) com fator de impacto 2,552 e classificação A2 pela CAPES 2012.



Isolamento e identificação de bactérias de cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931): avaliação da atividade de enzimas proteolíticas e amilolíticas

Carolina Kropniczki Gouveia^{a,b}, Rogério William Santos Portela^{a,b}, Arthur Lira Gabriel^b, José de Paula Oliveira^b, Fabíola Helena dos Santos Fogaça^c, Ranilson de Souza Bezerra^a

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

^bInstituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Laboratório de Biologia do Solo e Laboratório de Genoma, Bongi, 50761-000, Recife-PE, Brasil.

^cEmbrapa Meio-Norte, Zona Rural, 64200-970, Parnaíba-PI, Brasil.

Corresponding author:

Ranilson Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

E-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo

Adicionadas à dieta ou diretamente na água, as bactérias probióticas têm sido utilizadas para controle biológico e aumento da digestibilidade alimentar e do sistema imune dos animais, elevando a lucratividade dos empreendimentos dedicados à carcinicultura. A influência de enzimas exógenas de bactérias na digestão dos camarões não está bem elucidada e ainda existe uma grande lacuna no que diz respeito a aspectos nutricionais tanto dos microrganismos, quanto dos animais cultivados. Dessa forma, objetivou-se avaliar as atividades proteolítica e amilolítica de cepas bacterianas isoladas do hepatopâncreas e estômago do *Litopenaeus vannamei* e identificar as bactérias produtoras destas enzimas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Para estudo do ambiente em tanques heterotróficos experimentais utilizando dois probióticos comerciais (HP1 e HP2) e em tanques controles heterotrófico (Het) e autotrófico (Aut), amostras de água foram tomadas ao final do experimento para contagem de bactérias heterotróficas, autotróficas e víbrios por plaqueamento em meios específicos. As médias de população bacteriana foram submetidas à análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dos órgãos das amostras de camarão ($n=3$) foram retirados os materiais internos para isolamento das cepas bacterianas e seleção *in vitro* pela capacidade de produção de enzimas digestivas. Uma cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foi utilizada como testemunha na identificação utilizando os inicializadores universais para o domínio bactéria fD1 (*Forward*) e rD1 (*Reverse*). A população de bactérias heterotróficas foi mais representativa quando comparada às de autotróficas e víbrios, e o experimento Het atingiu a maior média ($1,91 \times 10^7$ UFC/mL). As menores cargas de víbrios foram encontradas nos tanques experimentais HP1 e HP2 com médias de $2,46 \times 10^4$ e $2,00 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente. De 64 cepas isoladas, 11 possuíram índices enzimáticos satisfatórios ($IE \geq 2,0$) para a produção de protease e amilase. Os amplicons após sequenciamento do DNA apresentaram tamanho maior que 1,4Kb e homologia com o *GenBank* e RDP, identificando bactérias como *Bacillus subtilis* e *Shewanella algae*. O incremento da população heterotrófica está relacionado à adição de melaço como fonte de carbono no sistema de cultivo e nos experimentos com os probióticos comerciais, a carga vibrionácea foi reduzida. A técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando os primers fD1 e rD1 foi eficiente na caracterização bacteriana a nível de espécie e até subespécie, revelando a presença de bactérias com potencial para utilização como probiótico.

1. Introdução

Conhecido popularmente como camarão branco do Pacífico, o *Litopenaeus vannamei* é tido como espécie alvo da carcinicultura brasileira devido ao seu elevado grau de rusticidade (possui

fácil adaptação a variações de temperatura e salinidade), rentabilidade, crescimento regular, conversão alimentar e grande aceitação internacional (ANDREATTA e BELTRAME, 2004).

Nos sistemas heterotróficos, onde o incremento das populações de microrganismos é feito através de fertilização orgânica aliada à inorgânica, o estudo das bactérias reveste-se de grande importância para o entendimento da dinâmica de mineralização dos compostos orgânicos que liberam os nutrientes para estimular a produção primária e consequente aumento do alimento natural. A maior disponibilidade de alimento natural traduzida pelas altas concentrações de bioflocos permite a obtenção de maiores produtividades por área cultivada com menor consumo de rações comerciais, elevando assim, a lucratividade dos empreendimentos dedicados à carcinicultura (ARANTES, 2007). Porém, o aparecimento de doenças tem causado prejuízos econômicos incalculáveis ao setor produtivo, principalmente em cultivos com alta densidade populacional, o que remete a maiores investimentos em pesquisas que busquem práticas cada vez mais efetivas e ambientalmente seguras (BARRACO, 2004).

O uso de probióticos na aquicultura muitas vezes é feito de forma inadequada ou sem a comprovação de sua eficácia, gerando descrédito entre muitos aquicultores (MOURIÑO et al., 2010). Probióticos têm sido definidos como suplementos microbianos dietários que beneficiam o hospedeiro através da melhoria no valor dietético, na inibição de microrganismos patogênicos, atividade antimutagênica e anticarcinogênica, estimulação de fatores de crescimento, aumento da resposta imune e na contribuição da digestão enzimática (FULLER, 1989; VERSCHUERE et al., 2000). As enzimas exógenas produzidas pelos probióticos possuem uma pequena contribuição na atividade enzimática total no sistema digestivo do hospedeiro, e a presença destes microrganismos pode estimular a produção de enzimas endógenas pelo camarão. Entretanto, a influência das enzimas exógenas na digestão dos camarões necessita de mais estudos devido à ampla diversidade microbiológica nesses cultivos (ZIAEI-NEJAD et al., 2006).

Sabendo que a avaliação do potencial digestivo de cepas bacterianas em um hospedeiro representa uma informação valiosa para a seleção de microrganismos que produzam enzimas, o estudo teve por objetivo avaliar as atividades proteolíticas e amilolíticas de cepas isoladas do hepatopâncreas e estômago do animal para futuros testes como probiótico no cultivo de camarões, além de sua identificação através do uso da sequência de nucleotídeos do gene que codifica o 16S rRNA, estabelecido como método padrão de análise bacteriana.

2. Material e Métodos

O cultivo dos camarões foi realizado na Estação de Aquicultura (Base de Piscicultura) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em 2010, e as análises desta pesquisa, no

71 Laboratório de Enzimologia (LABENZ) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal
72 de Pernambuco (UFPE) e nos Laboratórios de Biologia do Solo e de Genoma do Instituto
73 Agrônômico de Pernambuco (IPA).

74 Pós-larvas de *L. vannamei* foram submetidas a quatro tratamentos de cultivo com três
75 repetições cada por um período de 90 dias, sendo dois tratamentos experimentais em sistema
76 heterotrófico com o uso de dois probióticos comerciais HP1 e HP2 e dois controles: um em sistema
77 autotrófico (Aut) e outro em heterotrófico (Het) sem uso de probiótico. Em tanques heterotróficos
78 foi realizada uma fertilização orgânica utilizando melaço como fonte de carbono para promover o
79 aumento bacteriano.

80

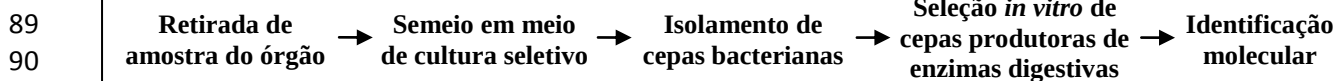
81 2.1. Coleta de amostras de água e de camarões

82

83 Amostras de água com bioflocos (agregados microbianos) para quantificação bacteriana e
84 amostras de camarão (n=3) para estudos bioquímico e molecular foram tomadas ao final do
85 experimento. As cepas bacterianas obtidas através do hepatopâncreas e estômago dos animais
86 passaram por algumas etapas de acordo com a Figura 1, a dizer:

87

88



92 Figura 1: Fluxograma das etapas para seleção de cepas isoladas do *L. vannamei*.

93

94 2.2. Quantificação de bactérias

95

96 Para cada amostra de cada tanque experimental, 1 mL de água foi diluído em 9 mL de
97 solução salina estéril (NaCl 0,85%). Após homogeneização, foram realizadas diluições sucessivas
98 semeando 1 mL de amostra em profundidade para o meio específico de bactérias quimioautotróficas
99 (0,5g (NH₄)₂SO₄, 0,5g NaHCO₃, 13,5g Na₂HPO₄ ou K₂HPO₄, 0,1g MgSO₄.7H₂O, 0,014g
100 FeCl₃.6H₂O, 0,18g CaCl₂.2H₂O, 15g ágar e 1L de água destilada) e 30 µL na superfície dos meios
101 AM (ágar marinho para crescimento de bactérias heterotróficas) e TCBS (ágar de tiosulfato,
102 citrato, bile e sacarose para crescimento de víbrios) por plaqueamento (HERIGSTAD et al., 2001).
103 As placas foram incubadas a 30°C por 24h para posterior contagem do número de unidades
104 formadoras de colônia (UFC) utilizando o contador de colônias. As análises foram realizadas em
105 triplicata.

106 Após a obtenção das contagens, os dados foram submetidos à análise de variância
107 (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

108 **2.3. Obtenção das cepas bacterianas**

109

110 Bactérias foram isoladas do hepatopâncreas e do estômago do camarão. Para tanto, os
111 animais foram sacrificados em banho de gelo para serem desinfestados seguindo uma sequência de
112 etapas, a dizer: imersão em álcool 70% por 15 segundos, permitindo que o excesso de álcool
113 evaporasse; imersão por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) com 0,1% de tween-
114 80; e enxague por três vezes em água destilada esterilizada. Para a retirada dos órgãos de interesse
115 foi realizada a decapitação do cefalotórax, expondo o hepatopâncreas e o estômago. Em seguida,
116 efetuou-se o corte com o bisturi para a retirada do material com a ponteira, depositando-o em placas
117 contendo os meios AM e TCBS e incubando a 30°C por 24 h em estufa bacteriológica.

118 Após incubação, foi realizada a retirada com alça de platina de todo o material crescido nas
119 placas para ser submetido à etapa das diluições sucessivas. A partir da diluição 10^{-1} foram
120 escolhidas as placas com maior diversidade morfológica de colônias. Estas foram para isoladas e
121 estocadas em tubos de penicilina contendo os meios AM (para bactérias retiradas do meio AM) e
122 TSA (ágar triptona de soja, para bactérias isoladas do meio TCBS). A denominação das cepas
123 seguiu a ordem crescente em que foram isoladas.

124

125 **2.4. Avaliação das atividades enzimáticas das cepas bacterianas**

126

127 **2.4.1. Avaliação da atividade proteolítica**

128

129 A avaliação da atividade proteolítica foi realizada segundo Price e colaboradores (1982)
130 usando leite desnatado como substrato e Ágar Bacteriológico na proporção de 1:1 (v/v). Em
131 seguida, as cepas foram inoculadas (em triplicata) em placas de Petri estéreis e incubadas a 37°C
132 por 72h. A indicação de atividade foi observada por um halo transparente ao redor da colônia.

133

134 **2.4.2. Avaliação da atividade amilolítica**

135

136 A excreção de amilase extracelular foi avaliada utilizando Agar Amido-Caseína
137 (HIMEDIA). As bactérias (em triplicata) foram incubadas em placas de Petri a 37°C por 96h. Após
138 este período, 1 mL de tintura de iodo foi adicionado e a formação de uma zona amarelada ao redor
139 da colônia, em contraste ao meio azulado, indicou a atividade amilolítica (BUZZINI e MARTINI,
140 2002).

141

2.4.3. Determinação do Índice Enzimático (IE)

A atividade hidrolítica das bactérias foi estimada semiquantitativamente usando-se o IE que expressa a relação do diâmetro do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (RAO et al., 1998).

2.5. Coloração de Gram

A técnica com coloração de Gram foi realizada para bactérias crescidas em meio específico (AM ou TCBS) com incubação em estufa bacteriológica por 24h a 30 °C. Após crescimento, foram preparadas lâminas com esfregaços bacterianos de cada cepa isolada e estas foram submetidas aos seguintes reagentes para avaliação do perfil de coloração: cristal violeta (corante primário), iodo-lugol (mordente), etanol (agente descolorante) e safranina (contrastante). As Gram-negativas garantiram uma cor rósea ou avermelhada e as Gram-positivas, púrpura (TORTORA, 2010). Esta definição foi necessária para a etapa posterior de extração de DNA cujo protocolo do kit utilizado se diferencia em um momento para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.6. Identificação por técnicas moleculares

Cepas com potencial enzimático foram caracterizadas através de uma série de análises, a dizer: extração de DNA, quantificação dos DNAs em gel de agarose, amplificação em termociclador utilizando os primers fD1 e rD1, sequenciamento do 16S rRNA e análises filogenéticas. Como testemunha, uma cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foi cedida pelo Departamento de Antibióticos da UFPE.

2.6.1. Extração e purificação do DNA

As cepas foram semeadas em meios sólidos específicos (AM ou TCBS) e incubadas a 30°C por 24h. O DNA foi obtido através de kit de extração de DNA bacteriano (Biosystems) recomendado para o isolamento rápido de até 20µg de DNA a partir de 1 mL de amostra bacteriana ($\approx 10 \times 10^9$ colônias). De acordo com o protocolo, após a lise, a separação do DNA genômico na fase mais baixa é realizada através da ligação seletiva a uma coluna especial para posterior purificação e dessanilização. A extração se faz de forma rápida por centrifugação e sem precipitação por álcool.

O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (diluição de 1:50 e absorbâncias em 260 nm e 280 nm) e pureza na qual a relação OD_{260}/OD_{280} deve-se ser superior a 1,8. Após

177 quantificação, o DNA de cada cepa isolada foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em
178 tampão TBE 1X pH 8,0, a 76V durante 1 h, com marcador de massa molecular conhecida (*Low*
179 *DNA mass Ladder* InvitrogenTM), corado com Syber Gold (InvitrogenTM), visualizado em luz
180 ultravioleta e fotodocumentado (Loccus L-PIX HE).

181

182 **2.6.2. Amplificação do gene 16S rRNA**

183

184 Para amplificação do gene foram utilizados os inicializadores universais para o domínio
185 bactéria fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3')
186 segundo Weisburg e colaboradores (1991), correspondendo às posições 8 a 27 e 1524 a 1540 do
187 gene 16S rRNA em *Escherichia coli*, respectivamente. As reações foram realizadas para um volume
188 de 25µL, nas seguintes condições: 1x tampão PCR 10x, MgCl₂ (2,6 mM), dNTP (0,5 mM), 1 µM
189 de cada *primer*, *Taq* DNA polimerase (2,5 U/µL InvitrogenTM), DNA (20 ng/µL) e o volume final
190 de 25 µL.

191 A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 94°C por 3
192 minutos; 30 ciclos de 50 segundos a 92°C, 50 segundos a 62,3°C e 1 minuto e 45 segundos a 72°C;
193 seguida de extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação da PCR foram
194 visualizados e quantificados em gel de agarose 1,2% (p/v) com o marcador de massa “100pb DNA
195 Ladder” (InvitrogenTM) e purificados segundo Lyra (2001).

196

197 **2.6.3. Sequenciamento e análise dos fragmentos de DNA**

198

199 Para o sequenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA com os primers
200 fD1 (*Forward*) e rD1 (*Reverse*), os produtos purificados de PCR de cada bactéria foram
201 determinados pela empresa ACTGene Análises Moleculares localizada no Campus do Vale da
202 UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

203 As sequências obtidas foram comparadas no banco de dados *Genbank*, *National Center for*
204 *Biotechnology Information* (NCBI) disponível online no *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
205 através do programa BLASTn (ALTSCHUL, 1997). Adicionalmente, os *contigs* foram analisados
206 pelo programa *Seqmath* disponível no *website* <http://rdp.cme.msu.edu/> do RDP (Ribossomal Data
207 Base Project). Análises das sequências de aminoácidos deduzidas do gene 16S rRNA com os de
208 outros microrganismos foram realizadas pelos programas MEGA5 (TAMURA et al., 2011)
209 utilizando a matrix ClustalW 1.6 (THOMPSON et al., 1994). Com o auxílio do programa
210 CodonCode Aligner foi avaliada a qualidade das sequências através de seus respectivos
211 eletroforetogramas e criação de sequências consenso entre os fragmentos sequenciados. As

sequências foram avaliadas pelo programa PHRED (Quality Base Calling), também presente no aplicativo CodonCode Aligner que, por sua vez, avalia a probabilidade de erro no sequenciamento, apresentando probabilidade de 1/1000 com PHRED igual a 30. Para a criação do banco de dados das cepas sequenciadas foi utilizado o programa OligoCalculator disponível no *website* <http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>. Através deste foram obtidas informações sobre tamanho do fragmento do DNA de cada cepa bacteriana, peso molecular, conteúdo de guanina (G) e citosina (C), e temperatura de fusão (*Melting Temperature*) em °C.

219

220 3. Resultados e Discussão

221

222 3.1. Quantificação de bactérias no cultivo

223

224 As médias de contagem de bactérias nos tanques de cultivo estão presentes na tabela 1. As
225 concentrações bacterianas variaram de 10^7 (heterotróficas) a 10^4 (autotróficas e víbrios) (tab. 1).

226

227 Tabela 1: Média de população de bactérias heterotróficas, autotróficas e víbrios nos diferentes
228 tratamentos.

TRAT.	HETEROTRÓFICAS ¹ (UFC/mL)	AUTOTRÓFICAS ¹ (UFC/mL)	VÍBRIOS ¹ (UFC/mL)
Aut	$3,27 \times 10^6 \pm 2,54 \times 10^6$ B	$3,67 \times 10^4 \pm 2,91 \times 10^4$ C	$6,33 \times 10^4 \pm 0,84 \times 10^4$ A
Het	$1,91 \times 10^7 \pm 1,26 \times 10^7$ A	$4,96 \times 10^5 \pm 4,27 \times 10^5$ A	$2,69 \times 10^4 \pm 0,99 \times 10^4$ B
HP1	$1,43 \times 10^6 \pm 0,74 \times 10^6$ B	$2,18 \times 10^5 \pm 1,57 \times 10^5$ B	$2,46 \times 10^4 \pm 1,17 \times 10^4$ B
HP2	$2,92 \times 10^5 \pm 0,56 \times 10^5$ C	$3,84 \times 10^4 \pm 1,75 \times 10^4$ C	$2,00 \times 10^4 \pm 0,98 \times 10^4$ B
CV (%)	8,53	12,06	10,80

229 ¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

230 *CV = coeficiente de variação

231

232 Devido à fertilização orgânica aplicada com a adição de melaço como fonte de carbono, a
233 média de população de bactérias heterotróficas foi maior em todos os tratamentos heterotróficos
234 quando comparada às populações autotróficas (tab 1).

235 O experimento heterotrófico controle (Het) apresentou uma maior concentração de bactérias
236 heterotróficas ($1,91 \times 10^7 \pm 1,26 \times 10^7$ UFC/mL), o que sugere que a utilização dos probióticos
237 comerciais testados não está relacionada ao aumento populacional heterotrófico (tab 1). O
238 incremento dessa população heterotrófica está relacionado à adição de melaço no sistema de
239 cultivo.

240 Em relação ao tratamento conduzido em condições autotróficas (Aut), a população
241 heterotrófica não se diferiu significativamente quando em comparação ao tratamento experimental

heterotrófico com probiótico comercial 1 (HP1) (tab 1) e a população de vibrios foi maior ($6,33 \times 10^4 \pm 0,84 \times 10^4$).

Nos experimentos HP1 e HP2 as concentrações de vibrios foram menores, o que pode sugerir que esses probióticos estejam relacionados à redução da carga desse tipo de bactéria que são vistos na aquicultura como possíveis causadores de mortalidade em cultivos (tab 1).

Burford e colaboradores (2003) obtiveram um total de $5,42 \times 10^7 (\pm 1,78)$ bactérias/mL, onde cerca de 40% destas estavam associadas aos bioflocos bacterianos. Em outro estudo realizado em 2004, os mesmos autores obtiveram um máximo de $5,06 \times 10^7$ bactérias/mL com 27-51% associadas aos bioflocos. Arantes (2007) quantificou em sistema heterotrófico uma população heterotrófica de $1,7 \times 10^7$ UFC/mL e outra de vibrios de $6,1 \times 10^6$ UFC/mL, e outro estudo realizado pela rede RECARCINE chegou a uma concentração de $2,23 \times 10^7$ UFC/mL e $4,37 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente.

3.2. Testes enzimáticos e coloração de Gram das cepas bacterianas

Os resultados das atividades testadas para as cepas bacterianas selecionadas das placas com maior diversidade microbiana estão apresentados na Tabela 2.

De um total de 64 cepas bacterianas isoladas do hepatopâncreas e estômago do camarão, 17 ($\approx 26,6\%$) foram positivas para as atividades testadas (tab 2).

Tabela 2: Atividades semiquantitativas de protease e amilase produzidas pelas cepas.

Cepa	Protease			Amilase		
	DC ¹ (mm)	DH ² (mm)	IE	DC ¹ (mm)	DH ² (mm)	IE
13	28,0	41,3	1,5	16,0	32,7	2,0
14	26,0	41,3	1,6	8,3	25,6	3,1
17	1,5	3,5	2,3	-	-	-
24	27,3	39,3	1,4	5,7	19,7	3,5
34	4,5	7,0	1,6	-	-	-
51	18,7	32,0	1,7	-	-	-
54	17,3	29,9	1,7	-	-	-
55	-	-	-	3,0	9,0	3,0
56	26,7	42,7	1,6	5,7	20,4	3,6
58	18,7	34,0	1,8	4,7	22,7	4,8
252	5,0	11,0	2,2	-	-	-
264	5,3	9,9	1,9	-	-	-
272	-	-	-	1,5	11,5	7,7
273	3,0	5,0	1,7	-	-	-
275	3,5	9,0	2,6	-	-	-
276	4,0	7,7	1,9	-	-	-
277	4,8	10,8	2,3	-	-	-

¹ Diâmetro da Colônia; ² Diâmetro do Halo de degradação; (-) ausência de formação de halo.

O Índice Enzimático (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais utilizado para avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido, pois o processo de

seleção de microrganismos considerados como produtores de enzimas inclui a correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2006). Esses autores recomendam um $IE \geq 2,0$ para considerar um microrganismo como produtor de enzimas em meio sólido e, sendo assim, apenas quatro microrganismos são produtores de enzimas para a atividade de protease (cepas 17, 252, 275 e 277) e todos os positivos para a atividade de amilase testada possuem índices enzimáticos satisfatórios para a produção desta enzima (cepas 13, 14, 24, 55, 56, 58 e 272) (tab2).

Estas 11 cepas bacterianas foram submetidas ao teste de coloração de Gram como visto na Tabela 3. Informações acerca do meio em que foram isoladas e tratamento em que as amostras de camarão foram coletadas também estão contidas na mesma (tab 3).

Tabela 3: Resultados de coloração de Gram e informações adicionais das bactérias isoladas.

Cepa	Gram	Meio	Tratamento
13	Positiva	TCBS	HP1
14	Positiva	TCBS	HP1
17	Negativa	TCBS	HP1
24	Positiva	TCBS	AUT
55	Negativa	AM	AUT
56	Positiva	AM	AUT
58	Negativa	AM	AUT
252	Negativa	TCBS	HET
272	Positiva	AM	HET
275	Positiva	AM	HET
277	Negativa	AM	HET

De acordo com os resultados, as cepas 13, 14, 24, 56 e 275 foram classificadas como Gram-positivas. As demais foram identificadas como Gram-negativas, o que significa dizer que estas últimas bactérias apresentam peptidoglicano em sua parede celular e o protocolo de extração foi diferenciado em uma das etapas.

O teste de Gram é um pré-requisito tanto para técnicas moleculares quanto para provas bioquímicas de identificação bacteriana. A importância desta coloração para a classificação molecular é devida à mudança no procedimento de lise da parede celular para exposição do material genético (DNA); para os testes bioquímicos, esta informação norteará a escolha do kit bioquímico a ser utilizado.

O isolamento de bactérias do sistema digestivo do animal de interesse é o primeiro passo para se obter sucesso no desenvolvimento do probiótico (BALCÁZAR et al., 2006). Por não se conhecer as cepas isoladas, há a necessidade de realizar diversos testes de seleção *in vitro*, como: inibição de patógenos, produção de enzimas digestivas, tolerância a sais biliares e variações de pH e salinidade, produção de substâncias antimicrobianas, velocidade de crescimento e capacidade de adesão do epitélio intestinal (VINE et al., 2004). Vale ressaltar que as bactérias selecionadas no

296 ambiente de cultivo muitas vezes não conseguem repetir os resultados *in vitro*, seja por não se
297 adaptar ao meio ou pela ineficiência ao competir com os microrganismos ali presentes (MOURIÑO
298 et. al., 2010).

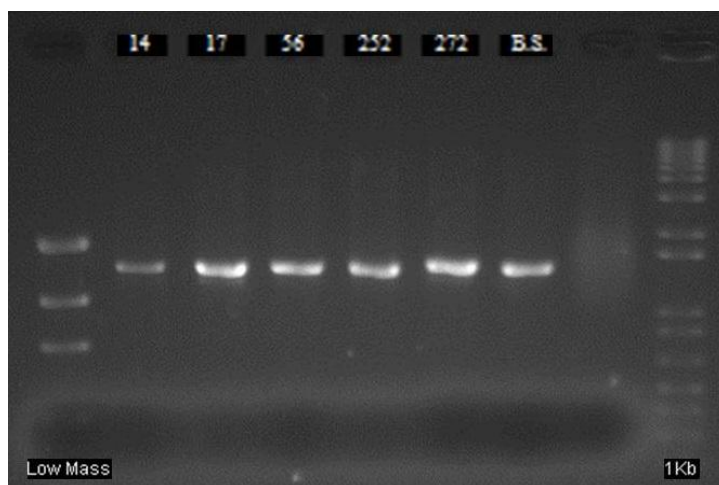
299

300 3.3. Caracterização molecular

301

302 A qualidade do DNA genômico isolado foi avaliada por meio de eletroforese em gel de
303 agarose utilizando o marcador Low Mass Ladder (Invitrogen™) como padrão de peso molecular. O
304 aparecimento de uma única banda íntegra de alto peso molecular indicou que o processo de
305 extração do DNA foi bem sucedido, porém o aparecimento de impurezas (proteínas, lipídeos, outro
306 ácido nucléico, reagentes de extração, etc.) no gel é apontado como um fator negativo da extração e
307 normalmente se faz necessária a repetição do processo. Após avaliação da qualidade da extração,
308 foram selecionadas 5 cepas bacterianas para sequenciamento além da cepa de *B. subtilis* (B.S.).
309 Todas as amostras apresentaram bom desempenho na amplificação com os primers fD1 e rD1 como
310 pode ser visualizado na Figura 2.

311



312

313

314

315

Figura 2: Padrão de amplificação do gene 16S rRNA utilizando os primers fD1 e rD1. Marcador Low Mass DNA Ladder e 1Kb.

316 Os amplicons apresentaram tamanho $\geq 1,4\text{Kb}$ (fig. 2) e o protocolo de purificação mostrou-se
317 eficiente na eliminação de bandas inespecíficas e eliminação de resíduos da PCR.

318 As cepas foram sequenciadas com os *primers* fD1 (*Forward*) e rD1 (*Reverse*), num total de
319 10 fragmentos parciais do gene 16S rRNA. Os isolados 14 e 17 não foram sequenciados,
320 provavelmente devido a algum erro nos procedimentos. O sequenciamento apresentou-se de alta
321 qualidade e foram blastados apenas fragmentos com PHRED ≥ 30 . Com o fD1 foram obtidos
322 valores PHRED iguais a 725, 689, 610 e 704 para as cepas 56, 252, 272 e B.S., respectivamente.
323 Para a mesma ordem dos fragmentos das cepas bacterianas, os valores PHRED foram 724, 739, 325

324 e 735 com o primer rD1. Ou seja, as médias PHRED foram 682 e 631 para os primers fD1 e rD1,
325 respectivamente, sugerindo boa qualidade das sequências.

326 Com os tratamentos dos *contigs* foi possível obter informações sobre tamanho do fragmento
327 de DNA (em pares de base), peso molecular (PM), conteúdo de guanina e citosina (G/C) e
328 temperatura de fusão de equilíbrio (MT), apresentadas na Tabela 4.

329

330

Tabela 4: Análise das sequências pelo programa OligoCalculator.

Cepas	Tamanho (pb)	PM (g/M)	G/C (%)	MT (°C)
56	1479	459736.3	55	87.1
252	1480	460104.7	54	86.7
272	1471	456996.6	54	86.6
B.S.	1471	457073.6	55	86.9

331

332 Parâmetros como conteúdo G/C, tamanho dos fragmentos, temperatura de fusão e peso
333 molecular são úteis para a criação de um banco de dados referente aos isolados analisados no
334 cultivo de *L. vannamei*. Jeremy e Dale (2004) comentam a importância da avaliação do conteúdo
335 G/C na caracterização de bactérias e taxonomia. Por exemplo, apesar de bastante semelhantes
336 morfologicamente sendo cocos Gram-positivos, os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*
337 apresentam constituição genética distinta, contendo, respectivamente, 70% e 30% de conteúdo G/C.
338 Segundo os dados obtidos não foi encontrada grande divergência quanto ao conteúdo G/C, variando
339 entre 54 e 55% para os fragmentos avaliados (tab. 4). Observou-se também pouca variação na
340 temperatura de fusão de equilíbrio, apresentando variação de 86,6 a 87,1 °C, uma vez que a
341 porcentagem de G/C interfere diretamente temperatura, assim como o tamanho dos fragmentos
342 relaciona-se diretamente com o peso molecular. A estimativa em gel de agarose do peso molecular e
343 consequente tamanho da sequência confere com os resultados apresentados na tabela com variação
344 de 1,47Kb a 1,48Kb (tab. 4).

345 Com o programa BLASTn realizou-se uma pesquisa para comparação com o banco de dados
346 genômicos. Todos os *contigs* apresentaram homologia com o *GenBank* e cada isolado foi
347 relacionado a uma espécie de acordo com o menor valor E (E-value) e a maior similaridade de
348 acordo com a Tabela 5.

349

350

351

Tabela 5: Identificação mais provável das sequências comparadas ao *GenBank* (NCBI-BLASTn).

Cepa	Identificação	Score	Valor E	Identidade (%)	Acesso <i>GenBank</i>
56	<i>Bacillus subtilis</i>	1400	0.0	99	AY905693
252	<i>Shewanella</i> sp. não cultivável	1474	0.0	99	X81622
272	<i>Bacillus</i> sp. não cultivável	695	0.0	83	JQ793585
B.S.	<i>Bacillus subtilis</i>	1335	0.0	99	JX515570

352 As cepas apresentaram similaridade igual a 99%, excetuando-se a 272 que apresentou 83%
353 de similaridade com as sequências presentes no *GenBank* para uma bactéria não cultivável de
354 *Bacillus sp* (tab. 5). Apesar disto, apresentou valor E igual a zero e score maior que 120,
355 representando significância na identificação de pelo menos o gênero (tab. 5). Os resultados apontam
356 espécie como *Bacillus subtilis* (cepa 56) e cepa de *Shewanella sp.* não cultivável (252) (tab. 5).
357 Quanto maior o score, melhor a porcentagem de identidade das cepas às sequências depositadas no
358 *GenBank*. Segundo López et al. (2006), a identificação das bactérias em nível de espécie pode ser
359 inferida quando a sequência do fragmento, comparada às outras sequências de 16S rDNA,
360 apresentar valores acima de 97% de similaridade.

361 De acordo com o banco de dados ribossomais (RDP), as cepas bacterianas foram
362 identificadas através do programa online *Seqmath* como pode ser visualizado na Tabela 6. Este
363 classificador utiliza um limite de confiança de 80%.

364

365 Tabela 6: Identificação mais provável das sequências comparadas ao
366 RDP (*Seqmath*) e número de acesso no banco de dados ribossomais.

Cepa	Identificação	Acesso	Score (S_ab)
56	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	AY905693	0.960
252	<i>Shewanella algae</i>	X81622	0.950
272	Bactéria glacial	AF479330	0.891
B.S.	<i>Bacillus subtilis</i>	AJ276351	0.978

367

368 Através do RDP-*Seqmath* os isolados 56 e 252 foram classificados em nível de sub-espécie
369 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis*) e espécie (*Shewanella algae*), respectivamente, atingindo scores
370 bastante confiáveis. Em contrapartida, a cepa 272 foi classificada somente como uma bactéria de
371 ambientes de temperatura bastante baixa.

372 O sequenciamento foi adequado para a identificação da maioria dos isolados, porém, grande
373 parte das bactérias presentes em amostras ambientais não são cultiváveis ou são de difícil cultivo
374 (RONDON et al., 1999), o que explica o grande número de espécies desconhecidas encontradas
375 após sequenciamento. No que se refere à identificação dos isolados, Val-Moraes e colaboradores
376 (2009) comentam a alta frequência de bactérias não similares a acessos do *GenBank*, girando em
377 torno de 50%, além de bactérias homólogas a “*environmemtal samples*” não homólogas a nenhum
378 filo bacteriano específico, resultado compatível às análises realizadas. Segundo Wang e
379 colaboradores (2007), erros devido ao sequenciamento completo do gene 16S rRNA podem ocorrer
380 devido a incongruências taxonômicas já existentes.

381 Devido à capacidade de crescer e sobreviver no ambiente e no intestino de animais, o gênero
382 *Bacillus* comprova a base do seu efeito probiótico (HONG et al., 2005) e ainda não foram
383 encontrados relatos que descrevam este gênero como patogênico para camarões *Litopenaeus*

384 *vannamei*. Ochoa Solano e Olmos-Soto (2006) isolaram cepas de *Bacillus sp.* e encontraram uma
385 potencial aplicação tanto para fermentação de alimento como cepas probióticas, aumentando a
386 digestibilidade do camarão. Muitos probióticos comerciais utilizam além de outras espécies
387 bacterianas, a espécie *Bacillus subtilis* na sua composição por serem facilmente produzidas em
388 escala comercial.

389 Proteobactérias foram identificadas por Li e colaboradores (2007) com frequência de 24,6%,
390 sendo pertencentes aos gêneros *Shewanella sp.*, *Pantoea sp.*, *Aranicola sp.*, *Pseudomonas sp.* e
391 *Vibrio sp.* A importância desse grupo bacteriano está no processo de nitrificação com a oxidação da
392 amônia a nitrato via nitrito, seguido da desnitrificação com a redução do nitrato a nitrogênio gasoso,
393 melhorando a qualidade da água (OLIVEIRA et al., 2006; BOTHE et al., 2000). Estudos realizados
394 por Shakibazadeh e colaboradores (2008) apontam *S. algae* como razoável resposta antimicrobiana
395 em ampla gama de temperatura e PH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*. O uso de
396 probióticos é importante ferramenta de gestão, mas sua eficiência depende da compreensão da
397 natureza da concorrência entre espécies ou variedades (BALCÁZAR et al., 2006).

398

399 5. Conclusões

400

401 A biota heterotrófica dominante encontrada nos viveiros de cultivo do *L. vannamei* está
402 relacionada à condução do experimento a favor do aumento da população deste tipo bacteriano com
403 a introdução de melaço como fonte de carbono nos tanques experimentais. As concentrações de
404 víbrios nos tratamentos conduzidos com os dois probióticos comerciais foram menores, sugerindo
405 que as bactérias probióticas introduzidas no cultivo atuaram como biocontroladoras por reduzir a
406 carga bacteriana desse tipo de bactéria que são vistas na aquicultura como possíveis causadoras de
407 mortalidade em cultivos.

408 A técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA foi eficiente na caracterização de três cepas
409 produtoras de enzimas protease e amilase presentes no hepatopâncreas e estômago do camarão e
410 revelou a presença da espécie *Shewanella algae* e *Bacillus subtilis*, bactérias com potencial para
411 utilização como probióticos.

412

413 6. Bibliografia

414

415 Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J.
416 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic
417 Acids Research, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

418 Andreatta, E. R.; Beltrame, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.;
 419 ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. Aquicultura – Experiências Brasileiras. Florianópolis:
 420 Multitarefa, p. 200-207, 2004.
 421
 422 Arantes, R. F. O efeito da relação carbono-nitrogênio sobre a comunidade microbiana no cultivo
 423 super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação. Dissertação de Mestrado, Florianópolis:
 424 UFSC, 2007. 39p.
 425
 426 Balcázar, J. L.; Blas, Y.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D.; Múrquiz, J. L. The role
 427 of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, v. 114, p. 173-186, 2006.
 428
 429 Barraco, M. A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: Ranzani-Paiva, M. J. T.;
 430 Takemoto, R. M.; Lizama, M. (Eds). *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Editora Varela, p. 49-72,
 431 2004.
 432
 433 Bothe, H.; Jost, G.; Schlöter, M.; Ward, B. B.; Witzel, K. Molecular analysis of ammonia oxidation
 434 and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Review*, v. 24, p. 673-690, 2000.
 435
 436 Burford, M. A.; Thompson, P. J.; McIntosh, R. P.; Bauman, R. H.; Pearson, D. C. Nutrient and
 437 microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, v. 219,
 438 p. 393-411, 2003.
 439
 440 Burford, M. A.; Thompson, P. J.; McIntosh, R. P.; Bauman, R. H.; Pearson, D. C. The contribution
 441 of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-
 442 exchange system. *Aquaculture*, v. 232, p. 525–537, 2004.
 443
 444 Buzzini, P.; Martini, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains
 445 isolated from tropical environments. *J. Appl. Microbiol.*, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.
 446
 447 Fuller, R. Probiotic in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 66, p. 365–378, 1989.
 448
 449 Herigstad, B.; Hamilton, M.; Heersink, J. How to optimize the drop plate method for enumerating
 450 bacteria. *J. Microbiol Methods*, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.
 451

452 Hong, A. H.; Duc, H. L.; Cutting, M. S. The use of spore formers as probiotics. FEMS
 453 Microbiology Reviews, v. 29, p. 813-835, 2005.

454

455 Jeremy, W.; Dale, P. S. Molecular genetics of bacteria. 4.ed. University of Surrey, p. 264-268,
 456 2004.

457

458 Li, K.; Zheng, T. L.; Tian, Y.; Yuan, J. J. Bacterial community structure in intestine of the white
 459 shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Wei Sheng Wu Xue Bao, v. 47, n. 4, p. 649-653, 2007.

460

461 López, M. A.; Serna, F. J. Z. D.; Jan-Roblero, J.; Romero, J. M.; Hernández- Rodríguez, C.
 462 Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico.
 463 FEMS Microbiology Ecology, Oxford, v. 58, p. 145-154, 2006.

464

465 Lyra, M. C. C. P. Estudos genéticos y fisiológicos Del gen *nolT* de La región específica de cultivar,
 466 *nolxwbtuv*, de La bacteria de amplio rango de nodulación hh103 y SUS implicaciones em El
 467 sistema de secreción de tipo III (TTSS). 2001. Tese de Doutorado, Universidad de Sevilla, Sevilla,
 468 2001.

469

470 Mouriño, J. L. P.; Jatobá, A.; Silva, B. C.; Vieira, F. N. Utilização de probióticos na aquicultura.
 471 Panorama da Aquicultura, v. 20, p. 52-59, 2010.

472

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

475

476 Oliveira, S. S.; Wasielesky, W.; Ballester, E. L. C.; Abreu, P. C. Caracterização da assembléia de
 477 bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization" (FISH) no biofilme e água de
 478 larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. Atlântica, Rio Grande, v. 28, n. 1, p. 33-
 479 45, 2006.

480

481 Price, M. F; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. Plate methods for detection of phospholipase activity in
 482 *Candida albicans*. Sabouraudia, v. 20, p 7-14, 1982.

483

484 Rao, M. B.; Tanksale, A. M; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological
 485 Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Reviews, v. 62, n. 3, p. 596-635, 1998.

486

487 Rondon, M. R.; Goodman, R. M.; Haldesman, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil
 488 microbial diversity. Trends in Biotechnology, London, v. 17, p. 403-409, 1999.

489

490 Shakibazadeh, S; Saad, C. R.; Christianus, A.; Kamarudin, M. S.; Sijam, K.; Shamsudin, M. N.;
 491 Neela, V. K. Evaluation of *in vitro* *Vibrio* static activity of *Shewanella algae* isolated from healthy
 492 *Penaeus monodon*. African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 21, p. 3952-3961, 2008.

493

494 Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular
 495 Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and
 496 Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol., v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

497

498 Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive
 499 multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific-gap penalties and weigh
 500 matrix choice. Nucleic Acids Research, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

501

502 Tortora, G. J. Microbiology: an introduction. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 10th
 503 ed., p. 87, 2010.

504

505 Val-Moraes, S. P.; Valarini, M. J.; Ghini, R.; Lemos, E. G. M.; Carareto-Alves, L. M. Diversidade
 506 de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. Revista Ciência Agronômica, v.
 507 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

508

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

511

512 Vine, N. G.; Leukes, W. D.; Kaiser, H. In vitro growth characteristics of fish candidate aquaculture
 513 probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters, v.
 514 231, p. 145-152, 2004.

515

516 Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid
 517 Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Applied Environmental
 518 Microbiology, v. 7, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

519

520 Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lupski, J. R. 16S ribosomal DNA amplification for
 521 phylogenetic study. Journal of Bacteriology, v. 173, p. 697-703, 1991.

522 Ziaei-Nejad, S.; Rezaei, M. H.; Takami, G. A.; Lovett, D. L.; Mirvaghefi, A. R.; Shakouri, M. The
523 effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth
524 in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, v. 252, p. 516–524, 2006.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema heterotrófico proporcionou uma relevante biota bacteriana heterotrófica nitrificante, o que remete a uma maior absorção de amônia e, assim, uma melhoria na qualidade da água nos tanques experimentais.

Bactérias com atividades enzimáticas extracelulares como candidatas à probióticos são vistas no cenário da aquicultura como promissoras no aumento de padrões zootécnicos devido ao auxílio na digestão dos alimentos no sistema digestivo dos animais cultivados, trazendo benefícios aos produtores. Das 17 cepas positivas para as atividades proteolítica e amilolítica, 11 apresentaram índice enzimático satisfatório e somente 3 foram identificadas. O gênero *Bacillus* já é extensivamente utilizado como probiótico na aquicultura, porém poucos estudos se reportam ao gênero *Shewanella* para esta finalidade. Outros testes serão realizados com a cepa *Shewanella algae* encontrada no sistema digestivo do camarão para futuros testes em bioensaios de larvicultura.

Vale salientar que a definição de uma metodologia eficiente através de técnicas moleculares, já que há uma grande dificuldade na identificação das bactérias por técnicas convencionalmente utilizadas para chegar ao nível de espécie, é tido como o foco do trabalho e bons resultados têm sido alcançados apesar da grande diversidade microbiana dentro dos cultivos. Além disso, foi obtida uma coleção satisfatória de bactérias extraídas do hepatopâncreas e do estômago do *L. vannamei* para posteriores estudos.

7. ANEXOS

7.1. Normas da revista – Aquaculture

INTRODUCTION

Types of paper

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere. Articles are expected to contribute new information (e.g. novel methods of analysis with added new insights and impacts) to the knowledge base in the field, not just to confirm previously published work.

Review Articles can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Contact details for submission

Papers for consideration should be submitted via the electronic submission system mentioned below to the appropriate Section Editor:

Nutrition:

D.M. Gatlin

The Nutrition Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews on various aspects of aquatic animal nutrition relevant to aquaculture. Manuscripts addressing the following areas of investigation are encouraged:

- 1) determination of dietary and metabolic requirements for various nutrients by representative aquatic species. Studies may include environmental/stress effects on animal's physiological responses and requirements at different developmental stages;
- 2) evaluation of novel or established feedstuffs as well as feed processing and manufacturing procedures with digestibility and growth trials. Such studies should provide comprehensive specifications of the process or evaluated ingredients including nutrients, potential anti-nutrients, and contaminants;
- 3) comparison of nutrient bioavailability from various ingredients or product forms as well as metabolic kinetics of nutrients, food borne anti-nutrients or toxins;
- 4) identification of key components in natural diets that influence attractability, palatability, metabolism, growth reproduction and/or immunity of cultured organisms;
- 5) optimization of diet formulations and feeding practices;
- 6) characterization of the actions of hormones, cytokines and/or components in intracellular signaling pathway(s) that influence nutrient and/or energy utilization.
- 7) evaluation of diet supplementation strategies to influence animal performance, metabolism, health and/or flesh quality.

Manuscripts concerning other areas of nutrition using novel or advanced methods are also welcome. Please note that in regard to various diet additives such as probiotics, prebiotics, herbal extracts, etc., a very large number of papers have already been published. Therefore, Aquaculture will not

continue to accept manuscripts that present initial and preliminary investigations of such additives. Manuscripts addressing these and other feed additives 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 in their metabolism. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

Aquaculture Production Science:

B.Costa-Pierce

AQUACULTURE PRODUCTION SCIENCE (PS) is one of 5 sections of the international journal AQUACULTURE dedicated to research on improvements and innovations in aquatic food production. Worldwide dissemination of the results of innovative, globally important, scientific research on production methods for aquatic foods from fish, crustaceans, mollusks, amphibians, and all types of aquatic plants. Improvement of production systems that results in greater efficiencies of resource usage in aquaculture. Effective applications of technologies and methods of aquaculture production for improved stocking regimes, the use of new species and species assemblages, and research on the efficient and sustainable usage of system space with the objective of minimizing resource usage in aquaculture. Investigations to minimize aquaculture wastes and improve water quality, technologies for nutrient recycling in aquaculture ecosystems, and the synergy of aquaculture and other food production systems using methods such as polyculture and integrated aquaculture.

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson

The Physiology and Endocrinology Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the physiology and endocrinology of cultured aquatic animals and plants, providing that their content is relevant to solving aquaculture problems. Manuscripts submitted to the journal must have a valid hypothesis or objective, clearly state the relevance to aquaculture, have proper experimental design with appropriate controls and utilize appropriate statistical analysis. When a study involves the administration of a pharmaceutical or other commercial product, please use generic or scientific names rather than trade names especially in the Title. The trade name can be mentioned in the Materials and Methods together with an exact description of its composition.

Topics covered by this section include, but are not limited to, physiological and endocrine aspects of:

- Reproductive development including both endocrine and environmental control
- Induced ovulation and spermiation

- Gamete quality, storage and cryopreservation
- Control of sex differentiation
- Physiology and endocrinology of gynogenetic and triploid aquatic organisms
- Physiology and endocrinology of transgenic organisms
- Molecular genetic assessment of physiological processes
- Larval physiology and the ontogeny of endocrine systems
- Malpigmentation
- Metamorphosis, smolting (salmonids) and molting (crustacea)
- Nutritional physiology
- Osmoregulation
- Stress
- Anesthesia, transport, handling
- Physiology of harvest techniques, product quality, flesh quality and pigmentation
- Endocrine and environmental regulation of growth
- Rearing density
- Temperature tolerance
- Disease physiology
- Pollutant physiology and water quality (when directly relevant to aquaculture)
- Respiratory, muscle and exercise physiology of cultured organisms
- Immunology (manuscripts on the physiological effects of probiotics must be of high scientific quality with statistically valid conclusions)

Diseases:

B. Austin

The Diseases 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.

Genetics:

G. Hulata

The Genetics Section welcomes high-quality research papers presenting novel data, as well as critical reviews, on various aspects of selective breeding, genetics and genomics, so long as the content is relevant to solving aquaculture problems. Please note, however, that Aquaculture will not accept manuscripts dealing with the application of well-described techniques to yet another species, unless the application solves a biological problem important to aquaculture production. Aquaculture will not accept manuscripts dealing with gene cloning, characterizing of microsatellites, species identification using molecular markers, EST papers with small collections, or mapping papers with a small number of markers, unless the papers also deal with solving a biological problem that is relevant to aquaculture production. Where appropriate, linkage maps should include co-dominant markers, such as microsatellite DNA and SNP markers, to enable application to other populations and facilitate comparative mapping. Aquaculture will not accept manuscripts focusing mainly on population genetics studies that are based on RAPD and AFLP markers, since the dominance and multilocus nature of the fingerprints are not suitable for making inferences about population genetic diversity and structure. There may be other journals that are more suitable for manuscripts not meeting these requirements.

Sustainability and Society:

D.C. Little

The Sustainability and Society section of the journal Aquaculture invites articles at the interface of natural and social sciences that address the broader roles of aquaculture in global food security and trade. Aims and scope of the Sustainability and Society section are the: global dissemination of interdisciplinary knowledge regarding the management of aquatic resources and resulting impacts on people. Interconnections with other sectors of food production; resource management and implications for societal impact. Going beyond a narrow techno-centric focus, towards more holistic analyses of aquaculture within well-defined contexts. Enquiry based on understanding trajectories of change amid the global challenges of climate change and food security. Mixed methods and approaches that incorporate and integrate both social and natural sciences. Relevance for the diverse range of policy makers, practitioners and other stakeholders involved. Articles that take a value chain approach, rather than being wholly production orientated, are encouraged.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguide> lines.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU* for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of

addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqua/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

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. 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>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. 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 any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

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. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

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. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **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.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned*

below) together with the actual database 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: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular INteractions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

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. Ca²⁺ and not Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. 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 P₂O₅).

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.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., 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

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. Further, high-resolution graphics files must be provided separately whether or not the graphics are embedded. See further under Electronic artwork.

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/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). 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, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) 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., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. 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.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide

the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution 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 provide the data 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. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use

PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

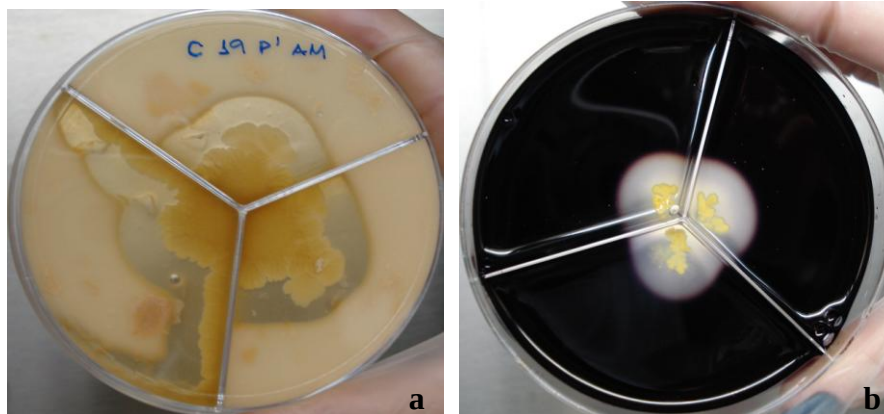
Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' 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://support.elsevier.com>.

8. APÊNDICES

8.1. Fotos das atividades extracelulares proteolítica (a) e amilolítica (b) da bactéria *Bacillus subtilis* (cepa 56).



8.2. Foto da atividade extracelular proteolítica da bactéria *Shewanella algae* (cepa 252).



8.3. Foto da atividade extracelular amilolítica da bactéria *Bacillus* sp. não cultivável (cepa 272).

