

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ISOLAMENTO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* AUTÓCTONE  
COMO PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA (*Centropomus  
parallelus*)**

**ELAINE CRUZ DE JESUS**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2014**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ISOLAMENTO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* AUTÓCTONE  
COMO PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA (*Centropomus  
parallelus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**ELAINE CRUZ DE JESUS**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2014**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

J58i Jesus, Elaine Cruz de.

Isolamento de uma cepa de *Bacillus subtilis* autóctone como probiótico para robalo peva (*Centropomus parallelus*) / Elaine Cruz de Jesus. – 2014.

72 f.: il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Robalo (peixe). 2. Stress (fisiologia). 3. Antibióticos em Medicina Veterinária. 4. Bacillus Subtilis I. Gomes, Levy de Carvalho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 639.3732

**ELAINE CRUZ DE JESUS**

**ISOLAMENTO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* AUTÓCTONE  
COMO PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA (*Centropomus  
parallelus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

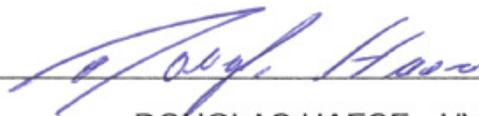
Aprovada em 27 de fevereiro de 2014,

Banca Examinadora,



---

RODRIGO MATOS DE SOUZA - UFES



---

DOUGLAS HAESE - UUV



---

LEVY DE CARVALHO GOMES – ORIENTADOR - UUV

Dedico aos meus pais Maria da  
Penha Ribeiro Cruz (*in memoriam*) e  
Oswaldo Cruz

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente quero agradecer ao meu mestre Levy de Carvalho Gomes por todo carinho, confiança e conhecimento passado, à sua amada esposa e professora Adriana Chippari Gomes e suas lindas filhas Isabela e Bibi pelo carinho e hospitalidade. Ao meu amado marido Westley Batista de Jesus por toda dedicação e ajuda durante esta jornada. A minha irmã Diana Cruz por toda paciência. Minha cadelinha Pitty por todo o carinho, aos pinguins, pois sempre que estava estressada era só olhar para eles e tudo passava. Agradeço a todos os amigos do Labpeixe por toda a ajuda, especialmente Vinícius Dadalto Baroni, Priscylla Pavione, Alexandra Veronez, Jéssica Pereira, Lorena O'Reilly Sepulchro e Larissa Novaes Simões, Andrea Tassis e Maria Araci Grapiuna de Carvalho, Taciana Onesorge Miranda Boschett de Padua, Raphaele Souza Paula Pinheiros Agradeço a Laila Carine Campos Medeiros pelo incentivo e ajuda. Agradeço também à Leiticia Sangy, Carolina Bellumat e a Jade Barbosa Kill A todos os meus familiares por todo o carinho. Aos meus amigos do IPRAM por todo o apoio nesse período, um agradecimento em especial vai para Renata Bhering e Luis Felipe Mayorga. A minha amiga Tainan Oliveira. À minha amada Clarrise Máximo, Professor João Damasceno e Paulo Roberto por todo o carinho e apoio. Agradeço também a doutora Fabiana Pilarski e sua orientanda Fernanda de Alexandre Sebastião do CAUNESP por todo o apoio. Bruno Correia da UFSC. Aos professores do mestrado em Ciência Animal, obrigado por tudo. À FAPES pelo apoio financeiro. Aos funcionários da UVV. Aos membros da banca examinadora, Dr. Rodrigo Matos de Souza, Douglas Haese. À minhas amigas que tornavam as aulas do mestrado mais divertidas: Rogéria Erlancher, Maritza Gurgel e Laura Conti, Kely Christy Bautz, Luciana Medeiros Simonetti, Jana Drews. À todos pelo apoio que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho. Obrigado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	2
1. Introdução.....	3
2. Fundamentação teórica .....	4
2.1 A importância da piscicultura como fonte de alimento, emprego e renda. ....	4
2.2 O robalo peva ( <i>Centropomus parallelus</i> ).....	5
2.3 Bactérias causadoras de doenças em peixes.....	6
2.4 Utilização de antibióticos na aquicultura.....	7
2.5 Probióticos como alternativa ao uso de antibióticos .....	8
2.6 Importância da origem do probiótico .....	9
2.7 Estresse em peixes .....	10
2.8 O uso de probióticos como mitigadores dos efeitos do estresse .....	11
REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO I.....	16
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS DE <i>Bacillus subtilis</i> AUTÓCTONE COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA ( <i>Centropomus Parallelus</i> ).....	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT .....	18
1. Introdução.....	19
2. Materiais e métodos .....	19
2.1 Obtenção dos animais.....	19
2.2 Isolamento do material biológico .....	20
2.3 Avaliação da atividade inibitória <i>in vitro</i> .....	21
2.4 Identificação molecular das bactérias selecionadas .....	22
2.5 Avaliação do probiótico na ração.....	22
2.6 Análise estatística .....	22
3. Resultados.....	23
4. Discussão .....	27
5. Conclusão.....	29
Referências .....	30
CAPÍTULO II.....	34
O USO DE CEPAS DE <i>Bacillus subtilis</i> COMO MITIGADOR DE ESTRESSE POR TRANSPORTE PARA ROBALO PEVA ( <i>Centropomus Parallelus</i> ).....	34
RESUMO.....	35

ABSTRACT .....	36
1. Introdução.....	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
2.1 Obtenção de animais e aclimação.....	38
2.2 Delineamento experimental.....	38
2.3 Preparação da dieta experimental da cepa <i>de Bacillus subtilis</i> .....	38
2.4 Crescimento.....	39
2.5 Teste de tolerância ao estresse .....	39
2.6 Coleta e preparação das amostras.....	40
2.7 Análise de cortisol, lactato, glicose e glicogênio .....	40
2.8 Avaliação da atividade das enzimas catalase e glutathiona- S-transferase .....	41
2.9 Estatísticas.....	42
3. RESULTADOS .....	42
3.1 Experimento 1 - Crescimento .....	42
3.2 Experimento 2 - Transporte.....	44
4. DISCUSSÃO .....	48
Referências .....	51
ANEXOS.....	55

## RESUMO

JESUS, Elaine Cruz, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014.  
**ISOLAMENTO DE UMA CEPA DE *Bacillus subtilis* AUTÓCTONE COMO PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA (*Centropomus parallelus*).** Orientador: Professor Dsc. Levy de Carvalho Gomes.

A piscicultura vem evoluindo a cada ano como uma importante fonte geradora de proteína de boa qualidade para o consumo humano. Entretanto a criação intensiva tem contribuído para o aumento da incidência de doenças, deterioração da qualidade ambiental bem como a exposição a situações de estresse que afetam o bem estar dos animais. A resposta comum a esses problemas tem sido a utilização de antibióticos, entretanto seu uso vem sendo questionado devido aos efeitos adversos de sua utilização e uma abordagem alternativa de grande interesse é sua substituição por probióticos. Este trabalho teve como objetivo isolar cepas autóctones e identificá-las através de PCR (polymerase chain reaction), avaliar a atividade inibitória frente a patógenos e sua viabilidade de crescimento quando adicionada a uma ração comercial, armazenadas sob diferentes condições. Posteriormente, essas cepas foram usadas como mitigadores dos efeitos adversos do estresse em juvenis de Robalo peva (*Centropomus parallelus*) quando transportados. Duas cepas identificadas como *Bacillus subtilis* (B02 e B03) demonstraram atividade inibitória, in vitro, contra os patógenos: *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas monteillii* e viabilidade de crescimento quando adicionados a uma ração comercial. Não houve diferenças significativas em parâmetros como tamanho e peso entre os tratamentos com as cepas e o controle. Em relação ao teste de estresse a cepa B02 melhorou significativamente índices como a glicose e lactato apesar do mesmo resultado não ter sido observado para o cortisol. Entre os tratamentos controle e B03 não ocorreram diferenças significativas. Os resultados alcançados indicam que o *Bacillus subtilis* pode ser utilizado como uma alternativa ao uso de antibióticos.

Palavras-chave: antibiótico, estresse, microrganismo, piscicultura.

## ABSTRACT

JESUS, Elaine Cruz, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014.  
**ISOLATION OF A STRAIN OF INDIGENOUS *Bacillus subtilis* AS A PROBIOTIC FOR FAT SNOOK (*Centropomus parallelus*).** Orientador: Professor Dsc. Levy de Carvalho Gomes.

Fish farming is evolving every year as an important source of good quality protein for human consumption. However the intensive farming has contributed to the increased incidence of diseases, deterioration of environmental quality as well as exposure to stressful situations that affect the welfare of animals. A common response to these problems has been the use of antibiotics, however its use has been questioned due to the adverse effects of its utilization and an alternative approach of great interest is your replacement by probiotics. This study aimed primarily to isolate autochthonous strains and identify them by PCR (polymerase chain reaction) evaluating the inhibitory activity against pathogens and viability growth when added to a commercial feed, stored under different conditions. In the second moment, these strains were used as mitigating the adverse effects of stress in juveniles of fat snook (*Centropomus parallelus*) when transported. Two strains identified as *Bacillus subtilis* (Bacilo 02 e Bacilo 03) showed inhibitory activity, in vitro, against pathogens: *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas monteilii* and viability growth when added to a commercial feed. There were no significant differences in parameters such as size and weight between treatments with the strains and control. Regarding the stress test the strain Bacilo 02 significantly improved indices such as glucose and lactate despite the same result has not been observed for cortisol. Among the treatments control and Bacilo 03 not occurred significant differences. The results indicate that the *Bacillus subtilis* can be used as an alternative to antibiotics.

Keywords: antibiotics, microorganism, fish farming, stress.

## 1. Introdução

A aquicultura se destaca como um dos setores da economia que possui uma das maiores taxas de crescimento (Sahu et al. 2008). A importância que a aquicultura exerce sobre a economia segue uma tendência de alta dado a demanda crescente do consumo de peixes, crustáceos e frutos do mar (Kesarodi-Watson et al. 2008).

O mercado consumidor cada vez mais globalizado e a consequente intensificação dos sistemas de cultivo têm levado a avanços consideráveis na indústria da aquicultura, entretanto, essa pressão por índices de produtividades cada vez maiores tem acarretado o surgimento de diversos problemas relacionados à maneira como os animais são criados (Wang, 2008). Criação com índices elevados de densidade, condições ambientais deterioradas e exposição à situações de estresse e doenças, são alguns dos problemas que podem acarretar grandes perdas econômicas (Kesarodi-Watson et al. 2008) e (Wang, 2008) .

Como forma de minimizar esses impactos negativos a indústria da aquicultura tem comumente feito uso de antibiótico e outras drogas sintéticas, entretanto, sua aplicação tem sido amplamente criticada devido aos problemas inerentes a sua utilização como, por exemplo, o surgimento de bactérias resistentes e a acumulação de resíduos destes fármacos no meio ambiente e nos próprios animais (Sahu et al. 2008).

Assim, estratégias alternativas ao uso dos antibióticos vêm sendo propostas e uma de grande interesse e de ampla aceitação é a utilização de probióticos como promotor de crescimento e saúde para os peixes (Wang et al, 2008)

Probióticos são definidos como organismo vivo, que afetam de maneira benéfica o hospedeiro melhorando sua microbiota intestinal e assim diminuindo ação de bactérias patogênicas e consequentemente favorecendo a saúde do animal (Gatesoupe, 1999).

Além dos benefícios à saúde dos animais estudos recentes vem demonstrando que os probióticos são também potenciais mitigadores dos efeitos adversos resultantes de situações de estresses, a qual, os peixes estão submetidos em sistemas de cultivo (Mohapatra et al. 2012).

Um fator de grande relevância na utilização de probiótico é a sua origem. Microrganismos autóctones são preferidos em virtude da probabilidade de se causar uma doença ao hospedeiro ser mitigada (Sugita et al, 2002).

Entre os peixes que se destacam com grande potencial para a piscicultura está o Robalo peva (*Centropomus parallelus*). Esta espécie é geralmente encontrada em águas com diferentes concentrações de salinidades, sendo uma importante fonte de renda de pescadores artesanais. (Tsuzuki e Berestinas, 2008).

É um animal muito apreciado devido às características culinárias de sua carne, e estudos sugerem que os animais criados em sistemas de cultivo mantem estas mesmas características quando comparado aos animais capturados na natureza. Assim sua produção em cativeiro é uma boa alternativa para geração de renda e conservação da espécie (Tsuzuki e Berestinas, 2008).

Considerando o que foi exposto, este trabalho teve como objetivo geral a seleção de uma cepa de *Bacillus subtilis* autóctone para ser usada como probiótico para Robalo peva (*Centropomus parallelus*) e a avaliação dessa cepa como medida mitigadora de estresse por transporte em peixes.

Este trabalho teve como objetivos específicos isolar e selecionar potenciais *Bacillus* como candidatos à probióticos. Os testes ocorreram a partir do cultivo e da verificação, in vitro, de atividade antagonista frente a bactérias patogênicas.

Também objetivou-se avaliar se o fornecimento de uma ração comercial, enriquecida com as cepas selecionadas de *Bacillus subtilis* autóctone, induziria a mitigação dos fatores adversos de estresse em juvenis de Robalo peva (*Centropomus parallelus*) submetidos à condições estressantes através da simulação de uma situação de transporte.

## **2. Fundamentação teórica**

### **2.1 A importância da piscicultura como fonte de alimento, emprego e renda.**

A piscicultura evolui constantemente e está se tornando uma importante fonte geradora de proteína de boa qualidade destinada ao consumo humano. Dados do FAO – Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura – indicam

que 75% de todo o pescado produzido no mundo é destinado à alimentação humana. Ainda segundo a mesma organização um grande número de países, em Desenvolvimento, tem no pescado a principal fonte de proteína de origem animal. (FAO, 2013).

No Brasil, dados do MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura – indicam que em 2011 a produção de pescado atingiu o valor de aproximadamente 1,5 milhões de toneladas. A pesca extrativa é a principal fonte de produção sendo responsável por 38,6% desse total, seguida pela aquicultura continental 38,0%, pesca extrativa continental 17,4% e aquicultura marinha 6% (Ministério da Pesca e Agricultura, 2012).

A piscicultura, como vertente da aquicultura, também tem um papel significativo na geração de emprego e renda. No Brasil, por exemplo, a alta disponibilidade de recursos hídricos contribui para a realização de projetos na área de aquicultura, substituindo atividades econômicas predominantemente predatórias como, por exemplo, a extração de madeira e a criação de gado (Ministério da Pesca e Agricultura, 2012).

O plano safra de pesca e aquicultura 2012/2013/2014 – que é um conjunto de políticas públicas sociais e econômicas do governo federal – estima que cerca de 1 milhão de pessoas obtenham sua renda diretamente do pescado. Caso se considere toda a cadeia produtiva este número sobe para três milhões de empregos diretos e indiretos gerados pelo setor. (Ministério da Pesca e Agricultura, 2012).

## **2.2 O robalo peva (*Centropomus parallelus*)**

O robalo peva (*Centropomus parallelus*) é um peixe eurihalino que pode ser encontrado em águas com diferentes variações de salinidade, dependendo da estação do ano e idade do peixe. Possui uma ampla distribuição tropical podendo ser encontrado desde o estado brasileiro de Santa Catarina até o estado norte americano da Flórida (Tsuzuki e Berestinas, 2008).

Estudos efetuados no conteúdo estomacal da espécie identificaram sua preferência alimentar por peixes, sem nenhuma espécie em específico. Completam ainda sua dieta com a ingestão de crustáceos, moluscos, ovos de outros peixes e pequenos insetos, sendo assim classificados como carnívoros (Barroso et al. 2002).

É um peixe considerado nobre, muito apreciado pelo sabor de sua carne, levando-o assim a possuir um alto valor comercial (Tsuzuki e Berestinas, 2008). Tucker et al. (1985) sugeriram que não existem grandes diferenças nas características culinárias como aroma, textura e sabor, entre robalos criados em tanques e os capturados na natureza. Isso indica que os indivíduos criados em cativeiro mantem as mesmas qualidades gastronômicas.

Certas características exibidas pela espécie como o bom crescimento, taxa de conversão alimentar altamente eficiente além da versatilidade em se adaptar a diversos sistemas de cultura, o torna um candidato à piscicultura marinha e salobra (Alvarez-Lajonchère e Tsuzuki, 2008).

No robalo, as variações sazonais influenciam os mecanismos de sobrevivência ou aclimatação, principalmente no inverno, quando o sistema de resposta imune específica destes animais é atenuado tornando-o mais susceptível a patógenos oportunistas (Santos et al. 2009).

Apesar de já existir na literatura trabalhos referentes à criação intensiva do Robalo peva, ainda existe uma série de questões a serem respondidas no sentido de se formar um conhecimento adequado sobre a forma de cultivo ideal da espécie (Santos et al. 2009). A maturação final e a desova espontânea não foram alcançadas sem a indução hormonal, quando criados em cativeiro. A taxa de mortalidade da espécie em estágio larval ainda é muito alta. As necessidades nutricionais dos juvenis de robalos precisam ser determinadas. O controle e o tratamento de doenças precisam ser verificados. Estratégias de alimentação precisam ser definidas (Cerqueira e Tsuzuki, 2009).

### **2.3 Bactérias causadoras de doenças em peixes**

Em um ambiente produtivo, onde os peixes estão expostos a condições estressantes, problemas relacionados à deterioração das condições ambientais e a saúde dos animais tem resultado em severas perdas econômicas (Aly et al. 2008).

Doenças causadas por infecções bacterianas são um dos grandes problemas enfrentados na aquicultura (El-Rhman et al. 2009). Em termos patológicos existem dois tipos de bactérias que causam doenças em peixes: obrigatórias e facultativas. Obrigatórias são aquelas que necessariamente precisam de um hospedeiro para se multiplicar. Facultativas podem ser encontradas em tanto em um hospedeiro como

livres no ambiente, sendo estas as mais comuns causadoras de doenças nos peixes (Plumb e Hanson, 2011).

As doenças bacterianas podem ser apresentar como bacteremias – existe há a presença dos patógenos no sangue sem a existência de sinais clínicos – ou na forma de septicemia onde patógenos e toxinas estão presentes no sistema circulatório exibindo, o hospedeiro, sinais clínicos tais como: inflamações, hemorragia e necrose (Plumb e Hanson, 2011). *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Vibrios* são gêneros de bactérias comumente encontradas na literatura como causadoras de doenças em peixes (Giri et al. 2012).

## **2.4 Utilização de antibióticos na aquicultura**

A resposta comum no tratamento de doenças tem sido a utilização de antibióticos. Esses têm sido utilizados como promotores de crescimento ou de forma profilática (preventiva). Entretanto, a necessidade de se estabelecer um sistema de prevenção e tratamento de doenças tem levado ao uso indiscriminado desses antibióticos (Kesarcodi-Watson et al. 2008).

Essa utilização sem critérios tem permitido o surgimento de bactérias resistentes a estes fármacos, além do fato de que resíduos desses antibióticos podem ser encontrados tanto nos peixes como no meio ambiente (El-Rhman et al. 2009). Segundo, Chelossi et al. (2003) estudo executado em sedimentos marinhos e em invertebrados demonstraram a presença de resíduos de antibióticos utilizados em criadouros de peixes, possibilitando a proliferação deste tipo de bactéria.

Embora não seja um consenso, existem alguns resultados indicando que genes dessas bactérias podem ser transferidos à microrganismos envolvidos em problemas de saúde nos humanos. Assim, existe não apenas o risco de perdas econômicas e contaminação do meio ambiente, mas também o risco à saúde humana (Kesarcodi-Watson et al. 2008)

Alguns países já introduziram barreias e proibições à utilização de antibióticos. Segundo Delsol et al. (2005), em 2005 a União Europeia banuiu o uso de antibióticos não terapêuticos da produção animal. A Noruega erradicou seu uso na indústria de salmão. Nos Estados Unidos foi proposto que qualquer droga planejada para ser utilizada em humanos fosse banida da utilização em animais.

Além da extensa documentação existente sobre os problemas da utilização de antibióticos (Wang et al. 2008), acontece o surgimento de uma consciência social questionando o uso desnecessário destes fármacos. Pressionando para que estratégias alternativas sejam utilizadas, dados os riscos ao meio ambiente e à saúde humana, e um dos campos que vem ganhando grande atenção dos pesquisadores é a utilização de probióticos como agentes de controle biológico (Kesarcodi-Watson et al. 2008 e El-Rhman et al. 2009).

## **2.5 Probióticos como alternativa ao uso de antibióticos**

Gram et al. (1999) defini o termo probiótico como: “Suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro melhorando seu equilíbrio microbiano”.

Os probióticos já são utilizados há algum tempo na aquicultura, mas apenas recentemente estão se tornando parte integrante das práticas de cultura visando à obtenção dos benefícios de seu uso (Nayak, 2010).

O uso de probióticos pode colaborar na eficiência da conversão alimentar e ganho de peso. Confere proteção ao hospedeiro através da exclusão competitiva por sítios de adesão e produção de compostos inibitórios como os ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico), o peróxido de hidrogênio e diversos outros tais como as bacteriocinas. Atuam também na modulação e estimulação do sistema imune específico e não específico (Giri et al. 2012) e (Nayak, 2012).

Certos probióticos na aquicultura ainda desempenham um importante papel na manutenção das condições ambientais favoráveis. Utilizados como aditivos na água eles contribuem para a decomposição de matéria orgânica além de controlar os níveis de fósforo, nitrito e amônia (Nayak, 2012).

Segundo Gatesoupe (1999), a microbiota do trato gastrointestinal dos peixes é fortemente dependente das condições ambientais externas, devido ao fluxo intenso de água através do seu trato digestivo. Variações em parâmetros físico-químicos como, por exemplo, temperatura e salinidade, podem alterar a composição dessa microbiota.

Ainda segundo Gatesoupe (1999) essa ingestão contínua de água aumenta a influência que o meio exerce sobre a saúde dos animais. Essa influência é particularmente importante durante o estágio larval, quando os mecanismos de defesa não estão totalmente estabelecidos.

Existem diversas publicações na literatura que demonstram os benefícios da utilização de probióticos na aquicultura. El-Rhman et al. (2009) estudaram o potencial probiótico de espécies de *Pseudomas* e *Micrococcus luteus* para o crescimento e melhora da saúde em Tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). Concluiu-se que uma dieta acrescida de *Micrococcus luteus* melhorou o crescimento e reduziu a flora patogênica da espécie. Como as mesmas características não foram verificadas para o *Pseudomas*. El-Rhman et al. (2009) consideraram esta uma espécie não adequada para utilização como probiótico para Tilápias do nilo.

Estudo semelhante foram realizados por Aly et al. (2008), verificando o potencial probiótico de *Bacillus subtilis* e *LactoBacillus acidophilus* na resposta imune e resistência em Tilápias do Nilo. Foi verificado que os peixes alimentados com uma mistura das duas bactérias apresentaram um aumento significativo nos níveis de proteção contra patógenos.

Andani et al. (2012) verificaram o potencial probiótico *LactoBacillus casei* e *LactoBacillus plantarum* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) obtidas a partir de seu trato gastrointestinal, contra o patógeno *Yersinia ruckeri*. Os resultados obtidos demonstraram que uma dieta com as bactérias melhorou o crescimento e diminuiu os níveis de mortalidade.

Segundo Kennedy et al. (1998), a utilização de *Bacillus subtilis* na forma de aditivo na água junto com a redução da salinidade resultou na aparente eliminação de *Vibrios* em juvenis de Robalo Flecha (*Centropomus undecimalis*). Estudo efetuado por Moriarty (1998) verificou que a introdução de cepas de *Bacillus spp.* aumentou a taxa de sobrevivência de camarões, cultivados em cativeiro, reduzindo a quantidade de *Vibrios spp.* encontrados nos sedimentos e na água dos tanques de criação. Zhou et al. (2010) concluiu que *Bacillus coagulans* e *Rhodopseudomonas palustres* utilizados como aditivos na água melhoraram a saúde e a taxa de crescimento de Tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*).

## **2.6 Importância da origem do probiótico**

A seleção do probiótico tem se mostrado um fator importante, pois a escolha de microrganismos inapropriados pode levar à efeitos indesejados no hospedeiro. Certas características são desejadas em cepas probióticas, elas devem ser capazes

de se colonizar, estabelecer e multiplicar-se no trato gastrointestinal do hospedeiro (Andani et al. 2012).

Sugita et al. (2002) verificaram as habilidades antibacterianas de bactérias isoladas a partir de três origens: trato gastrointestinal, água dos tanques de criação e rações comerciais, contra *Lactococcus garvieae*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum* e *V. Vulnificus* em juvenis de linguado (*Paralichthy olivaceus*). Os resultados obtidos demonstraram que a origem com um maior número de bactérias com algum tipo de habilidade antibacteriana foi o trato gastrointestinal. Isso sugere que bactérias obtidas a partir desta fonte sejam boas candidatas a apresentarem algum tipo de propriedade probiótica.

Probióticos de origem autóctones tem um potencial de competição maior contra microrganismos patógenos. Tendem a tornarem-se predominantes num período de tempo menor após a ingestão. Também ajudam o retorno à composição normal de uma microbiota prejudicada, melhorando assim a resistência do hospedeiro a doenças (Sun et al. 2010).

## **2.7 Estresse em peixes**

Estresse é considerado qualquer situação adversa que afeta o bem-estar de um indivíduo, levando o corpo a produzir respostas, não específicas, aos fatores causadores do estresse (Barton, 2002). Nos peixes, essas respostas são as somas das alterações fisiológicas que ocorrem em função de estressores físicos, químicos ou biológicos (Plumb e Hanson, 2011).

Segundo Barton (2002) a resposta ao estresse é um mecanismo adaptativo que permite aos peixes manter o sua normalidade ou estado homeostático. Homeostase é a capacidade de um ser vivo de regular o seu ambiente interno de forma a se manter uma condição estável

Geralmente nos peixes o estresse está relacionado à questões como: manejo, transporte, pesagem, densidade populacional, qualidade e parâmetros físico-químicos da água, entre outros. Como resultado de uma situação estressante pode ocorrer, nos peixes, a diminuição no consumo de alimento, baixa taxa de crescimento, doenças e até mesmo a morte (Plumb e Hanson, 2011).

Barton (2002) classificou as respostas dos peixes ao estresse em três categorias: primárias, secundárias e terciárias. Primárias, são aquelas onde há a

liberação de hormônios, principalmente catecolaminas e cortisol, na circulação. Secundárias, são as alterações em função dos hormônios liberados: mudança no plasma, nos níveis metabólicos, nos parâmetros hematológicos entre outros, todos relacionados a ajustes fisiológicos no metabolismo, na respiração e na função imune, por exemplo. Terciárias, são os efeitos das secundárias nos indivíduos como um todo, são observadas mudanças no crescimento, na resistência à doenças, no comportamento e na taxa de sobrevivência, por exemplo.

## **2.8 O uso de probióticos como mitigadores dos efeitos do estresse**

Segundo Mohapatra et al. (2012) apesar de existirem estudos que reportam o benefício do uso de probióticos como atenuantes ao estresse em peixes essa relação ainda não está bem compreendida.

O efeito benéfico sobre os estressores tem aplicação direta nas práticas de aquicultura. Antes de operações críticas como transporte, mudanças na temperatura da água, manuseio ou qualquer outra condição estressante os peixes poderiam ser tratados com probiótico de forma a se mitigar os efeitos adversos (Varela, 2010).

Liu et al. (2010) verificou os efeitos de *Bacillus subtilis* na tolerância ao estresse em camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*), concluindo que houve um aumento na tolerância quando esses foram submetidos à mudanças bruscas de temperatura, salinidade e concentração de N-nitrito.

Varela et al. (2010) em estudo efetuado com dourada (*Sparus auratus*) verificaram que houve uma melhora na tolerância ao estresse quando administrado uma dieta com o probiótico PDP11 – cepa bacteriana da família do Alteromonadaceae.

Mohapatra et al. (2012) verificaram que uma dieta composta por uma mistura de alguns de probióticos mitigou os efeitos adversos em carpas indianas Rohu (*Labeo rohita*) induzidas ao estresse através da exposição ao inseticida fenvalerato.

## REFERÊNCIAS

- ABUSELIANA, A. F.; DAUD, H. H. M.; AZIZ, S. A.; BEJO, S. K.; ALSAID, M. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis sp.*). Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 10, p. 914-919, 2011.
- ANDANI, H. R. R.; TUKUMECHI, A.; MESHKINI, S.; SHEIKHZADEH, N., Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyology, v. 28, p. 1-7, 2012.
- ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *LactoBacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology, v.25, p. 128-136, 2008.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M. Y. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. Aquaculture Research, v. 39, p. 684-700, 2008.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. A review bacterial pathogens of fish. Journal of Applied Bacteriology, v. 58, p. 483-506, 1985.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X-H.; *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in Applied Microbiology, v. 43, p. 119-124, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies Nativas para a piscicultura no Brasil. 2ª Edição. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, 608p.
- BARROSO, M. V.; CASTRO, J. C.; AOKI, P. C. M.; HELMER, J. L. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o Robalo (*Centropomus parallelus*). Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, p. 2157-2164, 2002.
- BARTON, B. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integrative and Comparative Biology, v.42, p.517-525, 2002.
- 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.
- CERQUEIRA, V. R.; TSUZUKI, M. Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. Fish Physiology and Biochemistry, v.35, p. 27-38, 2009.

CHELOSSI, E.; VEZZULLI, L.; MILANO, A.; BRANZONI, M.; FABIANO, M. RICCARDI, G.; BANAT, I. M, Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*, v. 219, p. 83-97, 2003.

DHERT, PH.; LAVENS, P; SORGELOOS, P. A simple test for quality evaluation of cultured fry marine fish. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. v. 57, p. 2135-2141, 1992.

EL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A. E.; SHALABT, A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Fish and Shellfish Immunology*, v.27, p. 175-180, 2009.

ESPELID, S.; LØKKEN, G. B.; STEIRO, K.; BØGWALD, J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). *Fish and Shellfish Immunology*, v.6, p. 95-110, 1996.

FAO (FOOD AND AGRICULTURA ORGANIZATION). O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio. Roma:Itália. Disponível em:<[www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

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

GIRI, S. S.; SEN, S. S.; SUKUMARAN, V. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.32, p. 1135-1140, 2012.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

KENNEDY, S. B.; TUCKER, JR. J. W.; NEIDIG, C. L.; VERMEER, G. K.; COOPER, V. R.; JARREL, J. L.; SENNET, D. G. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*centropomus undecimalis*). *Bullet of Marine Science*, v. 62(2), p. 573-588, 1998.

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

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF, 2012. Disponível em:<[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Plano safra da pesca e aquicultura 2012/2013/2014. Brasília, DF, 2012. Disponível em:<[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Planos\\_e\\_Politicis/Plano%20Safr\(Cartilha\).pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Planos_e_Politicis/Plano%20Safr(Cartilha).pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

- MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; PRUSTY, A. K.; KUMAR, K.; PRASAD, K. P.; MOHANTA, K. N. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 104, p. 28-37, 2012.
- MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in *penaeidae* aquaculture ponds. *Aquaculture*, v. 164, p. 351-358, 1998.
- NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 29, p. 2-14, 2010.
- PLUMB, J. A.; HANSON, L. A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3<sup>a</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2011. 492p.
- SAHU, M. K.; SWARNAKUMAR, N. S.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspective. *Indian Journal of Microbiology*. v. 48, p. 299-308, 2008.
- SANTOS, A. A.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PRAIVA, M. J. T.; JULIANO, Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. *Aquaculture*, v. 296, p. 359-366, 2009.
- SUN, Y-Z.; YANG, H-L.; MA, R-L.; LIN, W-Y. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 29, p. 803-809, 2010.
- TSENG, D-Y.; HO, P-L.; HUANG, S-Y; CHENG, S-C.; SHIU, Y-L.; CHIU, C-S.; LIU, C-H. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 26, p. 339-344, 2009.
- TSUZUKI, M. Y.; BERESTINAS, A. C. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, p. 535-541, 2008.
- TUCKER, J. W.; LANDAU, M. P.; FAULKNER, B. E. Culinary value and composition of wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. *Florida Scientist*, v.48, p. 196-200, 1985.
- VARELA, J. L.; RUIZ-JARABO, I.; VARGAS-CHACOFF, L.; ARIJO, S.; LEÓN-RUBIO, J. M.; GARCÍA-MILLÁN, I. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, v. 309, p. 265-271, 2010.
- VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*. v. 231, p. 145-152, 2004.

WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, v. 281, p. 1-4, 2008.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, v. 274, p. 1-14, 2008.

ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 35, p.501-509, 2010.

## CAPÍTULO I

### **ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* AUTÓCTONE COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA (*Centropomus Parallelus*)**

## RESUMO

JESUS, Elaine Cruz, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014.  
**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* AUTÓCTONE COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA ROBALO PEVA (*Centropomus Parallelus*).**  
Orientador: Professor Dsc. Levy de Carvalho Gomes.

Na aquicultura existem diversos problemas relacionados às infecções bacterianas, o que pode acarretar severas perdas econômicas. O controle de doenças geralmente tem sido alcançado com a utilização de antibióticos, entretanto, seu uso tem sido amplamente criticado devido aos efeitos negativos de seu uso. Uma abordagem alternativa que ganha grande aceitação é a utilização de cepas probióticas para o controle de doenças e outros efeitos benéficos ao hospedeiro. Esse estudo teve como o objetivo isolar cepas autóctones do trato gastrointestinal de *Centropomus parallelus*. Animais adultos foram levados ao laboratório de microbiologia da universidade vila velha - UVV e usando técnicas assépticas o trato gastrointestinal foi diluído, cultivado e vinte cepas de *Bacillus* foram isoladas. Estas cepas foram avaliadas para confirmar se apresentavam atividades inibitórias frente aos patógenos: *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas libanensis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas hydrophila* e também a viabilidade de crescimento quando armazenada sob diferentes condições. Duas cepas identificadas como *Bacillus subtilis* apresentaram os melhores desempenhos. Estas cepas também apresentaram crescimento quando adicionadas a uma ração comercial e armazenadas sob diferentes condições: geladeira ( 5°C), freezer (-18°C) e temperatura ambiente (30°C). Os resultados alcançados demonstraram que as cepas autóctones de *Bacillus subtilis* exerceram atividade inibitória frente aos patógenos e mantiveram uma quantidade constante de colônias viáveis quando armazenadas em diferentes condições. Sendo assim consideradas candidatas viáveis à probiótico. O uso de probióticos vem sendo utilizados com uma alternativa ao uso de antibióticos. A seleção de bactérias autóctones é preferida por mitigar a possibilidade de patogenicidade bem como aumentar a possibilidade de adesão ao trato gastrointestinal do hospedeiro tendo papel ativo na prevenção à doenças e consequente melhoria na condição dos peixes.

Palavras – chave: antibiótico, bactéria, inibição, temperaturas.

## ABSTRACT

JESUS, Elaine Cruz, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014.  
**ISOLATION AND SELECTION OF STRAINS OF THE INDIGENOUS *Bacillus subtilis* WITH POTENCIAL PROBIOTIC TO FAT SNOOK (*Centropomus Parallelus*).** Orientador: Professor Dsc. Levy de Carvalho Gomes.

In aquaculture there are many problems related to bacterial infections, which can cause severe economic losses. The disease control has generally been achieved by the use of antibiotics, however, its use has been widely criticized due to the negative effects of their use. An alternative approach that gains wide acceptance is the use of probiotic strains for disease control and others beneficial effects to the host. This study was aimed to isolate autochthonous strains of gastrointestinal tract of the *Centropomus parallelus*, adult animals were taken to the microbiology laboratory of universidade vila velha – UVV and using aseptic techniques the gastrointestinal tract was diluted, cultivated and Twenty strains of *bacillus* were isolated. These strains were evaluated to confirm if showed inhibitory activities against the pathogens: *Pseudomonas monteillii*, *Pseudomonas libanensis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas hidrophila* and also the viability of growth when stored under different conditions. Two strains identified as *Bacillus subtilis* showed the best performance. These strains also grew when added to a commercial feed and stored under different conditions: refrigerator ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $\pm -18^{\circ}\text{C}$ ) and room temperature ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ). The results obtained demonstrated that the autochthonous strains the *Bacillus subtilis* exercised inhibitory activity against pathogens and maintained a constant amount of the viable colonies when stored under different conditions. Thus considered viable candidates to probiotic. The use of probiotics has been used as an alternative to antibiotics. The selection of autochthonous bacteria is preferred by mitigating the possibility of pathogenicity as well increase the possibility of adhesion to the gastrointestinal tract of the host having an active role on prevention of diseases and consequent improvement in the condition of the fish.

Keywords: Inhibition, bacteria, antibiotics, temperatures.

## 1. Introdução

Num ambiente de produção em larga escala, os animais aquáticos estão expostos à uma série de condições adversas que podem levar à perdas econômicas consideráveis (Aly et al. 2008).

Comumente tem se utilizado antibióticos como mitigadores desses impactos, entretanto o uso descontrolado destes fármacos pode levar ao surgimento de cepas bacterianas resistentes a essas drogas (El-Rhman et al., 2009). Além disso, ocorre o surgimento de uma consciência social que questiona o uso desnecessário destes antibióticos, reivindicando abordagens alternativas à sua utilização (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

Um dos métodos mais proeminentes, em substituição ao uso de antibióticos, é a utilização de probióticos. Esses são definidos como “microorganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro” (Giri et al., 2012). Probióticos colaboram na eficiência da conversão alimentar e ganho de peso. Conferem proteção ao hospedeiro através da exclusão competitiva por sítios de adesão e produção de compostos inibitórios. Atuam também na modulação e estimulação do sistema imune específico e não específico (Giri et al., 2012) e (Nayak, 2012).

Não é possível afirmar que cepas autóctones tenham um desempenho superior quando comparadas a cepas de outras origens (Verschuere et al. 2000) e (Fjellheim et al. 2010), entretanto, Balcazar et al. (2006) frisa que por questões de não patogenicidade ou pela habilidade de sobreviver e colonizar o intestino dos animais é preferível utilizar cepas autóctones.

Assim o presente estudo teve como objetivo selecionar uma cepa de *Bacillus subtilis* autóctone para ser usada como probiótico para o Robalo peva (*Centropomus parallelus*) através da avaliação *in vitro* da atividade inibitória frente à patógenos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Obtenção dos animais

Setes exemplares adultos de robalo peva (*Centropomus parallelus*) sem sinais de doenças foram obtidos com rede de pesca na colônia de pescadores do

distrito de Regência localizado no município de Linhares – Espírito Santo. Os animais foram acondicionados em material isolante térmico e levados ao laboratório de microbiologia da Universidade Vila Velha – UVV onde os experimentos foram executados.

## 2.2 Isolamento do material biológico

Para se isolar as bactérias, todo o trato gastrointestinal dos peixes foi removido através de técnicas assépticas, dividido em porções. Essas porções foram classificadas em: esôfago (ESO), estômago (EST), cecos pilóricos (CP), intestino proximal (IP), intestino medial (IM) e intestino final (IF).

Um grama de cada porção foi diluído em 9ml de solução salina estéril à 0,85% e utilizando-se técnica de diluição seriada cada amostra foi inoculada em triplicata em ágar diferencial para *Bacillus* (HIMEDIA). As colônias sugestivas de *Bacillus subtilis*, neste meio de cultura, se apresentam na cor amarelada em função da fermentação do açúcar manitol.

Os isolados de *Bacillus* de cada segmento do trato digestório foram quantificados e caracterizados pelo método de gram. Nesse método uma gota de solução salina foi colocada sobre uma lâmina e as bactérias foram espalhadas sobre a solução salina até a secagem. Com a utilização de calor os microrganismos foram fixados nas lâminas. Em seguida a lâmina foi coberta com cristal violeta. Após o período de 1 minuto a lâmina foi lavada com água deionizada. A placa foi coberta com solução lugol por 1 minuto e novamente lavada com água deionizada, com álcool absoluto e com água deionizada, nesta sequência. A lâmina foi então corada com fucsina por 30 segundos. Novamente foi lavada com água deionizada e após secagem a observação foi realizada em microscópio óptico. Bactérias gram positivas detêm uma parede celular mais espessa, composta de peptídeoglicano, e as bactérias Gram negativas possuem uma parede celular composta de lipopolissacarídeo. Por essas características as Gram positivas coram na cor roxa, porque retêm o cristal violeta, e as negativas, quando lavadas com álcool, ocorre um rompimento da camada externa de lipopolissacarídeo permitindo assim que o complexo cristal violeta e Lugol saiam da célula. Para que haja visualização das Gram negativas coramos no final com Safranina fazendo com que estas se apresentem na coloração rósea.

Cada *Bacillus* isolado recebeu a identificação “B” seguido de um número, ficando de B01 até B20, correspondendo ao número de cepas isoladas.

### **2.3 Avaliação da atividade inibitória *in vitro***

Para identificação do potencial probiótico das bactérias foram realizados testes de antagonismo contra potenciais patógenos. Foram utilizadas cepas ATCC e isolados obtidos no centro de aquicultura da UNESP-CAUNESP e no setor de bacteriologia do Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura da UFSC. As cepas patogênicas utilizadas foram: *Pseudomonas monteilii* CIP 104883, *Pseudomonas libanensis* CIP 105460, *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749 e *Aeromonas hidrófila* ATCC 7966.

O método utilizado foi derivado de Ruiz et al. (1996). Inicialmente, Tanto o *Bacillus* como as bactérias patogênicas foram ajustadas para o valor de 0,5 na escala de Mac Farland, que é o padrão de turvação mais utilizado para se determinar a multiplicação em meios de cultivo líquido. Tubos com as bactérias foram comparadas a tubos contendo diversas concentrações de cloreto de bário ( $BaCl_2$ ) e ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) equivalendo a diversas concentrações bacterianas, para maior eficiência na técnica, usando uma microplaca, as amostras contendo a solução padrão e as com as bactérias foram levados ao leitor de microplaca avaliação das concentrações. Após este ajuste ambas foram cultivadas em agar tripton de soja (TSA) (HIMEDIA) por um período de 24h à 37°C. Discos de ágar do *Bacillus* foram removidos e inseridos na placa de cultivo das bactérias patogênicas por um período de 24h à 37°C. A presença de halos de inibição foi tomada como evidência da atividade inibitória. O grau de inibição foi avaliado com base na medida do tamanho do halo de inibição. Para esse medição foi utilizado um paquímetro digital. Cepas que apresentaram um halo de inibição acima de 5mm para pelo menos 3 patógenos foram consideradas candidatas a probiótico e selecionadas para posterior identificação. Também foram analisados os halos de inibição apresentados pelos antibióticos comerciais, Eritromicina, Clorofenicol, Sulfazotrin, Amicacina além das cepas *Bacillus subtilis* 6633 e uma cepa comercial de *Bacillus subtilis* (Cepa C-3102) nome comercial Calsporin 10. Os discos contendo dos antibióticos foram fornecidos pelo laboratório de microbiologia da Universidade Vila Velha-UVV.

## 2.4 Identificação molecular das bactérias selecionadas

Para identificação molecular das cinco cepas de *Bacillus* que demonstraram potencial probiótico, foi feita por análise de PCR utilizando o kit *Bacillus subtilis* Qual PCR Box 1.0(Genebox, Lisboa, Portugal). Este kit é específico para a detecção do RNAr 16S do genoma do *Bacillus subtilis* em DNA de amostras biológicas.

## 2.5 Avaliação do probiótico na ração

Foi utilizada uma ração extrusada com 45% de proteína para a composição das dietas. Em 100g de ração foram espalhadas 10ml de caldo BHI (HIMEDIA) com as cepas de *Bacillus* B02 e B03, crescidas anteriormente nesse meio. No intuito de se alcançar o mesmo número de células bacterianas nas duas amostras estas foram lidas em um leitor de micro placa (Molecular Devices) e a turbidez dos tubos de cultivo foi ajustado para o valor 0,5 na escala de Mac Farlland. No controle foi adicionado caldo sem o *Bacillus*. Todas as dietas foram levadas a uma estufa ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ) de circulação para secagem.

No intuito de avaliar o comportamento das duas cepas do *Bacillus* e do controle quando adicionadas a ração e armazenadas em diferentes locais, nove amostras de 1g de cada ração foram armazenada em três ambientes distintos: geladeira ( $5^{\circ}\text{C}$ ), freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) e à temperatura ambiente ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ), durante um período de 30 dias e a cada dez dias uma amostra de cada ambiente foi diluída em 9ml de salina usando a técnica de diluição seriada e plaqueada em triplicata em meio de cultura de ágar diferenciação para *Bacillus* para contagem de células viáveis.

## 2.6 Análise estatística

Os resultados da concentração de *Bacillus Subtilis* nos diferentes tratamentos foram comparados com os diferentes locais de armazenagem por uma Anova de

dois fatores seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Todos os cálculos foram executados com o software SigmaStat 3.5.

### 3. Resultados

Baseado em exames morfológicos e testes de coloração de Gram, 20 cepas de *Bacillus* foram obtidas a partir de porções do trato gastrointestinal de Robalo peva (*Centropomus parallelus*). Inicialmente estas cepas foram categorizadas em B01 à B020.

tabela 1 – Número de colônias e cepas de *Bacillus* isolados por segmento do trato gastrointestinal exhibe a quantidade de colônias por porção do trato gastrointestinal e o número de cepas isoladas.

**tabela 1** – Número de colônias e cepas de *Bacillus* isolados por segmento do trato gastrointestinal de adultos de Robalo peva obtidos de pescadores da localidade de Regência – ES.

Seguimento	Número de colônias isoladas	Número de cepas	Nome da cepa
Esôfago	21	2	B01, B02
Estômago	42	6	B01, B02, B06, B08, B09, B015
Cecos Pilóricos	56	8	B01, B02, B012, B013, B014, B017, B018, B020
Intestino I	60	3	B01, B02, B07
Intestino M	40	3	B04, B05, B019
Intestino F	146	7	B01, B02, B03, B05, B010, B011, B016
Total	365	29	

A avaliação inibitória *in vitro* mostrou que algumas das cepas de *Bacillus* induziram a criação de halos de inibição contra os patógenos, conforme mostrado na tabela 2. Podemos observar que as cepas B02, B03, B04, B18 e B19 apresentaram halos de inibição contra pelos menos três patógenos. Também verifica-se que os patógenos *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas hydrophila* foram inibidas por estas cinco cepas. Destacam-se as cepas B02 e B03 que apresentaram atividade inibitória contra todos os patógenos. Halos de inibição induzidos pelo B02 variaram entre 20,35mm à 26,41mm contra *Pseudomonas monteilli* e *Aeromonas hydrophila*, respectivamente. Para o B03 os valores percebidos variaram de

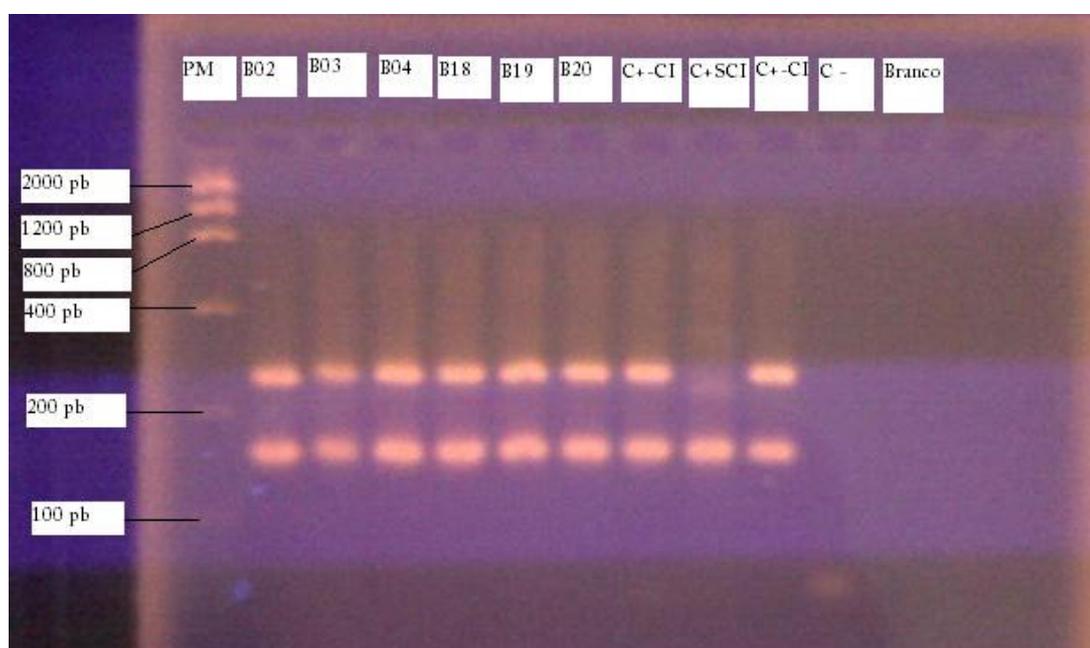
20,80mm à 24,86mm conta, respectivamente, *Pseudomonas monteilli* e *Vibrio harveyi*.

tabela 2 – teste de antagonismo das cepas de *Bacillus* frente à patógenos obtidas a partir de porções do trato gastrointestinal de adultos de Robalo Peva (*Centropomus parallelus*). Dados expressos em mm na forma de  $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ . Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos

Cepas Bacterianas	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Aeromonas hidrophila</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<i>Pseudomonas monteilli</i>
B01	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B02	23,77±0,68 <sup>a b</sup>	24,95±0,10 <sup>abc</sup>	26,89±1,19 <sup>a</sup>	24,11±0,72 <sup>a</sup>	20,42±0,43 <sup>bc</sup>
B03	24,90±0,54 <sup>a b</sup>	24,77±0,17 <sup>abc</sup>	21,14±1,96 <sup>ab</sup>	24,36±1,47 <sup>a</sup>	20,45±1,35 <sup>abc</sup>
B04	25,02±0,17 <sup>a b</sup>	24,5±0,35 <sup>abc</sup>	18,22±0,22 <sup>b</sup>	30±0 <sup>a</sup>	0±0
B05	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B06	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B07	0±0	0±0	0±0	24,47±1,07 <sup>a</sup>	0±0
B08	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B09	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B010	0±0	0±0	20±0 <sup>b</sup>	30±0	0±0
B011	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B012	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B013	0±0	0±0	22,45±0,97 <sup>ab</sup>	26,48±0,68 <sup>a</sup>	17,60±1,09 <sup>c</sup>
B014	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B015	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B016	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B017	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
B018	23,11±1,64 <sup>a b</sup>	20,86±0,62 <sup>c</sup>	20,70±0,80 <sup>ab</sup>	30±0 <sup>a</sup>	0±0
B019	21,65±0,45 <sup>b</sup>	22,85±0,63 <sup>bc</sup>	26,4±0,84 <sup>a</sup>	0±0	0±0
B020	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Probiótico comercial <i>Bacillus subtilis</i>	25,61±2,03 <sup>a b</sup>	25,0±1,11	18,77±1,49 <sup>b</sup>	24,73±1,78 <sup>a</sup>	21,76±0,59
Eritromicina	30±0 <sup>a</sup>	0±0	16,63±0 <sup>b</sup>	0±0	0±0
Clorofenicol	30±0 <sup>a</sup>	34,88±0 <sup>a</sup>	27,66±0 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>	29,87±0 <sup>abc</sup>
Sulfazotrin	30±0 <sup>a</sup>	30,3±0 <sup>a</sup>	31,68±0 <sup>a</sup>	30±0 <sup>a</sup>	31,13±0 <sup>ab</sup>
Amicacina	30±0 <sup>a</sup>	28,69±0 <sup>ab</sup>	0±0	30±0 <sup>a</sup>	32,04±0 <sup>a</sup>

Com base nos resultados dos testes de inibição e de crescimento em meio de cultura ágar e caldo as cepas B02, B03, B04, B018 e B019 foram selecionadas para identificação molecular. O teste de PCR concluiu que as cepas eram todas da espécie *Bacillus subtilis*. O resultado do teste está demonstrado na figura 1 - Foto de identificação molecular via PCR. Na figura 1 podem-se observar as cinco lanes geradas pelas cepas probióticas. A lane PM indica o padrão de peso molecular, as

lanes C+-CI os controles positivo com controle interno(em duplicata), C+SCI é o controle positivo sem o controle interno e o C- é o controle negativo. As lanes B02 a B19 representam as amostras dos Bs 02 a B19, respectivamente. Para que o resultado seja dado como positivo e validado é necessário que os tamanhos das bandas específicas de *Bacillus subtilis* e controle interno sejam, respectivamente, 151pb e 245pb (pares de base). Como a banda específica e a de controle interno da lane C+-CI se mostraram presentes e bem marcadas o resultado é dado como conclusivo que houve a reação. Como a banda específica e a de controle interno das lanes das amostras também estão presentes e são homólogas as das lanes C+-CI o resultado é positivo e validado para *Bacillus subtilis*.



**figura 1** - Foto de identificação molecular via PCR de amostras de Bs isolados do trato gástrico intestinal de *Centropomus parallelus*. Onde PM é o padrão de peso molecular, C+-CI os controles positivo com controle interno (em duplicata), C+SCI é o controle positivo sem o controle interno e o C- é o controle negativo, Pb é pares de base. B02 a B19 correspondem às amostras dos B02 a B19, respectivamente.

A contagem total das colônias da cepa B02 na ração no início do experimento para todos os ambientes foi de  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Na geladeira a contagem nos dias 10, 20 e 30 registrou os seguintes valores:  $6,5 \times 10^5$  UFC/ml,  $10 \times 10^5$  UFC/ml e  $6,7 \times 10^5$  UFC/ml (figura 2 - Viabilidade da cepa probiótica B02 adicionada à ração ao longo do tempo).

No freezer os valores registrados foram:  $5 \times 10^5$  UFC/ml,  $5,1 \times 10^5$  UFC/ml,  $5 \times 10^5$  UFC/ml para os dias 10, 20 e 30, respectivamente. Em temperatura ambiente a contagem total das colônias atingiu os seguintes valores, para os dias 10, 20 e 30:  $7,3 \times 10^5$  UFC/ml,  $10,3 \times 10^5$  UFC/ml e  $11,7 \times 10^5$  UFC/ml (figura 2 - Viabilidade da cepa probiótica B02 adicionada à ração ao longo do tempo).

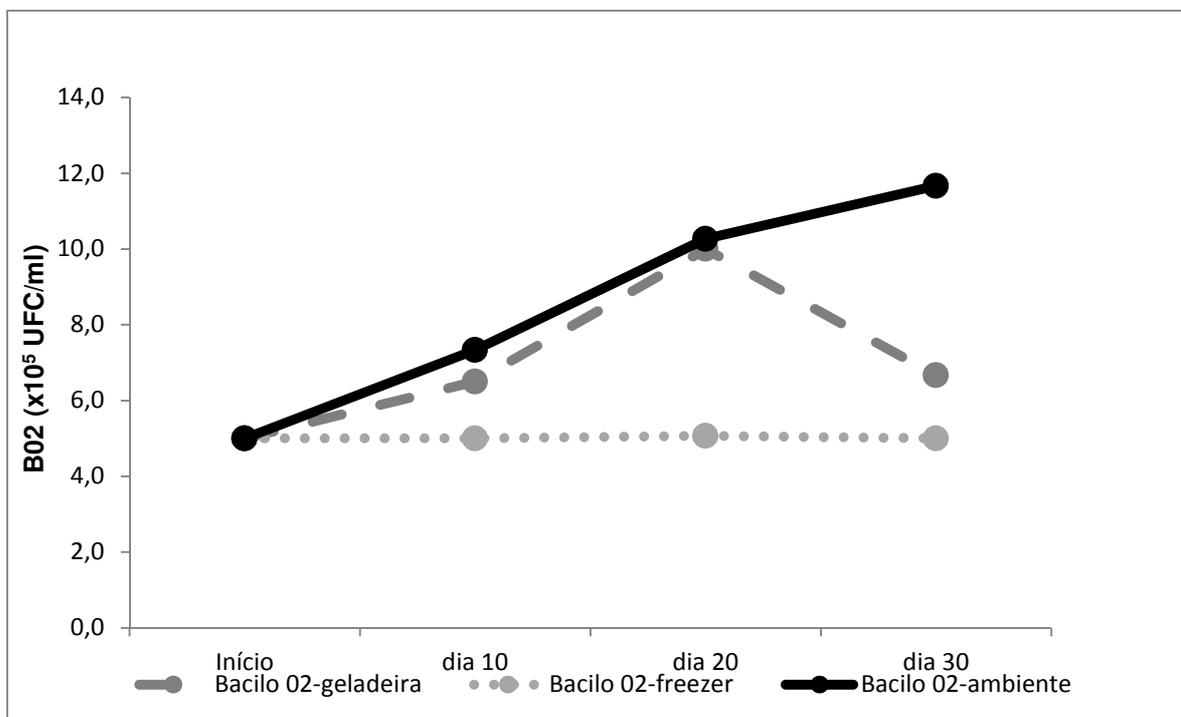


figura 2 - Viabilidade da cepa probiótica B02 adicionada à ração ao longo do tempo, armazenada sob diferentes condições.

Considerando a cepa B03 a contagem inicial do total de colônias na ração também foi de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.  $5 \times 10^5$  UFC/ml,  $5,3 \times 10^5$  UFC/ml e  $5 \times 10^5$  UFC/ml foram os valores aferidos na geladeira para os dias 10, 20 e 30, respectivamente. No freezer os valores para os dias 10, 20 e 30 foram:  $3,2 \times 10^5$  UFC/ml,  $3,6 \times 10^5$  UFC/ml e  $4 \times 10^5$  UFC/ml. Na temperatura ambiente os valores do total de colônias foram:  $6,3 \times 10^5$  UFC/ml,  $4,6 \times 10^5$  UFC/ml e  $5,3 \times 10^5$  UFC/ml para os dias 10, 20 e 30 respectivamente (Figura 3 - Viabilidade da cepa probiótica B03 adicionada à ração ao longo do tempo).

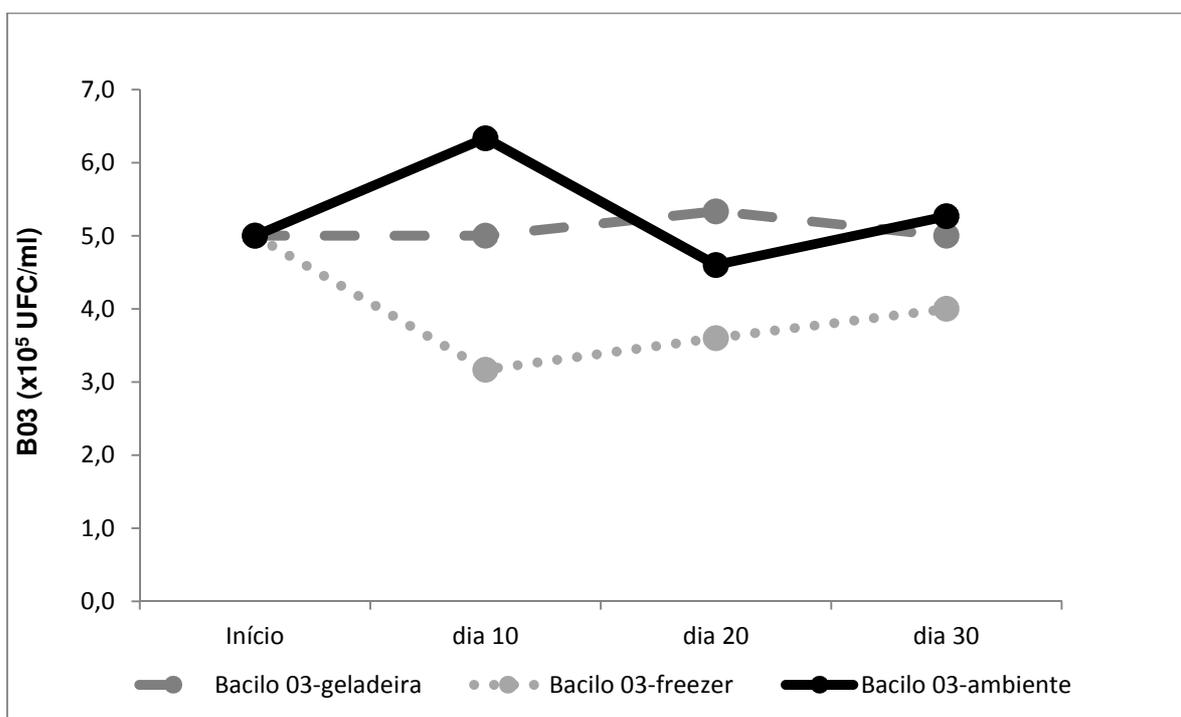


Figura 3 - Viabilidade da cepa probiótica B03 adicionada à ração ao longo do tempo, armazenada sob diferentes condições.

A tabela 3 apresenta os valores médios, após 30 dias, dos totais de colônias para as duas cepas de *Bacillus subtilis* nos três ambientes de armazenamento.

**tabela 3** – valores médios de unidade formadoras de colônias (UFC) da ração, sob diferentes formas de armazenamento, das cepas B02, B03 e CONTROLE. Dados expressos em UFC/ml. Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa.

TRATAMENTO	AMBIENTE	GELADEIRA	FREEZER
CONTROLE	0 a	0 a	0 a
B02	9,8x10 <sup>5</sup> b	7,7x10 <sup>5</sup> b	5x10 <sup>5</sup> b
B03	5,4x10 <sup>5</sup> c	5,1x10 <sup>5</sup> c	3,6x10 <sup>5</sup> b

#### 4. Discussão

O trato gastrointestinal do robalo peva coletado em Regência possui uma população bacteriana, com potencial probiótico, elevada, pois nesse estudo foram isoladas 20 cepas de *Bacillus*. Souza et al. (2010) selecionando bactérias ácido-láticas, com potencial probiótico, a partir do trato gastrointestinal também de Robalo peva alcançou o isolamento de 3 cepas bacterianas.

Na hora da escolha da cepa deve se levar em conta a origem e obtenção da bactéria. Segundo Verschuere et al. 2000 e Fjellheim et al. 2010 não há uma indicação clara que cepas probióticas obtidas a partir do próprio hospedeiro, ou de seu ambiente, tenham um desempenho melhor do que aquelas obtidas a partir de outras origens mas é logicamente razoável procurar por candidatos na própria flora do animal. Balcazar et al. (2006) ressalta que é preferível utilizar cepas autóctones por questões como não patogenicidade ou a habilidade de sobreviver e colonizar o intestino dos animais. Em função destes argumentos optou-se por isolar cepas a partir de porções do trato gastrointestinal do Robalo peva (*Cetropomus parallelus*).

Para que fossem identificadas, as cepas foram testadas in vitro contra patógenos. Nos resultados obtidos todas as cinco cepas exibiram atividade antagônica contra pelos menos três patógenos. Destacam-se as cepas B02 e B03 que exibiram antagonismo contra todos os patógenos. Estudos já realizados vêm demonstrando que o teste de inibição frente a patógenos é considerado um fator de grande importância na seleção de bactérias candidatas a probiótico (Fjellheim et al. 2010). Nesse estudo o mecanismo de inibição não foi verificado, entretanto, outros trabalhos sugerem que tal atividade inibitória ocorre pelo fato de bactérias do gênero *Bacillus* competirem por nutrientes contra outros tipos de bactérias (Moriarty, 1998) ou pelo fato delas produzirem compostos antibacterianos (Balcazar et al, 2006).

Os resultados dos halos de inibição nos testes de antagonismo não mostraram diferenças entre as cepas B02 e B03 quando comparados com o uso de antibióticos comerciais. A única exceção ocorreu no teste contra o patógeno *Pseudomonas monteilii*, onde houve uma diferença, o B02 produziu um halo de inibição menor que o do antibiótico Amicacina. Entretanto, no teste contra o patógeno *Aeromonas hidrofila* esta mesma Amicacina não exibiu halo de inibição enquanto que halos foram percebidos para o B02 e B03 sendo esses maiores, inclusive quando comparado ao antibiótico Eritromicina. Estes resultados sugerem que as cepas B02 e B03 tem efeito probiótico e podem ser uma alternativa ao uso desses antibióticos.

Os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os alcançados em outros estudos disponíveis na literatura. Aly et al. (1998) estudando o efeitos probióticos de *Bacillus subtilis* e *LactoBacillus acidophilus* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) conseguiram obter atividade inibitória do *Bacillus subtilis* contra os patógenos, *Aeromonas hidrophila* e *Pseudomonas fluorescens*. Vaseeharan e Ramasamy (2003) verificaram que *Bacillus subtilis* exibiram grandes

halos de inibição contra *Vibrio harveyi* em camarões-tigre-gigante (*Penaeus monodon*).

Após a identificação foram selecionadas as duas que apresentaram resultados inibitórios contra todos patógenos e os maiores halos de inibição. Assim, as cepas B02 e B03 foram escolhidas para o teste de viabilidade e armazenamento quando adicionadas a uma ração comercial sob diferentes condições.

Apesar do armazenamento em temperatura ambiente ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ) ter elevado a quantidade de bactérias na ração,  $11,7 \times 10^5$  UFC/ml e  $5,3 \times 10^5$  UFC/ml, B02 e B03, respectivamente, ao final do experimento. Todas as formas de armazenamento podem ser consideradas viáveis, pois mantiveram, ao mínimo, estáveis a quantidade de bactérias. Este aumento pode ser explicado pelo fato da temperatura ambiente estar mais próxima daquela considerada ótima para o crescimento do *Bacillus subtilis* ( $40^{\circ}\text{C}$ ) segundo Younis et al. (2010).

Os resultados obtidos com os testes de viabilidade e armazenamento sugerem que as duas cepas podem ser armazenadas em diferentes temperaturas mantendo uma quantidade significativa de UFC (unidades formadoras de colônia) como mostrado na figura 2 - Viabilidade da cepa probiótica B02 adicionada à ração ao longo do tempo e Figura 3 - Viabilidade da cepa probiótica B03 adicionada à ração ao longo do tempo.

Segundo Balcazar et al. (2006) e Vine et al. (2004) o crescimento das bactérias e a capacidade de se manterem viáveis sob diversas formas de armazenamento também devem ser características avaliadas quando da seleção de probióticos. Estas características estão ligadas a questões como: produção em larga escala e análise custo/benefício do probiótico Gomes-Gil et al. (2000).

## **5. Conclusão**

Com base nos resultados obtidos nos testes de antagonismo e no teste de viabilidades em ração, armazenada sob diferentes condições, as cepas B02 e B03 exibiram as propriedades para serem consideradas probióticos, propriedades estas semelhantes a de um produto comercial.

## Referências

- ABUSELIANA, A. F.; DAUD, H. H. M.; AZIZ, S. A.; BEJO, S. K.; ALSAID, M. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis sp.*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 10, p. 914-919, 2011.
- ANDANI, H. R. R.; TUKUMECHI, A.; MESHKINI, S.; SHEIKHZADEH, N., Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 28, p. 1-7, 2012.
- ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *LactoBacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, v.25, p. 128-136, 2008.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M. Y. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 684-700, 2008.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. A review bacterial pathogens of fish. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 58, p. 483-506, 1985.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X-H.; *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 119-124, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies Nativas para a piscicultura no Brasil. 2ª Edição. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, 608p.
- BARROSO, M. V.; CASTRO, J. C.; AOKI, P. C. M.; HELMER, J. L. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o Robalo (*Centropomus parallelus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 2157-2164, 2002.
- BARTON, B. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, v.42, p.517-525, 2002.
- 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.
- CERQUEIRA, V. R.; TSUZUKI, M. Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.35, p. 27-38, 2009.
- CHELOSSI, E.; VEZZULLI, L.; MILANO, A.; BRANZONI, M.; FABIANO, M. RICCARDI, G.; BANAT, I. M. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*, v. 219, p. 83-97, 2003.

DHERT, PH.; LAVENS, P; SORGELOOS, P. A simple test for quality evaluation of cultured fry marine fish. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. v. 57, p. 2135-2141, 1992.

EL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A. E.; SHALABT, A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fish and Shellfish Immunology, v.27, p. 175-180, 2009.

ESPELID, S.; LØKKEN, G. B.; STEIRO, K.; BØGWALD, J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). Fish and Shellfish Immunology, v.6, p. 95-110, 1996.

FAO (FOOD AND AGRICULTURA ORGANIZATION). O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio. Roma:Itália. Disponível em:< [www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

FJELLHEIM, A. J.; KLINKENBERG, G.; SKJERMO, J.; AASEN, I. M.; VADSTEIN, O. Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) larvae. Veterinary Microbiology, v. 144, p. 153-159, 2010.

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

GIRI, S. S.; SEN, S. S.; SUKUMARAN, V. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology, v.32, p. 1135-1140, 2012.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. The Journal of Biological Chemistry, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

KENNEDY, S. B.; TUCKER, JR. J. W.; NEIDIG, C. L.; VERMEER, G. K.; COOPER, V. R.; JARREL, J. L.; SENNET, D. G. Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). Bulletin of Marine Science, v. 62(2), p. 573-588, 1998.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, v. 274, p. 1-14, 2008.

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

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF, 2012. Disponível

em:<[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes e Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Plano safra da pesca e e aquicultura 2012/2013/2014. Brasília, DF, 2012. Disponível em:<[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Planos\\_e\\_Politicas/Plano%20Safr\(Cartilha\).pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Planos_e_Politicas/Plano%20Safr(Cartilha).pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; PRUSTY, A. K.; KUMAR, K.; PRASAD, K. P.; MOHANTA, K. N. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 104, p. 28-37, 2012.

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

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 29, p. 2-14, 2010.

PLUMB, J. A.; HANSON, L. A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3<sup>a</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2011. 492p.

RUIZ, C. M.; ROMÁN, G.; SÁNCHEZ, J.L. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. *Acquaculture International*, v. 4, p. 289-291, 1996.

SANTOS, A. A.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PRAIVA, M. J. T.; JULIANO, Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. *Aquaculture*, v. 296, p. 359-366, 2009.

SOUZA, R. M.; MORINO, L. J.; VIEIRA, M. F.; BUGLIONI, C. C.; ANDREATTA, R. E.; SEIFFERT, Q. W.; CERQUEIRA, R. V. Seleção de bactérias com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo peva (*Centropomus parallelus* Poey 1860). *Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo*, v. 26, p.17-24, 2010.

SUN, Y-Z.; YANG, H-L.; MA, R-L.; LIN, W-Y. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 29, p. 803-809, 2010.

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

TSUZUKI, M. Y.; BERESTINAS, A. C. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, p. 535-541, 2008.

- TUCKER, J. W.; LANDAU, M. P.; FAULKNER, B. E. Culinary value and composition of wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. Florida Scientist, v.48, p. 196-200, 1985.
- VARELA, J. L.; RUIZ-JARABO, I.; VARGAS-CHACOFF, L.; ARIJO, S.; LEÓN-RUBIO, J. M.; GARCÍA-MILLÁN, I. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. Aquaculture, v. 309, p. 265-271, 2010.
- VASEEHARAN, B.; RAMASAMY P. Control of pathogenic *Vibrio spp.* by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology, v. 36, p. 83-87, 2003.
- VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters. v. 231, p. 145-152, 2004.
- WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture, v. 281, p. 1-4, 2008.
- YOUNIS, M. A. M.; HEZAYEN, F. F.; NOUR-ELDEIN, M. A.; SHABEB, M. S. A. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, v. 7, p. 31-37, 2010.
- ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology and Biochemistry, v. 35, p.501-509, 2010.

## CAPÍTULO II

### **O USO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* COMO MITIGADOR DE ESTRESSE POR TRANSPORTE PARA ROBALO PEVA (*Centropomus Parallelus*)**

## RESUMO

JESUS, Elaine Cruz, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014. **O USO DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* COMO MITIGADOR DE ESTRESSE POR TRANSPORTE PARA ROBALO PEVA (*Centropomus Parallelus*)**. Orientador: Professor Dsc. Levy de Carvalho Gomes.

Nesse estudo, dietas enriquecidas com cepas do probiótico autóctone *Bacillus subtilis* B02 e B03, obtidos a partir de porções do trato gastrointestinal de *Centropomus parallelus*, foram avaliadas com relação à tolerância ao estresse provocado por transporte em juvenis. Após o período de aclimação, juvenis de robalo sem sinais clínicos de doenças, foram divididos em tanques e alimentados ou com a dieta controle (sem probiótico) ou com dieta enriquecida com uma das cepas probióticas do B02 e B03 por um período de 30 dias. Parâmetros físico-químicos da água bem como os parâmetros bioquímicos dos animais foram avaliados. A cepa B02 conseguiu reduzir os índices de glicose e lactato em comparados ao tratamento controle. Não houve diferença significativa entre o controle a cepa B03. Com base nos resultados obtidos a cepa B02 foi considerada uma boa candidata a probiótico para o Robalo peva.

Palavras-chave: Autóctone, estresse, e probióticos.

## ABSTRACT

JESUS, Elaine Cruz, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014. **USE OF STRAINS OF THE *Bacillus subtilis* HOW STRESS MITIGATOR FOR TRANSPORT TO FAT SNOOK (*Centropomus Parallelus*)**. Orientador: Professor Dsc. Levy de Carvalho Gomes.

In this study, diets enriched with indigenous strains of probiotic *Bacillus subtilis* B02 and B03, obtained from portions of the gastrointestinal tract *Centropomus parallelus* were evaluated for tolerance to the stress of transport juveniles. After the acclimation period, sea bass juveniles without clinical signs of disease were divided into tanks and fed either a control diet (without probiotics) or a diet supplemented with the probiotic strains B02 and B03 for a period of 30 days. Physico-chemical parameters of water and the biochemical parameters of the animals were evaluated. The B02 strain showed one candidate probiotic.

Keywords: autochthonous, stress, probiotic

## 1. Introdução

Os peixes são considerados uma das mais ricas fontes de proteína de origem animal. Estima-se que cerca de 25% de toda a proteína de origem animal consumida pelos seres humanos sejam obtidas a partir de peixes e mariscos e essa demanda é ainda crescente (Nayak, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que os probióticos podem ser utilizados como mitigadores dos efeitos de estresse nos peixes e isso tem uma aplicabilidade direta nas práticas de aquicultura. Assim os animais poderiam ser tratados com probióticos antes de qualquer situação estressante (Varela et al, 2010).

O desenvolvimento econômico implica na necessidade de aumento nos índices de produtividade nos sistemas de cultivo. Essa maximização é conseguida, muitas vezes, com a utilização de antibióticos já que a intensificação dos sistemas de cultivo expõe os animais a uma série de condições adversas como: estresse e deterioração das condições ambientais (Nayak, 2010).

Segundo Varela et al (2010) alguns estudos demonstram que peixes tratados com probióticos têm um aumento na tolerância às condições estressantes. Mohapatra et al. (2012) afirmaram que apesar de existirem tais estudos essa relação ainda não está totalmente compreendida. Esses efeitos benéficos têm aplicações diretas nas práticas de aquicultura. Antes de operações críticas como transporte, mudanças na temperatura da água, manejo ou qualquer outra condição estressante os peixes poderiam ser tratados com probióticos de forma a se mitigar os efeitos adversos (Varela, 2010).

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos benéficos do fornecimento de uma dieta com o probiótico autóctone (*Bacillus subtilis*) em juvenis de Robalo peva (*Centropomus parallelus*) em relação a sua tolerância ao estresse.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção de animais e aclimação**

Juvenis de robalo peva (72 animais) sem histórico de doenças foram adquiridos de um criador particular e aclimatados por um período de 30 dias em um tanque de 300L no laboratório. A temperatura da água foi mantida em 25°C e salinidade em 15ppt. O fotoperíodo foi controlado com 12 horas de luz. O tanque foi mantido com filtro e areação por 24 horas diárias, sendo sifonado todos os dias. Neste período ocorreu a troca parcial da água, cerca de 70% de seu volume, duas vezes por semana. Os animais foram alimentados com ração comercial Nutriave para peixes carnívoros, com 45% de proteína, duas vezes ao dia.

### **2.2 Delineamento experimental**

Os peixes (n=72, 3,80g±1,25g e 6,26cm±0,78cm) foram divididos em 3 tratamentos: cepa *Bacillus subtilis* 02, cepa *Bacillus subtilis* 03 e controle. Cada tratamento possuía 4 aquários de 25L com 6 animais cada. Os aquários foram mantidos com filtro e areação por 24 horas diárias, sendo sifonado todos os dias. O fotoperíodo foi controlado com 12:12 horas de luz:escuro e ocorreu a troca parcial da água, 70% do seu volume, 03 vezes por semana. Os parâmetros de qualidade da água, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade, PH e também amônia e nitrito, foram monitorados semanalmente. As medições de amônia e nitrito foram realizadas segundo o método Endofenol e N-nafitil, respectivamente (Alpha, 1998).

### **2.3 Preparação da dieta experimental da cepa de *Bacillus subtilis***

Para o preparo da ração foi utilizado ração extrusada para peixe carnívoro com 45% de proteína. Duas cepas de *Bacillus*, isoladas anteriormente do intestino de adultos de Robalo peva, foram cultivadas em caldo BHI (brain heart infusion) e

colocadas em estufa bacteriana pelo período de 48 horas a 37°C para crescimento. Após este período, ambas as cepas foram lidas em um leitor de micro placa (Molecular Devices) e a turbidez dos tubos de cultivo foi ajustado para o valor 0,5 na escala de Mac Farland no intuito de se alcançar o mesmo número de células bacterianas nas duas amostras.

Foi aspergido 10ml de caldo enriquecido com as cepas em 100g de ração. A ração enriquecida foi levada a secagem em estufa a 37°C com circulação por 24 horas. Após este período a ração foi pesada e armazenada em microtubos do tipo Eppendorf e guardado em geladeira. A alimentação dos animais foi realizada duas vezes ao dia com 1% do peso a cada refeição.

## 2.4 Crescimento

Após 30 dias de alimentação, os animais foram pesados e medidos para a avaliação do crescimento. Os valores obtidos permitiram o cálculo dos seguintes índices biométricos:

- Ganho de peso (%) =  $(100 \times (P_f - P_i)) \div P_i$ . Onde  $P_f$  é o peso final e  $P_i$  o peso inicial.
- Taxa de crescimento específico (TCE) =  $((\ln P_f - \ln P_i) \div \Delta t) \times 100$ . Onde  $\ln P_f$  é o logaritmo na base natural do peso final e  $\ln P_i$  é o logaritmo na base natural do peso inicial  $\Delta t$  é a duração do tratamento em dias.
- Conversão alimentar aparente (CAA) =  $(QtRd \times 30) / Gp$ . Onde  $QtRd$  é a quantidade diária de ração fornecida e  $Gp$  é o ganho de peso em gramas.

## 2.5 Teste de tolerância ao estresse

Em uma segunda etapa, os juvenis de robalo peva foram testados para avaliar sua tolerância à situações de estresse. Antes do início do experimento os animais foram submetidos a um jejum de 24 horas. O teste de estresse foi

executado simulando-se uma situação de transporte com duração de 15 horas. De cada tratamento foram escolhidos, aleatoriamente, três tanques para participarem do experimento. No início do experimento os animais (n=6 para cada repetição) dos tanques escolhidos foram transferidos para sacos plásticos de 10L contendo 2L de água, inflado com oxigênio e lacrado. Em intervalos aleatórios de tempo os sacos contendo os animais eram submetidos a choques físicos buscando-se aproximar o experimento às situações reais ocorridas durante um transporte.

## **2.6 Coleta e preparação das amostras**

Os parâmetros de qualidade da água, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade, pH e também amônia e nitrito, foram monitorados após o transporte. Todos os animais foram submetidos à anestesia através da administração de 1 ml/L de eugenol (óleo de cravo da Índia) em um aquário com um litro de água. Amostras do sangue foram colhidas através da punção da veia caudal. Os animais foram sacrificados através de secção cervical. Além do sangue, também foram coletadas amostras do fígado e brânquias. O sangue coletado foi centrifugado à 3000 RPM para ocorrer a separação do plasma. Após estes procedimentos todas as amostras foram transferidas para um freezer e congeladas à -80°C.

## **2.7 Análise de cortisol, lactato, glicose e glicogênio**

Para a análise de cortisol foi retirada uma alíquota de sangue que foi centrifugada para separação do plasma. O teste baseia-se no método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) por competição entre o cortisol e o hormônio-enzima conjugado por um número limitado de anticorpos anticortisol imobilizados. A quantidade de cortisol é inversamente proporcional à quantidade do hormônio-enzima. A leitura dos resultados é realizada em um leitor de microplaca (marca Molecular Devices) onde a absorbância da amostra é considerada. O Coeficiente de variação intraensaio foi de 2,5%.

A avaliação do lactato no plasma baseia-se num método enzimático colorimétrico. O lactato presente na amostra sofre ação da lactato oxidase que na

presença de oxigênio produz alantoína e peróxido de hidrogênio. Este na presença dos reagentes fenólico e 4-aminoantipirina sofre ação da peroxidase produzindo um composto corado que possui absorvância máxima de 540nm. Para essa análise foi utilizado um kit próprio para determinação do lactato (Katal) sendo a leitura realizada em um leitor de microplaca.

Para análise de glicose foi utilizada uma gota de sangue adicionada à tiras próprias em aparelho medidor de glicose digital da marca Accu Check.

Para análise de Glicogênio, foram preparados os reagentes KOH (Hidróxido de Potássio),  $K_2SO_4$  (Sulfato de Potássio), Fenol 4,1% e solução padrão de glicose. A amostra usada nessa técnica foi extraída do fígado. Uma porção de 25 mg foi centrifugada e depois levada a banho Maria. A seguir foi retirada uma alíquota da amostra e adicionado etanol. Essa alíquota foi agitada e logo em seguida adicionada sulfato de potássio. Depois foram preparados os reagentes para dosagem e preparação de curva padrão. Esfriados os tubos em água corrente foi feita a leitura da absorvância em um espectrofotômetro (480 nm).

## **2.8 Avaliação da atividade das enzimas catalase e glutathione-S-transferase**

Para a avaliação enzimática foram utilizadas amostras da brânquia. Estas foram inicialmente descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,6) sendo utilizado a diluição de 10% P/V (peso/volume). Estas amostras homogeneizadas foram centrifugadas por 30 minutos à 1300 RPM na temperatura de 4° C. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

A atividade enzimática da catalase foi avaliada conforme o método proposto por Aebi (1984). Assim, utilizando um tampão TE (Tris 1M; EDTA 1mM) (pH 8,0) a estimativa da atividade da enzima se deu por meio da avaliação contínua do diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pelo período de 1 minuto, utilizando-se um espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm. Assim, 10  $\mu$ l do homogeneizado foram adicionados a 990  $\mu$ l de solução tampão em uma cubeta. A reação foi iniciada a partir da adição do peróxido de hidrogênio.

A avaliação da atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi calculada a partir da quantidade do produto resultante da união da glutathiona reduzida (GSH) com o CDNB (1-Cloro 2,4-Dinitrobenzeno). 100 µl da amostra homogeneizada foi diluída e 200µl da solução de reação que continha CDNB 60mM, GSH 10mM e tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0. A atividade enzimática foi determinada através de um leitor de placa com comprimento de onda de 340nm com leituras em intervalos de 15 segundos pelo tempo total de 180 segundos segundo o protocolo de Habig et al.(1974).

## **2.9 Estatísticas**

Os dados obtidos foram estatisticamente analisados contra o tratamento controle através de uma ANOVA e teste de Bonferroni. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas diferentes quando ( $P < 0,05$ ). Quando as amostras falharam em teste de normalidade foram transformadas para  $\log_{10}$ . Caso ainda as distribuições não se apresentassem normalizadas foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis) também com significância quando  $P < 0,05$ . Todos os cálculos foram executados com o software SigmaStat 3.5.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Experimento 1 - Crescimento**

Foram realizadas ao todo cinco medições dos parâmetros de qualidade da água. A primeira medição ocorreu no início do período de crescimento e as outras em intervalos de sete dias. A tabela 4 – sumariza a média dos valores obtidos em todas as medições. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos.

**tabela 4** – Parâmetros de qualidade da água ao longo do período de crescimento de robalo peva alimentado com diferentes probióticos na ração. Dados expressos na forma média  $\pm$  desvio padrão

Parâmetros da água	CONTROLE	B02	B03
pH	7,84 $\pm$ 0,16	7,82 $\pm$ 0,11	7,84 $\pm$ 0,09
Salinidade (ppt)	14,79 $\pm$ 0,67	14,92 $\pm$ 0,5	14,85 $\pm$ 0,56
Condutividade (mS/cm)	24,65 $\pm$ 0,88	24,68 $\pm$ 0,79	24,7 $\pm$ 0,95
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	24,9 $\pm$ 0,56	24,81 $\pm$ 0,59	24,78 $\pm$ 0,59
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	8,4 $\pm$ 0,72	8,63 $\pm$ 0,47	8,67 $\pm$ 0,36
Amônia (mg/L)	0,12 $\pm$ 0,07	0,13 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,08
Nitrito(mg/L)	0,06 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,04

Nenhuma mortalidade ou sinais clínicos de doença foram observados em qualquer um dos grupos durante os dias do experimento. A tabela 5 – índices biométricos. Onde PM<sub>f</sub> peso médio final, CM<sub>f</sub> comprimento médio final, GP ganho de peso, TCE taxa de crescimento específica e CAA conversão alimentar aparente. PM<sub>f</sub>, CM<sub>f</sub>, TCE e CAA expresso no formato média  $\pm$  desvio padrão. Dados de GP expressos em média. mostra os valores médios obtidos, ao final do experimento, dos índices biométricos avaliados. Embora os peixes tratados com os dois *Bacillus* tenham peso e comprimentos finais maiores que o controle, essa diferença não foi significativa.

**tabela 5** – índices biométricos. Onde PM<sub>f</sub> peso médio final, CM<sub>f</sub> comprimento médio final, GP ganho de peso, TCE taxa de crescimento específica e CAA conversão alimentar aparente. PM<sub>f</sub>, CM<sub>f</sub>, TCE e CAA expresso no formato média  $\pm$  desvio padrão. Dados de GP expressos em média.

Tratamentos	PM <sub>f</sub> (g)	CM <sub>f</sub> (cm)	GP (%)	TCE <sub>(g)</sub>	CAA <sub>(g)</sub>
CONTROLE	4,50 $\pm$ 0,94	8,62 $\pm$ 0,58	15,84	0,50 $\pm$ 0,20	4,24 $\pm$ 1,75
B02	4,55 $\pm$ 1,23	8,63 $\pm$ 0,72	21,14	0,64 $\pm$ 0,17	3,01 $\pm$ 0,88
B03	4,66 $\pm$ 1,16	8,54 $\pm$ 0,74	23,75	0,71 $\pm$ 0,21	2,73 $\pm$ 0,94

Além da capacidade inibitória frente à patógenos outras características são igualmente desejáveis nas bactérias candidatas à probiótico, como por exemplo, a capacidade de aderir a mucosa do trato gastrointestinal do hospedeiro (Vine et al. 2004). A contagem ao fim do tratamento mostrou que as cepas probióticas de *Bacillus subtilis* se aderiram e colonizaram o trato gastrointestinal dos juvenis de Robalo peva. Os valores aferidos estão demonstrados na tabela 6 – não havendo uma diferença significativa (P=0,584) entre os tratamentos com cepas B02 e B03 para o para a contagem do *Bacillus subtilis* que também não foi isolada do tratamento controle.

**tabela 6** – Contagem da microbiota do intestino dos juvenis de Robalo peva após 30 dias de alimentação com ração contendo diferentes cepas de *Bacillus subtilis*. Dados expressos em UFC/ml  $\times 10^4$  na forma média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam tratamentos com diferença estatística.

TRATAMENTO	Gram +	Gram -	<i>Bacillus subtilis</i>
CONTROLE	0,43 $\pm$ 0,49a	0,95 $\pm$ 0,89	0 $\pm$ 0a
B02	13,25 $\pm$ 3,01b	2,75 $\pm$ 1,98	8,64 $\pm$ 1,35b
B03	12,50 $\pm$ 5,09b	2,48 $\pm$ 1,59	9,3 $\pm$ 3,39b

### 3.2 Experimento 2 - Transporte

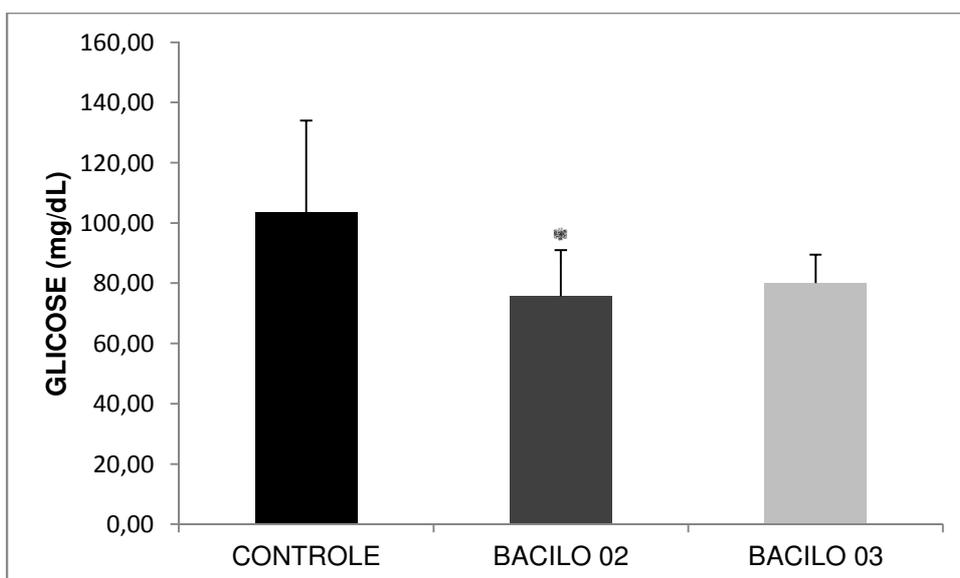
Nenhuma mortalidade ou sinais de distúrbios na saúde dos peixes foram observados após o transporte.

Uma medição na água dos sacos plásticos dos peixes que participaram do transporte onde também nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos. Conforme dados expressos na tabela 7- Valores de amônia e nitrito da água dos peixes do teste de estresse. Dados expressos na forma média  $\pm$  desvio padrão

**tabela 7-** Valores de amônia e nitrito da água dos peixes do teste de estresse. Dados expressos na forma média  $\pm$  desvio padrão

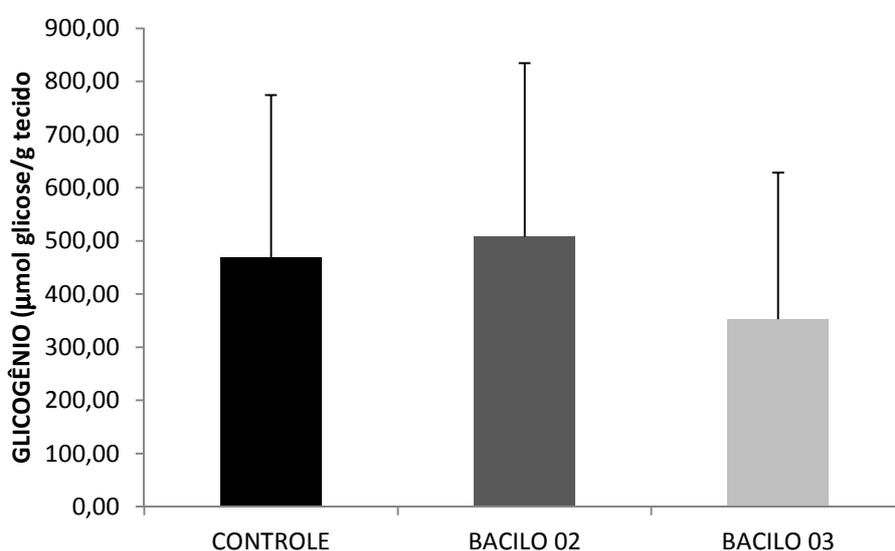
Parâmetros	CONTROLE	B02	B03
Salinidade (ppt)	6,37 $\pm$ 0,02	6,35 $\pm$ 0,18	6,49 $\pm$ 0,06
Condutividade (mS/cm)	14,86 $\pm$ 0,15	14,8 $\pm$ 0,1	14,83 $\pm$ 0,2
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	25,16 $\pm$ 0,35	24,96 $\pm$ 0,19	25,09 $\pm$ 0,39
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	26,46 $\pm$ 0,11	26 $\pm$ 0,45	26,4 $\pm$ 0,2
Amônia (mg/L)	1,26 $\pm$ 0,532	1,39 $\pm$ 0,203	1,20 $\pm$ 0,19
Nitrito (mg/L)	0,057 $\pm$ 0,005	0,02 $\pm$ 0,10	0,051 $\pm$ 0,40

Os valores (média  $\pm$  desvio padrão em mg/dL) observados para a glicose entre os peixes que participaram do teste de estresse foram: 103,33 $\pm$ 30,65, 75,75 $\pm$ 15,30 e 80,00 $\pm$ 9,51 para os tratamentos controle, B02 e B03 respectivamente. Resultados significativos foram observados entre o tratamento controle e B02 (P=0,022).



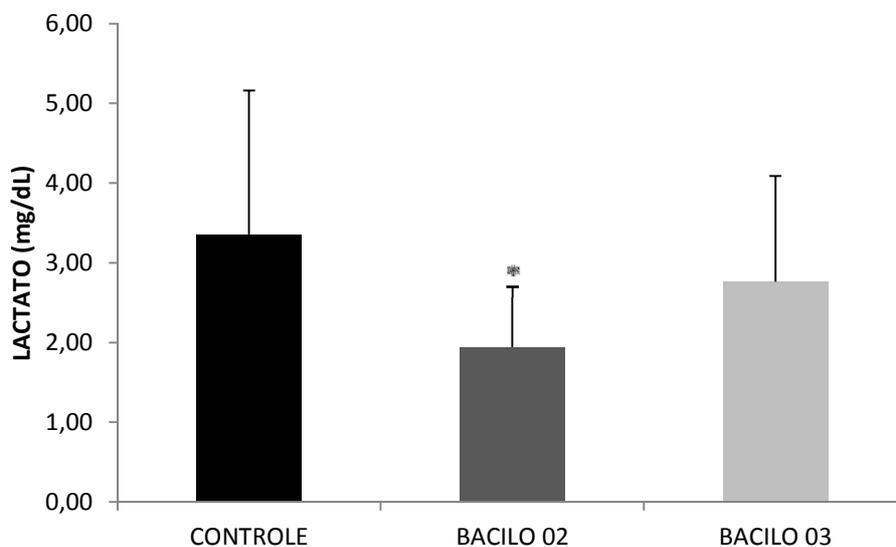
**figura 4** – Valores de glicose em robalo peva submetido ao transporte após 30 dias de alimentação com diferentes cepas de *Bacillus subtilis*. \* Indica diferença significativa do controle.

Os valores aferidos de glicogênio (média±desvio padrão em  $\mu\text{mol/glicose/tecido}$ ) observado entre os peixes que participaram do teste de transporte foram  $468,4 \pm 305,98$ ,  $507,73 \pm 326,6$  e  $352,43 \pm 275,75$ , respectivamente, para os tratamentos controle, B02 e B03. Não havendo diferença significativa entre os tratamentos ( $P=0,207$ ).



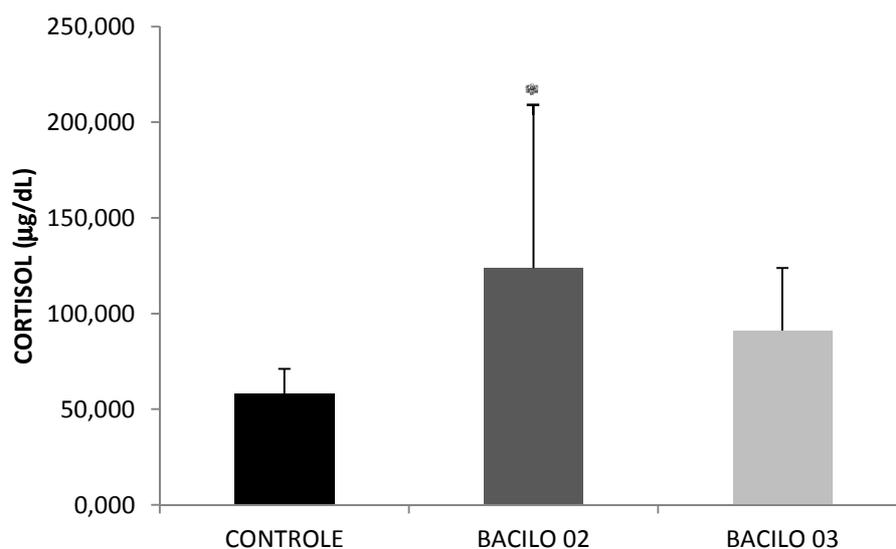
**Figura 5** - Valores observados para o glicogênio entre os peixes que participaram do teste de estresse. Análise estatística realizada com dados transformados para  $\log_{10}$  para normalização dos dados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Para o lactato os valores (média±desvio padrão em mg/dL) foram  $3,34 \pm 1,81$ ,  $1,94 \pm 0,76$  e  $2,76 \pm 1,32$  para o controle, B02 e B03 respectivamente. Havendo diferença significativa ( $P=0,047$ ) entre os tratamentos controle e B02.



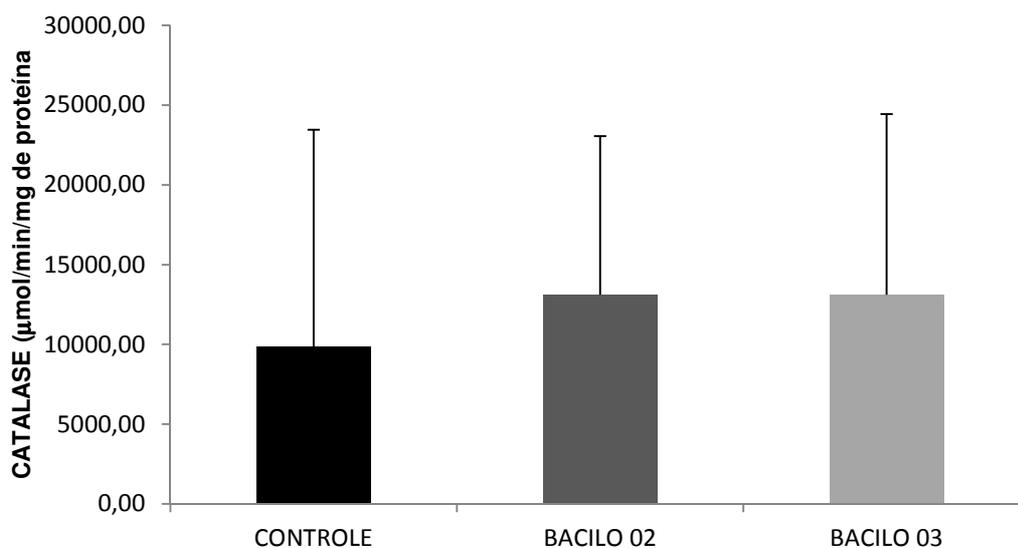
**Figura 6** - Valores observados para o lactato entre os peixes que participaram do teste de estresse. Análise estatística realizada com dados transformados para  $\log_{10}$  para normalização dos dados. O \* Indica diferença significativa do controle.

Os valores do cortisol (média±desvio padrão em  $\mu\text{g/dL}$ ) obtidos foram  $57,79 \pm 13,09$ ,  $123,72 \pm 85,39$  e  $91,20 \pm 32,54$  para os tratamentos controle, B02 e B03 respectivamente. Havendo diferença significativa entre os tratamentos ( $P=0,02$ ) controle e B02.

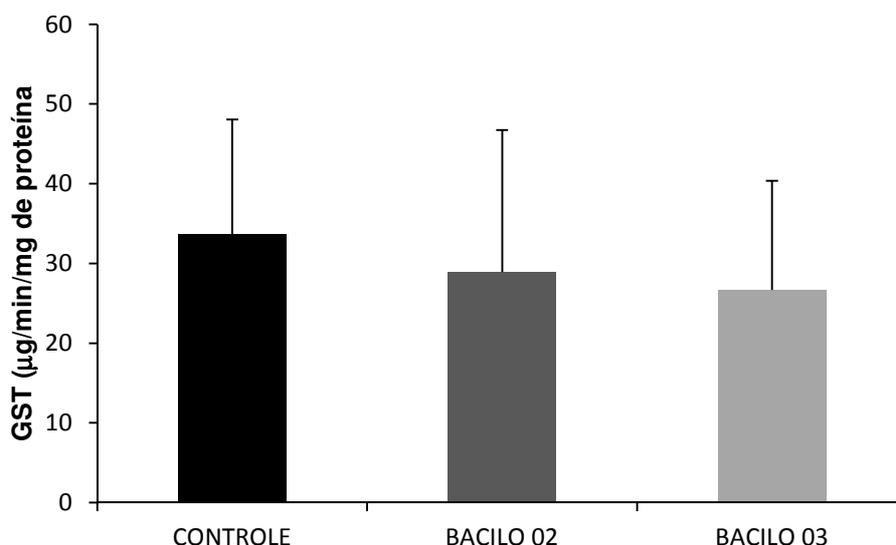


**Figura 7** - Valores observados para cortisol entre os peixes que participaram do teste de estresse. Análise estatística realizada com dados transformados para  $\log_{10}$  para normalização dos dados. O \* Indica diferença significativa do controle.

Os valores para catalase (média±desvio padrão em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína) e GST (média±desvio padrão em  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína) também foram medidos após o transporte. Os valores da catalase foram  $9845,13 \pm 13603,74$  (Controle),  $13104,23 \pm 9953,37$  (B02) e  $13117,18 \pm 11318,41$  (B03). Para o GST os valores aferidos foram  $33,65 \pm 14,41$  (Controle),  $28,90 \pm 17,84$  (B02) e  $26,67 \pm 13,70$  (B03). Não havendo diferença significativa entre os tratamentos tanto para a catalase ( $P=0,197$ ) como para o GST ( $P=0,236$ ).



**figura 8** - Valores observados para a catalase entre os peixes que participaram do teste de estresse. Análise estatística realizada com dados transformados para  $\log_{10}$  para normalização dos dados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.



**Figura 9** - Valores medidos para GST entre os peixes que participaram do teste de estresse. Análise estatística realizada com dados transformados para  $\log_{10}$  para normalização dos dados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

#### 4. DISCUSSÃO

Apesar dos animais alimentados com as cepas terem obtido um ganho de peso maior que os animais controle, não foram encontradas diferenças significativas nos índices biométricos ( $P > 0,05$ ). Segundo Dhert et al. (1992) dados biométricos são geralmente utilizados para se quantificar o sucesso do cultivo de peixes, entretanto, crescimento e ganho de peso são processos lentos que necessitam de períodos maiores de alimentação para que se obtenha diferenças significativas. Varela et al. (2010), por exemplo, conseguiu obter diferença estatisticamente significativa para o peso de dourada (*Sparus aurata*) a partir do 64 dia do experimento fornecendo alimento enriquecido com probiótico. Assim o período de 30 dias de tratamento, utilizado no estudo, pode não ter sido suficiente para que fossem obtidas diferenças significativas nos índices biométricos, apesar dos resultados indicarem uma tendência de melhores índices nos animais alimentados com as cepas probióticas.

Segundo Nayak (2010) vários fatores influenciam a adesão o estabelecimento e ação do probiótico no intestino dos peixes. Podendo-se citar, por exemplo, a temperatura, pH e o oxigênio dissolvido da água. Ainda segundo Nayak (2010) os probióticos podem agir como decompositores de matéria orgânica além de atuarem

no controle de amônia e nitrito. Apesar de ter havido uma diminuição nos valores de amônia e nitrito, não foram identificadas diferenças significativas entre os tratamentos ao fim do experimento bem como no teste de tolerância ao estresse ( $P>0,05$ ). Varela et al. (2010), administrando o probiótico PDP11 (cepa da família *Alteromonadaceae*) em *Sparus aurata*, também não encontraram diferenças significativas nos parâmetros de nitrito e amônia. O mesmo ocorreu com Liu et al. (2010) administrando cepas de *Bacillus subtilis* em larvas de camarões branco (*Litopenaeus vannamei*).

Além da atividade inibitória frente a patógenos outras características são igualmente desejáveis nas cepas candidatas a probióticos. Vine et al. (2004) e Souza (2007) destacam que a capacidade de adesão ao trato gastrointestinal e sua consequente colonização devem ser analisadas quando da seleção de cepas probióticas. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as duas cepas de *Bacillus subtilis* foram capazes de se aderirem ao intestino e manterem-se viáveis durante o período do tratamento. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os obtidos por Souza et al. (2010) que verificou a colonização do trato gastrointestinal de juvenis de Robalo peva por bactérias ácido-lático.

Alguns estudos tem demonstrado que peixes tratados com probióticos tiveram um aumento no nível de tolerância ao estresse Varela et al. (2010) e Mohapatra et al. (2012). Neste trabalho foram medidos os níveis de cortisol, glicose, glicogênio, lactato, catalase e GST de peixes alimentados previamente com as cepas probióticas de *Bacillus subtilis* contra uma dieta controle sem as cepas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para o glicogênio, catalase e GST ( $P>0,05$ ).

Os resultados alcançados demonstram que houve uma diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os níveis de glicose e lactato dos peixes que participaram do transporte, entre os tratamentos B02 e controle, os valores foram menores no tratamento B02. Níveis de glicose e lactato no sangue são considerados bons indicadores de estresse nos peixes estando relacionados a respostas secundárias (Varela et al. 2010) e (Barton, 2002). Os valores de glicose são incrementados em situações de estresse no sentido de se cobrir a necessidade energética extra (Varela et al. 2010). O aumento do lactato está ligado a questões de fadiga muscular (Barton, 2002). Os resultados obtidos sugerem que a cepa probiótica B02 pode ter elevado a capacidade de absorção alimentar aumentado assim a quantidade de

energia disponível ao animal contribuindo para o não aumento dos índices de glicose e lactato.

Os dados obtidos na medição dos índices de cortisol demonstram que houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis desse hormônio entre os tratamentos B02 e controle. O nível de cortisol foi maior no tratamento B02. Diferenças significativas não foram encontradas entre o tratamento e B03. O índice de cortisol é também considerado um dos principais indicadores de estresse em peixes (Barton, 2002) e está associado a respostas primárias. Após a exposição ao estresse o eixo hipotalâmico-pituitária-interrenal (HPI), dos peixes, controla a liberação do cortisol. Com a liberação de hormônio liberador da corticotropina (CRH) ocorre a estimulação da glândula pituitária levando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que é o principal estimulador da produção do cortisol (Mommsen et al. 1999).

Os resultados obtidos sugerem que as cepas de *Bacillus subtilis* não diminuiram o efeito sobre esse parâmetro, durante o período de tratamento. Em alguns casos a intensidade das respostas ao estresse pode ser influenciada por diversos fatores como: genéticos e ambientais. Assim o grau apurado em um indicador de estresse pode não ser refletido na mesma ordem em outros indicadores. Também segundo Barton (2002) a resposta ao estresse é um processo dinâmico e medição fisiológica é uma representação de um dado instantâneo no tempo no decorrer desse processo. Ainda segundo Barton (2002), apenas a medida do nível de cortisol pode não refletir o nível de estresse do peixe.

Como não houve diferença significativa entre os níveis de glicogênio, catalase e GST isso sugere que as cepas de *Bacillus subtilis* no período de 30 dias do tratamento não foi suficiente para melhorar essas respostas sobre esses parâmetros.

## **Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos a cepa B02 é uma candidata a probiótico para *Centropomus parallelus*.

## Referências

- ABUSELIANA, A. F.; DAUD, H. H. M.; AZIZ, S. A.; BEJO, S. K.; ALSAID, M. Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis sp.*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 10, p. 914-919, 2011.
- ANDANI, H. R. R.; TUKUMECHI, A.; MESHKINI, S.; SHEIKHZADEH, N., Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 28, p. 1-7, 2012.
- ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *LactoBacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, v.25, p. 128-136, 2008.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M. Y. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 684-700, 2008.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. A review bacterial pathogens of fish. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 58, p. 483-506, 1985.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X-H.; *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, v. 43, p. 119-124, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies Nativas para a piscicultura no Brasil. 2ª Edição. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, 608p.
- BARROSO, M. V.; CASTRO, J. C.; AOKI, P. C. M.; HELMER, J. L. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o Robalo (*Centropomus parallelus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 2157-2164, 2002.
- BARTON, B. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, v.42, p.517-525, 2002.
- 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.

CERQUEIRA, V. R.; TSUZUKI, M. Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.35, p. 27-38, 2009.

CHELOSSI, E.; VEZZULLI, L.; MILANO, A.; BRANZONI, M.; FABIANO, M. RICCARDI, G.; BANAT, I. M, Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*, v. 219, p. 83-97, 2003.

DHERT, PH.; LAVENS, P; SORGELOOS, P. A simple test for quality evaluation of cultured fry marine fish. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. v. 57, p. 2135-2141, 1992.

EL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A. E.; SHALABT, A. M. E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Fish and Shellfish Immunology*, v.27, p. 175-180, 2009.

ESPELID, S.; LØKKEN, G. B.; STEIRO, K.; BØGWALD, J. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). *Fish and Shellfish Immunology*, v.6, p. 95-110, 1996.

FAO (FOOD AND AGRICULTURA ORGANIZATION). O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio. Roma:Itália. Disponível em:<[www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

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

GIRI, S. S.; SEN, S. S.; SUKUMARAN, V. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.32, p. 1135-1140, 2012.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

KENNEDY, S. B.; TUCKER, JR. J. W.; NEIDIG, C. L.; VERMEER, G. K.; COOPER, V. R.; JARREL, J. L.; SENNET, D. G. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bullet of Marine Science*, v. 62(2), p. 573-588, 1998.

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

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF, 2012. Disponível

em:<[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes e Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Plano safra da pesca e e aquicultura 2012/2013/2014. Brasília, DF, 2012. Disponível em:<[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Planos\\_e\\_Politicas/Plano%20Safra\(Cartilha\).pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Planos_e_Politicas/Plano%20Safra(Cartilha).pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2013.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; PRUSTY, A. K.; KUMAR, K.; PRASAD, K. P.; MOHANTA, K. N. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 104, p. 28-37, 2012.

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

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology, v. 29, p. 2-14, 2010.

PLUMB, J. A.; HANSON, L. A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3<sup>a</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2011. 492p.

RUIZ, C. M.; ROMÁN, G.; SÁNCHEZ, J.L. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. Aquaculture International, v. 4, p. 289-291, 1996.

SANTOS, A. A.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PRAIVA, M. J. T.; JULIANO, Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. Aquaculture, v. 296, p. 359-366, 2009.

SOUZA, R. M.; Influência da aplicação de bactéria ácido láctica na dieta sobre cultivo de juvenis de Robalo peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). Florianópolis, SC: UFSC, 2007. 42 p. Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Programa de pós-graduação em aquicultura – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

SUN, Y-Z.; YANG, H-L.; MA, R-L.; LIN, W-Y. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology, v. 29, p. 803-809, 2010.

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

TSUZUKI, M. Y.; BERESTINAS, A. C. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. Boletim do Instituto de Pesca, v. 34, p. 535-541, 2008.

TUCKER, J. W.; LANDAU, M. P.; FAULKNER, B. E. Culinary value and composition of wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. Florida Scientist, v.48, p. 196-200, 1985.

VARELA, J. L.; RUIZ-JARABO, I.; VARGAS-CHACOFF, L.; ARIJO, S.; LEÓN-RUBIO, J. M.; GARCÍA-MILLÁN, I. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. Aquaculture, v. 309, p. 265-271, 2010.

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

VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, E. A.; SOARES.; SILVA, B. C.; SIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L.; VINATEA, L. A. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 48, p-998-1009, 2013.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters. v. 231, p. 145-152, 2004.

WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. Aquaculture, v. 281, p. 1-4, 2008.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, v. 274, p. 1-14, 2008.

ZHOU, X.; TIAN, Z.; WANG, Y. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology and Biochemistry, v. 35, p.501-509, 2010.

# ANEXOS

## NORMAS PARA ELABORAÇÃO DO ARTIGO

### Diretrizes para Autores

#### Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

#### Análise dos artigos

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

#### Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

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

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

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

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em "incluir autor" para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

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

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

"Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a publicação na revista PAB.

### **Como fazer:**

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

### **Organização do Artigo Científico**

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

### **Título**

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".

- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

### **Nomes dos autores**

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

### **Endereço dos autores**

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

### **Resumo**

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.

- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### **Termos para indexação**

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

- Não devem conter palavras que componham o título.

- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

### **Introdução**

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

### **Material e Métodos**

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.

- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

### **Resultados e Discussão**

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

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

### **Agradecimentos**

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

### **Referências**

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

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

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

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

- Artigos de periódicos

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

- Capítulos de livros

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

- Livros

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

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

### Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

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

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

### **Tabelas**

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

## **Figuras**

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

### **Notas Científicas**

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

#### Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

### **Outras informações**

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

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

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF