

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS *Shewanella* sp. DO  
CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**

**ROGÉRIO WILLIAM SANTOS PORTELA**

**Recife, 2014**

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS *Shewanella* sp. DO  
CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**

**ROGÉRIO WILLIAM SANTOS PORTELA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra**

**Co-orientadores:**  
**Dr. José de Paula Oliveira**

**Recife, fevereiro de 2014**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Portela, Rogério William Santos**

**Isolamento e caracterização de cepas *Shewanella* sp. Do cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)/ Rogério William Santos Portela– Recife: O Autor, 2014.**

**95 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Ranilson de Souza Bezerra**

**Coorientador: José de Paula Oliveira**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2014.**

**Inclui bibliografia, anexos e apêndices**

- 1. Bactérias gram-negativas 2. Camarão I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Oliveira, José de Paula (coorientador) III. Título**

**579.33**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2015-146**

# **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS *Shewanella* sp. DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**

**ROGÉRIO WILLIAM SANTOS PORTELA**

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

Data da Aprovação: 20/02/2014

## **BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helane Costa (Membro Interno ã Suplente)**  
**Departamento de Bioquímica ã CCB ã UFPE**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto (Membro Externo ã Titular)**  
**Departamento de Bioquímica ã CCB ã UFPPE**

## DEDICATÓRIA

*Toda satisfação a Deus por minha vida e saúde. Além de belas oportunidades para desfrutar, da melhor forma, o milagre da vida...*

*...Toda reverência aos meus pais e familiares, responsáveis pela formação do meu caráter. A eles devo meu amor e vida...*

*...Ao meu grande amor, amigos, orientadores, colegas de laboratório e pessoas de transitam nossas vidas, toda amizade, respeito e agradecimento...*

*...A todos que tornam a vida mais difícil e muitas vezes dolorida, que Deus vos abençoe.*

*Amo todos vocês!*

## AGRADECIMENTOS

- A RECARCINA (Rede de Carcinicultura Nacional), FINEP e CAPES por todo o investimento;
- Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, por toda infraestrutura necessária ao desenvolvimento do trabalho. Especialmente aos laboratórios Biologia do Solo e Genoma;
- A Universidade Federal de Pernambuco especialmente à Pós-Graduação em Ciências Biológicas por todo conhecimento e enriquecimento humano;
- Aos orientadores e Responsáveis Dr. Ranilson de Souza Bezerra, Dra Márcia Vanusa, Dr. José de Paula, Dr Lorinaldo Cavalcante, Dra Márcia Barreto e Dra Tatiana Porto por todo apoio, compreensão e incentivo ao desenvolvimento deste trabalho;
- Aos Integrantes do laboratório Biologia do Solo e especialmente Carolina Kropniczkie Arthur Lira Gabriel pilar deste trabalho, Vanilda por sua intercessão amigável, Dra Márcia Barreto pelos conselhos, a Rosa pelo apoio;
- Também ao Sr. Junior por todo o auxílio com materiais do laboratório, a Alessandra, Maria do Carmo e todos os outros pertencentes ao laboratório Biologia do Solo;
- Aos integrantes do laboratório Genoma especialmente Dra Luísa, Dra Adália, Dra Cacau e Dr. Amaro por todo apoio no decorrer do trabalho e conselho sempre pertinentes;
- Também a Carol, Túlio e Jadson sempre presentes. Finalmente todos os demais integrantes do laboratório meu muito obrigado.

*óNão existe um caminho para a felicidade. A  
felicidade é o Caminhoô.*

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

O gênero *Shewanella* é um representante da classe das *Gammaproteobactérias*, família *Shewanellaceae*, compondo um grupo de bactérias gram-negativas, móveis, baciliforme, oxidase positiva, comumente encontrada em ambiente marinho e isolada do trato digestivo de animais aquáticos. Devido a suas características vem sendo amplamente testado como probiótico na carcinicultura. Estes têm sido utilizados na aquicultura para o controle biológico, aumento da taxa de conversão alimentar e sistema imune dos camarões. Este estudo teve por objetivo identificar potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas e estômago do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracteriza-las através de análises morfológicas, bioquímicas, produção de biofilme e antibiograma. A partir do cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei*, foram selecionadas as cepas IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252 para identificação através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparados ao GenBank e NCBI e RDP - Seqmatch. As cepas foram alinhadas a 45 espécies do gênero *Shewanella* e avaliadas filogeneticamente utilizando os métodos Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Quanto às análises morfológicas foram avaliadas parâmetros de acordo com a similaridade a padrões estabelecidos. Os testes bioquímicos foram realizados com o auxílio dos kits BACTRAY I, BACTRAY II e BACTRAY III (Labroclin®), totalizando 30 testes bioquímicos. A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo Christensen e colaboradores. No antibiograma as cepas bacterianas foram submetidas a 13 antibióticos distintos segundo a técnica de Kirby e Bauer, com três repetições. O sequenciamento das cepas revelou alta similaridade a espécie *Shewanella algae*, utilizando o GenBank e o RDP-seqmath. A Inferência Bayesiana apresentou maior aporte estatístico e fidelidade dentre os métodos analisados. A *Shewanella upenei* apresentou alta similaridade as cepas estudadas, assim como a *S. algae*. As análises filogenéticas não descartam a hipótese de novas espécies para IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252. As cepas estudadas foram sensíveis aos antibióticos Ampicilina/Subactan, Ofloxacina e Tetraciclina. A caracterização fenotípica fortalece a hipótese de especiação para as cepas testadas. Portanto, a capacidade de formação de biofilme, adicionada ao alto potencial enzimático e antagonismo a patógenos, característico do gênero *Shewanella*, tornam estas cepas potenciais probióticos para carcinicultura.

**Palavras-chave:** carcinicultura; sistema heterotrófico, bactérias probióticas, *Shewanella algae*, 16S rRNA.

## ABSTRACT

The genus *Shewanella* is one representant of *Gammoproteobacteria* class, family *Shewanellaceae*, being part of gram-negative bacteria group, mobile, bacilliform, oxidase-positive, commonly found on marine environments and isolated from the digestive tract of aquatic animals. Due to its characteristics, some tests as probiotics are being carried out in carciniculture. They are being used on aquaculture for biological control, augmentations on feed conversion rates and immune system of shrimps. This study has as objective identify potentials probiotics bacteria found in the hepatopancreas and stomach of shrimps cultivated on heterotrophic based system, evaluating the strain phylogenetic relationships with *Shewanella* genus and characterizing them through morphological and biochemical analysis, biofilm production and antibiogram. The strains IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252 were selected from the heterotrophic cultivation of *Litopenaeus vannamei*, identified through partial 16S rRNA sequencing and compared to *GenBank* ñ NCBI and RDP - *Seqmatch*. The strains were aligned to 45 species of *Shewanella* genus and phylogenetically evaluated using Neighbor-Joining, Maximum-Likelihood estimation and Bayesian Inference. Regarding the morphological analysis parameters were evaluated according with established standard similarities. The biochemical tests were conducted with the assistance of BACTRAY I, BACTRAY II and BACTRAY III (Labroclin®) kits, totalizing 30 biochemical tests. The Biofilm capacity evaluation was made according Christensen et al. Regarding the antibiogram, the bacterial strains had undergone 13 distinct antibiotics according Kirby and Bauer, with three repetitions. The strains sequencing showed high similarity to *Shewanella algae* species, using GenBank and RDP-seqmath. The Bayesian inference displayed higher statistic contribution e fidelity among the other methods. The *Shewanella upenei* showed high similarity to the strains in study also as *Shewanella algae*. The phylogenetic analysis does not exclude the hypothesis of IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252 being new species. The strains studied were sensitives to the antibiotics Ampicillin/Sulbactam, Ofloxacin, Tetracyclin. The phenotypic characterization of the strains supports the hypothesis of speciation. Thus, the capacity of biofilm formation plus the high enzymatic potential and antagonism interactions to pathogens, characteristics found in the *Shewanella* genus, make these strains potential probiotics to carciniculture.

**Keywords:** carciniculture, heterotrophic system, probiotic bacteria, *Shewanella algae*, 16S rRNA.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Evolução da Carcinicultura Brasileira:1997 a 2012 .....5

**Figura 2.** Camarão Branco *Litopenaeus vannamei* .....6

### 5. ARTIGO: Identificação e caracterização de cepas *Shewanella algae* isoladas no cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931)

**Figura 1.** Agrupamento por Neighbor-Joining .....61

**Figura 2.** Árvore Filogenética Máxima Verossimilhança.....61

**Figura 3.** Árvore Filogenética Construída pelo Método Inferência Bayesiana (KHI-INV).64

## LISTA DE TABELAS

### 5. ARTIGO: Identificação e caracterização de cepas *Shewanella algae* isoladas no cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei* (boone, 1931)

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Morfologia das Cepas Bacterianas analisadas.....                          | 56 |
| <b>Tabela 2.</b> Caracterização Bioquímica .....                                           | 57 |
| <b>Tabela 3.</b> Antibiograma das Cepas estudadas .....                                    | 58 |
| <b>Tabela 4.</b> Análise das Sequências e Identificação Através do NCBI/GenBank e RDP..... | 60 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|                  |                                               |
|------------------|-----------------------------------------------|
| ABCC             | Associação Brasileira de criadores de camarão |
| ACE              | Teste da Acetamida                            |
| ADH              | Teste da Arginina Desidrogenase               |
| ADO              | Teste do Adonitol                             |
| AM               | Agar Marinho                                  |
| ARA              | Tested a Arabinose                            |
| ARG              | Tested da Arginina Desidrogenase              |
| BLAST            | Basic Local Alignment Search Tool             |
| CET              | Teste da Cetrimida                            |
| CIT              | Teste do Citrato Desidrogenase                |
| CTL              | Teste da Arginina                             |
| dNTP             | Desoxirribonucleotídeo trifosfato             |
| DDBJ             | DNA Data Bank of Japan                        |
| DO               | Densidade Óptica                              |
| EBI              | European Bioinformatics Institute             |
| EDTA             | Ácido etilenodiamino tetra-acético            |
| ESC              | Teste da Esculina                             |
| FAO              | Food and Agriculture Organization             |
| fD1              | Primer forward do gene 16S rRNA               |
| FISH             | Fluorescence in Situ Hybridization            |
| GENBANK          | Banco de Sequências Gênicas                   |
| HKI              | Hasegawa-Kishino-Yano                         |
| H <sub>2</sub> S | Teste do Sulfeto de Hidrogênio                |
| IB               | Inferência Bayesiana                          |

|                   |                                                                          |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| IBAMA             | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| IGS               | Intergenic Spacer                                                        |
| IMNV              | Infectious Mionecrose Vírus                                              |
| IND               | Teste do Indol                                                           |
| INO               | Teste do Inositol                                                        |
| INTERPRO          | InterPro: Protein Sequence Analysis & Classification                     |
| IPA               | Instituto Agronômico de Pernambuco                                       |
| IUBMB             | União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular                   |
| KEGG              | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes                                  |
| LB                | Luria & Bertani                                                          |
| LDC               | Teste da Lisina Descarboxilase                                           |
| LPSH              | List of Prokaryotic Names                                                |
| MAL               | Teste do Malonato                                                        |
| MAN               | Teste do Manitol                                                         |
| MCMC              | Markov Chain Monte Carlo                                                 |
| ME                | Mínima Evolução                                                          |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de Magnésio                                                      |
| MLT               | Teste da Maltose                                                         |
| MPA               | Ministério da Pesca e Aquicultura                                        |
| MV                | Máxima Verossimilhança                                                   |
| NaCl              | Cloreto de Sódio                                                         |
| NCBI              | National Center for Biotechnology Information                            |
| Ng                | Nanograma                                                                |
| NH <sub>3</sub>   | Amônia                                                                   |
| NJ                | Neighborn ã Joining                                                      |

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| NO <sup>-2</sup> | Nitrito                               |
| ODC              | Teste da Ornitina Descarboxilase      |
| ONPG             | Teste da •-Galactosidase              |
| OTUs             | Operational Taxonomic Units           |
| Pb               | Pares de Base                         |
| PAUP             | Phylogenetic Analysis Using Parsimony |
| PCR              | Polymerase Chain Reaction             |
| PD               | Teste da Desaminação da Fenilalanina  |
| PDB              | Protein Data Bank                     |
| pH               | Potencial Hidrogeniônico              |
| PHRED            | Editor de leitura Philøs              |
| PIR              | Protein Information Resource          |
| Pl               | Pós-larvas                            |
| RAF              | Teste da Rafinose                     |
| RAM              | Teste da Rhamanose                    |
| RDP              | Ribosomal Database Project            |
| rD1              | Primer Reverse do gene 16S rRNA       |
| RECARCINA        | Rede de Carcinicultura do Nacional    |
| RNAse            | Ribonuclease                          |
| rRNA             | RNA ribossomal                        |
| RPM              | Rotações por Minuto                   |
| SAC              | Teste da Sacarose                     |
| SAL              | Teste da Salicina                     |
| SDS              | Sulfato Dodecil de Sódio              |
| SOR              | Teste do Sorbitol                     |
| SSA              | Southern Shrimp Alliance              |

|            |                                                              |
|------------|--------------------------------------------------------------|
| SWISS-Prot | Swiss protein sequence db                                    |
| Taq        | Enzima extraída da bactéria <i>Termophylus aquaticus</i>     |
| TBE        | Solução tampão contendo Tris, ácido Bórico e EDTA            |
| TCBS       | Agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose                |
| TE         | Solução tampão de Tris-HCl e EDTA                            |
| TIGR       | The Institute for Genomic Research                           |
| TM         | Temperature Melting                                          |
| TMPD       | n,n,n,n-Tetrametil-p-Fenileno Diamina Mono-Hidrocloridratado |
| TSA        | Trypticase Soy Agar                                          |
| UFC        | Unidade Formadora de Colônia                                 |
| UPGMA      | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean            |
| URE        | Tested a Urease                                              |
| VP         | Tested a Acetoina                                            |
| WSSV       | White Spot Syndrome Virus                                    |

## SUMÁRIO

|                                                                         |             |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                     | <b>vii</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                   | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                           | <b>ix</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                            | <b>x</b>    |
| <b>LISTAS DE ABREVIATURAS.....</b>                                      | <b>xi</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                               | <b>1</b>    |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                               | <b>3</b>    |
| 2.1. Objetivo geral.....                                                | 3           |
| 2.2. Específicos.....                                                   | 3           |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                   | <b>4</b>    |
| 3.1. Situação da carcinicultura Mundial .....                           | 4           |
| 3.2. Evolução da carcinicultura brasileira.....                         | 4           |
| 3.3. Panorama da Carcinicultura no Nordeste.....                        | 5           |
| 3.4. <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) .....                    | 6           |
| 3.5. Técnicas de Cultivo e Impacto Ambiental do Cultivo.....            | 7           |
| 3.6. Sistema Autotrófico e Heterotrófico.....                           | 8           |
| 3.7. Bactérias Heterotróficas.....                                      | 10          |
| 3.8. Biofilme e Biofloco .....                                          | 11          |
| 3.9. Importância das Bactérias no cultivo .....                         | 13          |
| 3.10. Probióticos na carcinicultura .....                               | 13          |
| 3.11. Gênero <i>Shewanellae</i> a espécie <i>Shewanella algae</i> ..... | 15          |
| 3.12. O gene 16S rRNA e a identificação molecular de bactérias .....    | 17          |
| 3.13. Filogenia e bioinformática aplicada à bacteriologia .....         | 18          |
| 3.13.1. Filogenia.....                                                  | 18          |

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.13.2. Bioinformática .....                                       | 19        |
| <b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                         | <b>22</b> |
| <b>5. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>                                   | <b>46</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                | <b>53</b> |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                             | <b>49</b> |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                    | <b>50</b> |
| Obtenção das cepas bacterianas competentes .....                   | 51        |
| Extração do DNA bacteriano .....                                   | 51        |
| Amplificação e Sequenciamento das cepas .....                      | 52        |
| Identificação e estudo filogenético.....                           | 52        |
| Caracterização fenotípica das cepas de S. algae selecionadas ..... | 54        |
| Crescimento bacteriano e análise morfológica das cepas.....        | 54        |
| Testes bioquímicos .....                                           | 54        |
| Antibiograma das cepas selecionadas.....                           | 55        |
| Produção de Biofilme .....                                         | 55        |
| <b>RESULTADO .....</b>                                             | <b>55</b> |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>                                             | <b>65</b> |
| <b>CONCLUSÃO.....</b>                                              | <b>67</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                          | <b>67</b> |
| <b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                | <b>75</b> |
| <b>7. ANEXOS .....</b>                                             | <b>75</b> |
| <b>8.1. Normas da revista ã AQUACULTURE.....</b>                   | <b>75</b> |
| <b>9. APÊNDICES .....</b>                                          | <b>95</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é cotada como setor da indústria primária com maior perspectiva de evolução em todo o mundo e quanto a carcinicultura não é diferente. O principal camarão produzido no Brasil é o *Litopenaeus vannamei*, justificado pelo seu alto grau de rusticidade, adaptabilidade, rentabilidade e grande aceitação no mercado internacional. O Brasil, no entanto, devido a crises no setor, ação antidumping americana em 2003 e problemas com doenças no cultivo permanece estagnado e com balança comercial desfavorável frente a produção mundial do setor. Assim, faz-se necessário a utilização de alternativas inovadoras para tornar o setor mais competitivo no panorama mundial.

Apontado como alternativa aos sistemas de cultivos extensivos tradicionais, o sistema intensivo heterotrófico é considerado o sistema mais vantajoso em termos econômicos, sociais e ambientais. Trata-se de um sistema fechado, sem renovação de água, com aplicação de probióticos, alta taxa de aeração e ração com baixa concentração de proteína. Este é baseado no princípio da exclusão competitiva, na qual bactérias patogênicas são substituídas por um suplemento simples ou uma cultura mista de bactérias selecionadas. O sistema ainda favorece a produção de um complexo formado por sedimentos e microrganismos denominado biofloco que é utilizado como alimento natural ao camarão.

Neste aspecto, o estudo da diversidade microbiana é essencial à compreensão das interações ecológicas dentro do cultivo. Uma vez que os microrganismos do cultivo são importantes para manutenção da qualidade da água, através da absorção de compostos nitrogenados, além da sua importância como fonte de alimento para camarões cultivados, promovendo incremento nas taxas de conversão alimentar e redução dos custos com alimentação. Ainda, os probióticos geralmente utilizados no cultivo, promovem a diminuição da incidência de microrganismos patogênicos, como bactérias do gênero *Vibrio*.

Os probióticos são microrganismos administrados por via oral, que propiciam benefícios à saúde, controle de patógenos, principalmente doenças bacterianas, atuando por exclusão competitiva e imunomodulação. Normalmente isolados do trato digestivo do próprio animal hospedeiro, melhoram a taxa de conversão alimentar, podem também melhorar o apetite e promover maior crescimento. Contudo, o grande obstáculo para a compreensão destas relações microbiológicas tem sido a identificação das bactérias por técnicas bioquímicas convencionalmente utilizadas.

Atualmente, tanto as relações filogenéticas quanto as taxonômicas são resolvidas através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Estão disponíveis alguns bancos de dados de sequências do gene 16S rRNA como o NCBI (National Center for Biotechnology

Information) e o RDP (Ribosomal Database Project). Ainda, estão disponíveis excelentes softwares com algoritmos específicos para análise de DNA. Desta forma as técnicas bioquímicas são importantes para caracterização fenotípica bacteriana porém não mais a fim da identificação de bactérias probióticas, como exemplo a *Shewanella*, sendo este o papel dos genes ribossomais.

O Gênero *Shewanella* pertence à classe *Gammaproteobactérias*, compondo um grupo de bactérias gram-negativas, móveis, baciliforme, oxidase positiva, aeróbias não fermentativas e facultativas, bactérias aquáticas e comumente encontradas em ambiente marinho. O gênero ainda tem sido encontrado em ambientes extremos e variados, inclusive áreas de baixa temperatura e em locais com histórico de contaminação por petróleo. O gênero *Shewanella* ainda é o mais estudado dentro do grupo das bactérias redutoras de ferro. Ainda, apresenta atividade antimicrobiana contra os *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*.

Por conseguinte, este estudo objetivou identificar e analisar filogeneticamente potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas e estômago do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracteriza-las fenotipicamente através de análises morfológicas, bioquímicas, além de estudar a capacidade de produção de biofilme e antibiograma.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Identificar e analisar filogeneticamente potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas e estômago do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracteriza-las fenotipicamente através de análises morfológicas, bioquímicas, além de avaliar a capacidade de produção de biofilme e antibiograma.

### 2.2. Específicos

- Selecionar e identificar bactérias, presentes no cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei*, com potencial para produção de probiótico;
- Avaliar o método para análise filogenética mais eficiente dentre os métodos Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre as cepas estudadas e o gênero *Shewanella*;
- Analisar morfolologicamente e bioquimicamente as cepas bacterianas selecionadas;
- Testar a capacidade de produção de biofilme bacteriano;
- Determinar os antibióticos eficazes com as cepas selecionadas;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Situação da carcinicultura Mundial

A Organização das Nações Unidas para Alimento e Agricultura (FAO) afirma que a aquicultura será a atividade do setor primário da economia mundial que obterá o maior crescimento nos próximos trinta anos. Este fato deve-se principalmente pela limitação dos estoques naturais de pescado, do domínio tecnológico para produção e cultivo de espécies marinhas além da crescente demanda por alimentos com elevados teores proteicos (ROCHA, 2013).

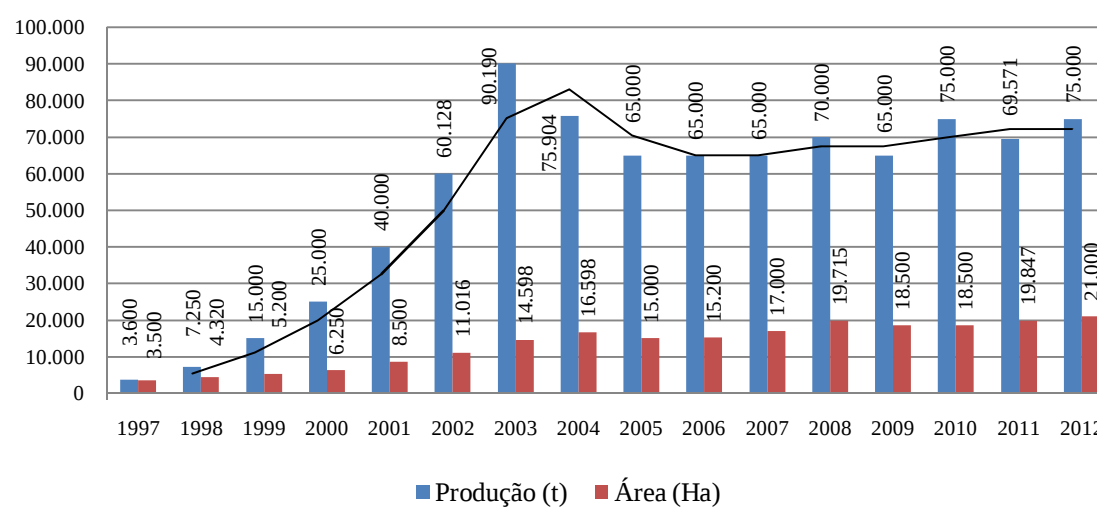
No cenário mundial a carcinicultura apresentou um crescimento exponencial alcançando a produção de 3.930.059t no ano de 2011 superando a produção por extrativismo de 3.288.467t/ano (FAO, 2014). Neste contexto, os principais atores são países como a China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Índia, Bangladesh e Filipinas do continente asiático, responsável por 85,91% da produção. Não obstante o Equador, México e Brasil são responsáveis por 13,76% da produção mundial em 2011, em parceria com outros países do continente americano (ROCHA, 2014).

#### 3.2. Evolução da carcinicultura brasileira

Nos final dos anos 90 a carcinicultura havia tornado-se uma atividade importante e bastante rentável no ponto de vista econômico (BURGOS-HERNÁNDEZ et al., 2005), principalmente entre os anos de 1997 a 2003, no qual a atividade apresentou um incremento de 2.505,28%, como aponta a Figura 1, traçando toda produção nacional entre 1997 até 2012.

Contudo, a carcinicultura Brasileira, Chinesa, Tailandesa, Indiana, Vietnamita e Equatoriana foram abaladas, entre 2003 e 2004 pela ação *antidumping* promovida pela Aliança Sulista de Pescadores de Camarão (SSA) dos Estados Unidos. Ainda, doenças virais no cultivo como a Mionecrose Infecciosa Muscular (IMNV) e a Síndrome da Mancha Branca (WSSV) atingiram respectivamente a região Nordeste e Sul (OSTRENSKY, 2007). Após o ocorrido, o camarão brasileiro foi perdendo espaço gradativamente no comércio mundial reduzindo sua exportações de camarão de 58.455t/US\$ 226,0 milhões em 2003 a 0,0t no ano de 2012. No entanto, toda produção camaroeira, que voltou a crescer em 2012 (Tabela 1) foi consumida totalmente pelo mercado interno (ABCC, 2013).

Figura 1. Evolução da Carcinicultura Brasileira: 1997 a 2012.



Fonte: ABCC, 2013.

### 3.3. Panorama da Carcinicultura no Nordeste

Iniciada no estado do Rio Grande do Norte com o Projeto Camarão a carcinicultura Brasileira, emergida nos anos 70, surgiu como opção à extração de sal no estado (ABCC, 2014). O cultivo inicial com a espécie *Marsupenaeus japonicus* logo cedeu espaço aos estudos com espécies nativas como *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. brasiliensis* e *F. paulensis*. Com a evolução da produção do *L. vannamei* no Equador, o Brasil adotou a espécie nos anos 90 e a atividade chegou ao atual estágio de desenvolvimento. Em pouco tempo, o camarão branco do Pacífico se destacou devido a sua capacidade de adaptação as mais variadas condições de cultivo, altas taxas de crescimento e sobrevivência, boa produtividade e grande aceitação no mercado, transformando-se praticamente na única espécie cultivada comercialmente no país (OSTRENSKY e BARBIERI, 2002). Apesar do país dispor de condições climáticas, hidrobiológicas e topográficas favoráveis em toda a extensão de sua costa, o desenvolvimento da carcinicultura marinha está concentrado na região Nordeste que responde por cerca de 90% da produção nacional.

O litoral do estado de Pernambuco, possui clima tropical e um ecossistema extremamente produtivo (MANSO, 2003) o que possibilitou o desenvolvimento de uma carcinicultura rentável e promissora, com produção do camarão marinho *L. vannamei*, que abrange 21 municípios distribuídos numa faixa de 187 Km, estendendo-se desde o município de Goiana, ao norte, até o município de São José da Coroa Grande, ao sul. Esta faixa litorânea é caracterizada, por apresentar: uma costa baixa, atingindo em vários pontos, cotas inferiores

ao nível de preamar; um ecossistema extremamente produtivo, sendo considerada a região verde onde, ora se sucedem e ora se entrelaçam segmentos de planície recobertos por coqueirais, remanescentes de mata atlântica, restingas, estuários com extensos manguezais, recifes de coral, coroas, ilhas entre outros (MANSO, 2003). No ranking brasileiro, Pernambuco assume atualmente a quarta posição em produção, possuindo 155 fazendas produtoras (10% da produção nacional), ainda apresenta uma área cultivável de 1.567Ha (7%) com produção de 4.309t (6,2%), conforme dados observados em 2011 (ABCC; Ministério da Pesca e Aquicultura e Governo Federal. 2013).

#### 3.4. *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Conhecido popularmente como camarão branco o *L. vannamei*(figura 2) é um crustáceo da ordem Decapoda, da família Penaeida, espécie endêmica do oceano Pacífico, sendo, encontrada de Sonora (México) até Tumbes (norte do Perú). O grande desenvolvimento no cultivo do *L. vannamei* deve-se, em parte, a sua adaptação fácil a condições físico-químicas adversas (LOEBMANN et al. 2010), como variações na temperatura e salinidade, além de sua taxa regular de crescimento (SANTOS, 2009).

Figura 2. Camarão branco *Litopenaeus vannamei*. (LOEBMANN, et al. 2010).



Com preferência por fundos lamosos, a espécie é normalmente encontrada no infralitoral com profundidades de até 72 metros. Naturalmente cresce até 23 cm de comprimento e apresenta hábito alimentar onívoro (BARBIERI e OSTRENSKY , 2001). Atualmente é cultivado em todos os países ocidentais produtores de camarão branco do

mundo (SANTOS, 2009). Com produção mundial de 2.300.000 toneladas em 2007 (FAO, 2014).

De acordo com Sá (2003), o *L. vannamei* tem uma excelente performance em cultivo, se desenvolvendo muito bem em uma salinidade entre 15 e 30‰, com temperatura entre 23 e 30°C. O requerimento alimentar para o cultivo em confinamento, em termos de ração peletizada, contempla uma carga de proteínas que pode variar entre 22 e 40%, em dependência da intensificação do cultivo nos viveiros; da capacidade de tolerância em alta densidade de estocagem; do baixo requerimento proteico da sua dieta alimentar; e da produtividade natural das águas em uso.

Quanto à aceitação comercial da espécie, que garante o custeio de todo o ciclo produtivo, o *L. vannamei* é significativamente preferido entre as demais espécies no mercado nacional e internacional, com forte demanda compradora (SÁ, 2003).

### 3.5. Técnicas de Cultivo e Impacto Ambiental

Dentro das técnicas de crescimento utilizadas atualmente na aquicultura estão presentes as técnicas: extensiva, semi-intensiva, intensiva e super-intensiva, respectivamente com baixa densidade de povoamento, média, alta e muito alta.

Na técnica extensiva e semi-intensiva, frequentemente utilizada em países latino-americanos, caracterizada pela implantação de fazendas de criação de *L. vannamei* em regiões entre marés sem ventilação ou bombeamento de água. Destaca-se também pela baixa densidade de camarões, alimentação natural acrescida de ração de baixo teor protéico uma vez por dia e densidade de 4-10 pl / m<sup>2</sup> (FAO, 2014). A técnica de cultivo semi-intensiva ocorre renovação da água e baixa ventilação artificial. A alimentação dos camarões é realizada por adubação dos viveiros, oferta de ração peletizada 3 vezes por dia e densidade entre 10-30 pl / m<sup>2</sup> (FAO, 2014).

A técnica intensiva, diferente da extensiva e semi-intensiva, é geralmente localizada distante de regiões litorâneas. O cultivo é realizado com densidades altas, em torno de 60 a 300 pl / m<sup>2</sup> (FAO, 2014). Este sistema exige grande aeração artificial devido à densidade de povoamento. A técnica baseia-se no desenvolvimento de bactérias heterotróficas e formação de bioflocos. Nesta a relação entre Carbono e Nitrogênio (C:N) é monitorada afim de manter a relação 10:1, favorecendo o desenvolvimento bacteriano. Já a super-intensiva desenvolve-se em estufas sem troca de água, exceto evaporação. Tanto a técnica intensiva quanto o super-

intensiva, caracterizam-se pelo baixo impacto ambiental, por serem bio-seguras, sustentáveis, além do desenvolvimento de camarões de alta qualidade (FAO, 2014).

Tradicionalmente o cultivo extensivo de camarão demanda elevados volumes d'água para renovação sendo necessários entre 39 a 199 toneladas de água para produção de 1 quilo de camarão, em viveiro de engorda (ARANTES, 2007; HOPKINS & VILLALÓN, 1992). Ainda, toda água saturada de matéria orgânica é eliminada, sem nenhum tipo de remediação, diretamente nos rios alterando o equilíbrio do ecossistema agredido (ARANTES, 2007; HOPKINS et al, 1995; BAIRD, et al, 1996).

Por sua vez, o cultivo heterotrófico, baseado na utilização de bactérias probióticas, trabalha utilizando pouca ou nenhuma renovação de água, possível graças às bactérias heterotróficas do cultivo que mantêm a qualidade da mesma (BOYD & CLAY, 2002; MORIARTY et al., 2005).

### **3.6. Sistema Autotrófico e Heterotrófico**

O cultivo autotrófico ainda é o mais utilizado entre os produtores brasileiros. Este consiste da utilização de baixas densidades de estocagem de camarões, sistema com trocas frequentes a fim de estabilizar a concentração de algas no cultivo e a utilização de rações com elevados teores de proteína (GROSS et al., 2003). No entanto, este sistema tem sido responsabilizado, pelas organizações ambientais, por promover a deterioração dos ecossistemas costeiros e além de perdas econômicas decorrentes de sua auto-poluição (SAMOCHA et al., 2007). Ainda, muitas das doenças são originadas em complexos de fazendas que praticam cultivos extensivos e compartilham efluentes contaminados (KAUTSKY et al. 2000).

Apontado como alternativa ao sistema intensivo tradicional, o sistema heterotrófico é considerado o sistema mais vantajoso em termos econômicos e sociais, devido a sua maior rentabilidade por área e maior necessidade de mão-de-obra (EMERENCIANO et al., 2013). Além disto, o sistema heterotrófico apresenta baixíssimo impacto ambiental comparado a outros modelos de cultivo (MORIARTY et al., 2005).

O sistema autotrófico consiste na utilização de baixas densidades de estocagem, trocas regulares de água para controlar a superpopulação de algas e a utilização de rações com altos níveis de proteína (GROSS et al., 2003). No entanto, sistemas baseados no controle de organismos autotróficos têm sido responsabilizados pelas organizações ambientais pela deterioração dos ecossistemas costeiros e sofrido grandes perdas econômicas, resultado de

doenças decorrentes de sua auto-poluição (SAMOCHA et al., 2007). Segundo Kautsky e colaboradores (2000), muitas dessas doenças são originadas em complexos de fazendas que praticam cultivos intensivos e compartilham efluentes de baixa qualidade.

Contudo, o sistema heterotrófico pode ser implementado tanto ao cultivo de espécies dulciaquícolas quanto halofílicas. O *Macrobrachium rosenbergii*, camarão de água doce, é uma importante espécie cultivada na China e outros países do sudeste asiático, por apresentar alto valor comercial e suscetibilidade diversos sistemas de cultivo, incluindo o sistema intensivo (DU et al., 2011). Ainda, espécies como *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei*, camarão de água salgada, estão dentre as espécies mais cultivadas em todo o mundo, além de amplamente estudadas e cultivadas em sistema heterotrófico. O *Penaeus monodon*, é bastante cultivado no continente asiático, com produção, entre 2010-2011, equivalente a \$ 462 milhões, só em Bangladesh (DEBNATH et al., 2014). O *Litopenaeus vannamei*, camarão halófilo, possui produção mundial de 2.300.000 toneladas em 2007 (FAO, 2014).

O sistema heterotrófico trabalha em condições super-intensivas, viveiros pequenos, alta taxa de aeração, rações com baixo teor protéico, camarões livres de patógenos específicos e pouca ou nenhuma troca de água (BOYD & CLAY, 2002).

O desenvolvimento do meio heterotrófico também pode ser obtido através de probióticos, baseado no princípio da exclusão competitiva, na qual bactérias patogênicas são substituídas por um suplemento simples ou uma cultura mista de bactérias selecionadas (GULLIAN et al., 2004). Os probióticos podem promover benefícios ao sistema de cultivo sob varias formas, como exemplo diminuindo o estresse no cultivo heterotrófico, baixo impacto ambiental, permitindo maior controle sobre bactérias patogênicas e o micro ecossistema do cultivo, eliminação do uso de antibióticos no cultivo, estímulo do sistema imune, além da melhoria nas tas de conversão alimentar e ganho de massa (MORIARTY et al., 2005).

No decorrer dos anos, vários trabalhos atestam o potencial das bactérias probióticas quanto ao controle de patógenos e melhoria no sistema heterotrófico, como exemplo o *Bacillus* spp., eficiente no cultivo de diferentes espécies de crustáceos como *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Branchinella thailandensis* e *Homarus gammarus* (PURIVIROJKUL et al., 2013), além do *Farfantepenaeus brasiliensis* atuando na diminuição de Vibrios no cultivo (SOUZA et al., 2012).

### 3.7. Bactérias Heterotróficas

No cultivo autotrófico, a redução das taxas de renovação da água naturalmente pode diminuir a qualidade da água nos viveiros. Concomitante a diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido (ARANTES, 2007; BROWDY et al., 1993) e acúmulo de composto nitrogenados como o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e amônia ( $\text{NH}_3$ ) (ARANTES, 2007; WICKINS, 1976). No entanto, as bactérias heterotróficas naturalmente encontradas no sistema podem atuar na diminuição dos compostos nitrogenados presentes, incorporando-os na formação de uma biomassa rica em proteínas, além da mineralização destes resíduos tóxicos (ARANTES, 2007; FUHRMAN et al., 1988; WHEELER e KIRCHMAN, 1986). Ainda, a formação de floculados bacterianos, segundo Burford *et al.* (2004), proporciona um alimento em potencial ao camarão. Este comenta que sistemas ricos em floculados podem contribuir substancialmente para nutrição do *L. vannamei*. No cultivo apenas 15 a 30% da alimentação oferecida ao camarão é incorporada em sua biomassa, dessa forma estima-se que 53 a 77% do incremento do peso dos camarões está relacionada à floculados bacterianos e outros alimentos naturais (ARANTES, 2007).

O grupo das  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -proteobactéria estão relacionados com a oxidação da amônia a nitrato via nitrito (nitrificação) e seguido pela desnitrificação, que reduz o nitrato a nitrogênio gasoso, vias redutoras do nível de amônia nos tanques de cultivo. As subclasses  $\beta$  e  $\gamma$ -, da classe *Proteobacteria*, contém a maior parte das espécies de bactérias nitrificantes destacando-se os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* e *Nitrospira* (OLIVEIRA et al., 2006; BOTHE et al. 2000). Proteobacterias foram identificadas por Li e colaboradores (2007) com frequência de 24,6%, sendo pertencentes aos gêneros *Shewanella* sp., *Pantoea* sp., *Aranicola* sp., *Pseudomonas* sp. e *Vibrio* sp.

Bactérias Vibrionáceas e outros gêneros bacterianos como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Shewanella* são normalmente encontrados desempenhando papel importante na manutenção do equilíbrio no cultivo. Por outro lado, bactérias do gênero *Vibrio* fazem parte da microbiota natural do camarão e são considerados os principais patógenos bacterianos, causando perda de produção especialmente na larvicultura e engorda (COSTA, 2006). As principais espécies deste gênero que apresentam risco ao cultivo são *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. splendidus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* (COSTA, 2006; LIGHTNER, 1996). Frequentemente as espécies *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* estão associadas à mortalidade (GULLIAN et al., 2004).

Dantaset *et al.* (2009) afirmam que a utilização, como probiótico, do *Bacillus* spp. pode influenciar na resistência do camarão, quando submetido ao *V. harveyi*. Estudos realizados por Far *et al.* (2009) com *L. vannamei* também relata aumento da taxa de sobrevivência e rendimento.

A bactéria *Shewanella* spp. têm sido encontrada em ambientes extremos e variados, inclusive áreas de baixa temperatura e em locais com histórico de contaminação por petróleo. O gênero *Shewanella* ainda é o mais estudado dentro do grupo das bactérias redutoras de ferro (SILVA, 2009). Estudos realizados por Shakibazadeh *et al.* (2008) apontam *S. algae* como razoável resposta antimicrobiana em várias temperaturas e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, além do antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH *et al.*, 2012)

### 3.8. Biofilme e Biofloco

Com o objetivo de compreender melhor entender as interações entre o probiótico bacteriano e o hospedeiro, o estudo da dinâmica de formação do biofilme e biofloco é extremamente pertinente. O biofilme bacteriano é uma estrutura resistente, onipresente e sensível ao ambiente, apresentando estruturas tridimensionais constituídas de células bacterianas capazes de estabelecer uma comunicação através de sinalizações bioquímicas complexas (TEAL, 2008). Estes são formados pela aderência bacteriana a superfície e sucessivas interações com demais bactérias suportadas pela matrix extracelular, que é rica em polissacarídeos e outros componentes (WHITCHURCH *et al.*, 2002; THORMANN *et al.*, 2006).

Estudos anteriores, referentes à formação de biofilme em *Shewanella oneidensis*, concluíram, a partir da quantificação de metabólitos, análise por PCR e FISH, que no biofilme ocorre uma estratificação de colônias bacterianas (TEAL *et al.*, 2006; COLE *et al.*, 2004; HARMSSEN *et al.*, 1996; MINZ *et al.*, 1999 e OKABE *et al.*, 1999). Estes estudos demonstraram que existe uma grande heterogeneidade no que diz respeito à atividade celular e de metabolismo. Consoante à redução da atividade e crescimento próximo do centro do biofilme, onde espera-se que as células estejam limitadas nutricionalmente (TEAL *et al.*, 2006; DAVIES *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1998-1995; LEQUETTE e GREENBERG, 2005; MAJORS *et al.*, 2005; NIELSEN *et al.*, 2000; POULSEN *et al.*, 1993; WENTLAND *et al.*, 1996; WERNER *et al.* 2004; XU *et al.*, 1998; YOSHIDA *et al.*, 2002).

Esta comunidade bacteriana, presente na água e sedimento do cultivo, compoendo a biofloco interagem intimamente acentuando os benefícios ao hospedeiro e reduzindo problemas no cultivo (MORIARTY et al., 2005). O processo de formação dos bioflocos envolve interações físicas, químicas e biológicas. A agregação do particulado orgânico inicia-se com a adição de fontes de carbono (melaço de cana-de-açúcar, dextrose, farelo de trigo e arroz, e outros) objetivando alterar a relação Carbono:Nitrogênio na água e excitando o crescimento das bactérias heterotróficas. O desenvolvimento do sistema é possível quando a relação C:N é mantida próxima a 15-20:1. Todavia, o sistema necessita de grande aporte de oxigênio, possível pela alta aeração no cultivo, acrescida as fontes de carbono, matéria orgânica e outros materiais em suspensão na água. Por sua vez, surgem bactérias que secretoras de muco, na qual contribuem para a agregação e formação dos flocos microbianos. Além das bactérias podem ser observados protozoários ciliados e flagelados, microalgas, nematoides e rotíferos (WASIELESKY et al., 2013).

Contudo, o sistema de biofloco precisa de monitoramento constante dos parâmetros de qualidade da água (JHA, 2011), sendo eles, pH, alcalinidade e concentração de CO<sub>2</sub>. Isto porque ocorre uma queda nos níveis de alcalinidade e pH em função do aumento dos sólidos suspensos e, também, um incremento na concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido. Ao longo do cultivo os níveis de sólidos suspensos totais aumentam e a comunidade bacteriana heterotrófica passa a ser predominante. O que promove uma atenuação das oscilações diárias nos valores de pH, visto que o processo de fotossíntese é prejudicado pela redução da luminosidade na coluna d'água e turbidez elevada. O nível de alcalinidade igual ou superior a 150mg CaCO<sub>3</sub>/L é considerado ideal por muito pesquisadores, no que refere-se a produção de camarões marinhos. A manutenção da alcalinidade auxilia no processo de estabilização do pH mantendo-o acima de 7, favorecendo o crescimento do camarão e do biofloco. (WASIELESKY et al., 2013).

Um dos fatores mais importantes no sistema de cultivo heterotrófico, baseado na produção de biofloco, é o ciclo do nitrogênio. Isso porque, logo que as concentrações de amônia começam a aumentar nos viveiros ou tanques, deve ser feita a fertilização orgânica para estimulação do crescimento de bactérias. Essas bactérias vão fazer com que o ciclo prossiga, transformando a amônia em nitrito e, posteriormente, a nitrato. Assim a fertilização orgânica promove a redução dos níveis de amônia aproximando-os a valores nulos em 15 a 20 dias de cultivo. Ao passo que a amônia é transformada no sistema, as concentrações de nitrito elevam-se, e, se as bactérias nitrificantes já estiverem estabelecidas no sistema, o nitrato começa a aparecer, chegando ao final do cultivo como a forma nitrogenada mais abundante (WASIELESKY et al., 2013).

### 3.9. Importância das bactérias no cultivo

Os microrganismos que compõem o alimento natural no ambiente de viveiro desempenham papel preponderante no processo de alimentação dos camarões. Por se tratarem de animais com hábito alimentar onívoro, os camarões são extremamente dependentes do alimento natural (MORIARTY, 1997). Microrganismos como plânctons, bactérias e algas são de grande importância para os sistemas aquícolas, particularmente com respeito à produtividade primária, ciclagem dos nutrientes, nutrição dos animais cultivados, qualidade da água, controle de doenças e do impacto dos efluentes ao meio ambiente (MONTROYA & VELASCO, 2000).

Segundo Burford *et al.* (2004), mais de 29% do alimento consumido por *L. vannamei* pode ser proveniente do floco bacteriano presente no meio heterotrófico (meio onde predominam organismos heterotróficos, mantidos através do balanço da relação carbono/nitrogênio/fósforo). O filme bacteriano e outros organismos geralmente constituem de 5 a 10% da massa das partículas de detritos (CHAMBERLAIN *et al.*, 2001a).

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

Desse modo, o estudo da diversidade microbiológica dos viveiros de cultivo dos camarões, além de sua importância para o manejo adequado da qualidade da água, é indispensável para a nutrição do camarão e sua produtividade.

### 3.10. Probióticos na Carcinicultura

O termo probiótico é geralmente utilizado para denominar bactérias que proporcionam benefícios à saúde de outros organismos (BALCÁZAR *et al.*, 2006). Lilley e Stillwell (1965) descrevem-no como substância secretada por microorganismos que estimula o crescimento de outros. Por sua vez, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) e World health

organization (WHO) (2001) probióticos são microorganismos livres que quando consumidos em condições adequadas conferem benefícios à saúde (BALCÁZAR et al., 2006).

No entanto, para Moriarty (1999) o termo probiótico tem sido definido como monocultura ou policultura de microorganismos, aplicados a animal e nutrição humana, que afetam positivamente e melhoram a microflora endógena. Por fim, Newaj-Fyzul, *et al.* (2013) consideram Probiótico como microrganismos administrados por via oral, promovendo benefícios à saúde, controle de patógenos, principalmente doenças bacterianas. A origem destes organismos é frequentemente do trato digestivo do animal hospedeiro. O modo de ação inclui a exclusão competitiva e imunomodulação. Probióticos podem também melhorar o apetite e levar a um maior crescimento e melhor conversão alimentar.

Tem-se observado que a utilização de probiótico afim da inibição patogênica, incremento em taxas de crescimento, digestão e competência imunológica são crescentes (NAYAK, 2010). Visto que é mais eficaz do que a utilização de antibióticos (NIMRAT et al., 2012; NINAWA et al., 2009), seja na produção bovina, saúde humana ou fazendas de cultivo de camarão (DANTAS et al., 2009). O uso massivo de antibióticos aumenta a pressão seletiva sobre os microorganismos promovendo aumento na resistência bacteriana (VERSCHUERE et al., 2000).

Contudo na carcinicultura as etapas para seleção de probióticos bacterianos incluem coleta de informações, aquisição do potencial probiótico, avaliação da competência do futuro probiótico frente a bactérias patogênicas, avaliação da patogenicidade do próprio probiótico, avaliar os efeitos do potencial probiótico no hospedeiro e análise de viabilidade econômica (BALCÁZAR et al., 2006).

O biofloco enriquecido por bactérias probióticas, na maioria das vezes não atua apenas no animal cultivado. Promove, também, o desenvolvimento de várias espécies presentes no sistema heterotrófico como *Chaetoceros* spp., *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum*, *Brachionus plicatilis* e *Artemia*, aumentando a oferta de alimento no sistema (PURIVIROJKUL et al., 2013).

O uso profilático de antibióticos é comumente incorporado ao cultivo com o objetivo de prevenir doenças no cultivo (SHAKIBAZADEH et al., 2011). Porém, a utilização indiscriminada destas substâncias pode promover a resistência aos antibióticos no ambiente de cultivo (RHODES et al., 2000; MIRANDA & ZEMELMAN, 2002; ALCAIDE et al., 2005). Ainda, o consumo de alimentos contaminados com antibióticos podem gerar intoxicação e alergias nos consumidores (CABELLO et al., 2004).

A ocorrência de bactérias multirresistentes a antibióticos acentua a busca por alternativas sustentáveis no cultivo (NIMRAT et al., 2012). Como alternativa ao uso de antibióticos, utilizados no controle de doenças, os probióticos têm atraído recentemente bastante atenção na aquicultura. Isto porque as bactérias probióticas podem produzir algumas enzimas digestivas, o que pode melhorar a digestão de camarão, aumentando assim a capacidade de resistência ao estresse e saúde do camarão (NINAWA et al., 2009). Como atestado por Nimrat et al. (2012) a utilização de culturas mistas de *Bacillus* spp., como probióticos, promoveu significativa melhoria no crescimento e na sobrevivência das pós-larvas do camarão *L. vannamei*, aumento a concentração de bactérias não patogênicas e melhorando a qualidade da água aos níveis de pH, amônia e nitrito.

Assim, os probióticos são uma alternativa ao uso de antimicrobianos. Possibilitando a produção e comercialização de produtos seguros, saudáveis e com alto valor nutricional. Neste contexto, a bactéria *Shewanella algae* vem sendo proposta como candidata a probiótico, além de ser segura ao consumo humano, sem acarretar prejuízos tanto a consumidores quanto trabalhadores da indústria camareira (SHAKIBAZADEH et al., 2011).

### 3.11. Gênero *Shewanella* e a espécie *Shewanella algae*

O Gênero *Shewanella* é um representante da classe das *Gammaproteobactérias*, ordem *Alteromonales* e família *Shewanellaceae*, compondo um grupo de bactérias gram-negativas, móveis, baciliforme, oxidase positiva, aeróbias não fermentativas e facultativas, Bactérias aquáticas e comumente encontradas em ambiente marinho (KIM et al., 2007; BOWMAN, 2005; GAUTHIER et al., 1995; MACDONELL & COLWELL, 1985; VENKATESWARAN et al., 1999). O gênero *Shewanella* foi inicialmente descrito a partir da reclassificação da *Alteromonas putrefaciens* e *Alteromonas hanedai* em respectivamente *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella hanedai* (MACDONELL & COLWELL, 1985). Atualmente o gênero é composto por 62 espécies, segundo a LPSN - List of Prokaryotic Names (2014). Frequentemente novas espécies são submetidas ao gênero sendo possível o aumento deste número no decorrer dos anos (KIM et al., 2011).

Cepas de *Shewanella* podem ser encontradas em ambiente marinho (VENKATESWARAN et al., 1998; NEALSON et al., 1991; NOGI et al., 1998; IVANOVA et al., 2001, 2003, 2004a,b; BOZAL et al., 2002; SKERRATT et al., 2002; YOON et al., 2004; GRAM et al., 1987; STENSTROM & MOLIN, 1990; GRAM & HUSS, 1996; SATOMI et al., 2006, 2007; LEE et al., 2006; SATOMI et al., 2003; SIMIDU et al., 1990; YANG et al., 2006; SUCHARITA et al., 2009; SRAVAN KUMAR et al., 2010; SUNG et al.,

2012; PARK et al., 2009, 2013), em sedimentos (MYERS & NEALSON, 1988; VENKATESWARAN et al., 1999; IVANOVA et al., 2003; TOFFIN et al., 2004; YOON et al., 2004; GAO et al., 2006; ZHAO et al., 2005, 2006; MIYAZAKI et al., 2006; XIAO et al., 2007; YANG et al., 2007; CHANG et al., 2008; SRAVAN KUMAR et al., 2010; HUANG et al., 2010; VERMA et al., 2011; KIM et al., 2012; LEE & YOON et al., 2012), ambientes aquáticos poluídos (XU et al., 2005), em ambientes com alta profundidade e abissais (NOGI et al., 1998; MIYAZAKI et al., 2006; BRETTAR et al., 2002; TOFFIN et al., 2004; YANG et al., 2006, 2007; XIAO et al., 2007), em amostras clínicas (BRINK et al., 1995; NOZUE et al., 1992; LEVIN, 1972; DEBOIS et al., 1975; HOLMES et al., 1975), no trato digestivo de animais (KIM et al., 2007; KIM et al., 2011; SATOMI et al., 2003), associado a animais (IVANOVA et al., 2004; LEE et al., 2006; SATOMI et al., 2006, 2007; SHNIT-ORLAND et al., 2010), em fluidos de campos petrolíferos (SEMPLE & WESTLAKE, 1987) e nins de carvão (XU et al., 2005; SRAVAN KUMAR et al., 2010).

O gênero *Shewanella*, segundo Yoon e colaboradores (2004) também é amplamente conhecido por poder atuar em várias áreas como biorremediador (HAU& GRALNICK, 2007), por apresentar ação biorremediadora co-metabólica de poluentes orgânicos halogenados (PETROVSKIS et al., 1994), degradação de petróleo bruto (SEMPLE & WESTLAKE, 1987) e redução dissimilatória de manganês e óxidos de ferro (MYERS & NEALSON, 1988), urânio (LOVLEY & PHILLIPS, 1988) e outros compostos (PERRY et al., 1993.; KOSTKA et al., 1996). Ainda, como um gênero os *Shewanella* é fisiologicamente diverso, podendo sobreviver em ambientes extremos e agressivos. À luz da sua fisiologia fascinante, estes organismos têm vários usos biotecnológicos, de biorremediação de compostos clorados, radionuclídeos, e outros poluentes ambientais, além da biocatálise na geração de energia (HAU&GRALNICK, 2007).

A *Shewanella algae* caracteriza-se por ser uma bactéria Gram negativa, com motilidade através de um flagelo polar, halofílica, crescendo entre 10°C a 40°C. Também são conhecidas por produzirem gelatinase, lipase e amilase, mas não ADNase, quitinase, ou alginase, além de possuírem conteúdo G+C 54 mol% presente no gene 16S rRNA (SIMIDU et al., 1990).

A *S. algae* é comumente isolada do trato digestivo de animais marinhos, principalmente em ambientes de cultivo de peixes e crustáceos. Apresenta ação lipolítica, proteolítica e amilolítica, sendo proposto como potencial probiótico para carcinicultura e piscicultura. Ademais a ação antagonica ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2012) e

resposta antimicrobiana em ampla gama de temperatura e pH contra os *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* (SHAKIBAZADEH et al., 2008).

A bactéria *S. algae* é capaz de reduzir PtCl (Cloreto de Platina) aquoso em platina elementar à temperatura ambiente e pH neutro dentro de 60 min quando fornecido o Lactato como doador de elétrons (KONISHIA et al., 2007a). A *S. algae* também pode promover a redução microbiana e deposição de nanopartículas de ouro a 25 °C entre os pH 2,0-7,0, num período de 30 min na presença de H<sub>2</sub>(hidrogênio) como o doador de elétrons. O pH da solução foi um fator importante no controle da morfologia das partículas de ouro biogênicas e o local de deposição do ouro. Este é potencialmente aplicável como uma alternativa ecológica aos métodos convencionais (KONISHIA et al., 2007b).

### 3.12. O gene 16S rRNA e a identificação molecular de bactérias

O emprego de técnicas moleculares com a finalidade de solucionar problemas taxonômicos e filogenéticos promoveu uma verdadeira revolução, aos métodos tradicionais, entre as décadas de 80 e 90. A partir de então a resolução destes problemas bacteriológicos passou a ser sanado com o auxílio do gene 16S rRNA (WEISBURG et al., 1991). Estes trechos altamente conservados em bactérias tem sido o fundamento para a revisão das inter-relações entre espécies, gêneros ou até mesmo famílias (OLSEN et al., 1994).

Vários fatores tornam os genes ribossômicos aptos a utilização em estudos filogenéticos, como exemplo, o fato de estarem presentes em todos os organismos vivos, possuírem estruturas secundárias altamente conservadas, são abundantes nas células sendo facilmente identificados e por fim, as diferenças nas sequências gênicas evoluem em taxas diferentes, o que permite análises taxonômicas e filogenéticas (WHITMAN et al, 2012; VANDAMME et al, 1996; WOESE, 1987, 1990).

Os genes que codificam para RNAs ribossômicos são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, uma vez que ocorre nas organelas responsáveis pela síntese protéica. A sequência destes genes corresponde a regiões altamente conservadas (AMANN et al., 1995). Desta forma, estudos tem utilizado o sequenciamento total ou parcial dos genes 16S rRNA e 23S rRNA, bem como regiões intergenicas (IGS) para estudos de filogenia (GURTLER & STANISH, 1996).

Os ribossomos são estruturas pequenas, com cerca de 20 a 30 nm de diâmetro, consistindo de duas subunidades de tamanhos desiguais, referentes às subunidades maior e menor. Uma subunidade é composta por um complexo formado por moléculas de RNA e

proteínas, cada molécula contém pelo menos uma subunidade de RNA ribossômico e uma grande quantidade de proteínas ribossomais. O ribossomo procarioto em *Escherichia coli* tem um tamanho de 70S e aproximadamente dois terços dele consiste de rRNA e o restante de proteínas ribossômicas. Assim, as subunidades 50S (contem o rRNA 16S) e 30S (contem os rRNAs 5S e 23S) combinadas originam a estrutura 70S (FIGUEIREDO et al., 2010).

Contudo, em alguns casos, como nos gêneros *Bradyrhizobium* (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006) e *Burkholderia* (COENEY et al., 2001) variações no gene 16S rRNA são muito baixas, o que torna difícil a identificação precisa ao nível de espécie. Adicionado ao fato de que em procariotos ocorre frequentemente o fenômeno conhecido como transferência horizontal de genes, gerando genomas extremamente dinâmicos (FIGUEIREDO et al., 2010; GEVERS et al., 2005).

Com a necessidade da identificação rápida e eficiente das bactérias presentes na carcinicultura, a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) mostra-se eficaz na identificação e enumeração específicas de bactérias. Mostrando-se uma ferramenta poderosa tanto para cultura mista quanto ambiental, combinando microscopia e discriminação filogenética molecular (SALSA et al., 2010). Uma das grandes vantagens da FISH é a ausência da necessidade de cultura bacteriana, uma vez que o procedimento é realizado com material fresco (WAAR et al., 2005).

### **3.13. Filogenia e bioinformática aplicada à bacteriologia**

#### **3.13.1. Filogenia**

Inicialmente usada para elucidar relações hierárquicas, a filogenética se expandiu, sendo hoje utilizada para diferentes propósitos, como criar novos grupos taxonômicos, reconstruir filogenias de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas (Biogeografia histórica), investigar a evolução de espécies que interagem entre si (hospedeiros e parasitas ou simbioses) e compreender melhor a dinâmica populacional (AVISE et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2007). Esse crescimento é sem dúvida decorrente do desenvolvimento de computadores modernos e programas robustos de bioinformática (SCHNEIDER et al., 2007).

Contudo, os métodos filogenéticos comumente utilizados não contam com hibridizações ou transferências genéticas horizontais por intermédio de vetores microbianos, evento muito comum em bactérias, uma vez que a especiação é completa (STEARNS & HOEKSTRA, 2003). Assim, dentre os principais obstáculos referente aos estudos

filogenéticos estão às taxas desiguais de evolução e a evolução convergente, no entanto, estes problemas vêm sendo minimizados a partir de análises especializadas e personalizadas para cada caso (FUTUYMA, 2003).

Alguns dos papéis cruciais da sistemática é classificar e descrever a história evolutiva dos organismos estudados. Segundo a hierarquia Lineliana estes organismos são classificados em acordo com sua espécie, gênero, família, ordem, classe, filo e reino. Estas categorias taxonômicas denominadas de táxons (FUTUYMA, 2003), também podem ser descritas como OTUs (Operational Taxonomic Units) que graficamente, em uma árvore filogenética, correspondem aos pontos (nós) ligados por linhas (ramos).

As árvores filogenéticas podem ser construídas a partir de caracteres discretas, qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança), como também por dados quantitativos (métodos de distância), podendo ou não ser enraizado. Contudo, o enraizamento permite a aplicação de conceitos de traços ancestrais ou plesiomorficos e traços derivados ou apomórficos (STEARNS & HOEKSTRA, 2003).

Para realizar uma reconstrução filogenética as sequências, primeiramente, têm de apresentar ancestralidade em comum, homologia. Dentre os três tipos de homologia a ortologia é observada quando as sequências têm um único e mesmo ancestral comum. Por outro lado, na paralogia origina-se de uma duplicação gênica e a xenologia quando se originam por incursão lateral (ou horizontal). Porém, apenas sequências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas dos organismos.

Para facilitar o estudo filogenético foram criadas algumas denominações como grupo monofilético, parafilético e polifilético. O primeiro é definido como grupo na qual todas as espécies pertencentes a este grupo são descendentes de um ancestral comum. Respectivamente, um grupo parafilético não contém todas as espécies descendentes de um ancestral. Por fim, é dito polifilético o grupo na qual todas as espécies ali contidas são descendentes de diversos ancestrais diferentes.

### **3.13.2. Bioinformática**

O conceito de bioinformática pode ser resumido como a utilização de técnicas advindas da matemática, estatística e computação para a análise de problemas de biologia. O termo bioinformática é um conceito relativamente recente, o qual apareceu na literatura pela primeira vez na década de 90. A biologia computacional é tradicionalmente concentrada em duas questões básicas: Onde estão os genes e quais são suas funções? Na verdade, estas

perguntas podem ser entendidas como uma tentativa de reproduzir *in silico* a maquinaria genético-molecular da célula (HAUBOLD & WIEHE, 2006).

A partir do crescimento e popularização do sequenciamento de DNA de genes até genomas foi necessário uma evolução conjunta dos bancos de dados genômicos. Atualmente existem diversos bancos de dados públicos disponíveis para pesquisa, dentre eles o GenBank (banco americano de DNA e proteínas), EBI (Banco de dados europeu de sequências de DNA), DDBJ (Banco japonês de DNA), PDB (Banco de dados oficial do genoma humano), TIGR Databases (Banco de dados de diversos organismos), PIR (Banco de proteínas anotadas), SWISS-PROT (Banco de dados de proteínas), INTERPRO (Banco de dados de proteínas) e KEGG (Banco de dados genômico e relações com vias metabólicas) (PROSDOCIMI, et al. 2002).

Com o advento da técnica de Sanger (1980) o sequenciamento de trechos de DNA começou a popularizar-se no meio acadêmico. A Técnica consiste da adição de didesoxirribonucleotídeos, que param o crescimento dos fragmentos de DNA na replicação. Posteriormente outras técnicas como o Pirosequenciamento, desenvolvido pela Roche Applied Sciences, apostam na captura de emissões de luz causadas pela luciferase, esta enzima, por sua vez, encontra-se acoplada à amplificação previamente fragmentado e aderido a microesferas utilizando sequências adaptadoras (MARGULIES, et al. 2005).

O alinhamento de sequências possui várias aplicações na bioinformática, esta operação é considerada uma das mais importantes na área. Um alinhamento múltiplo é uma hipótese de homologia posicional entre bases ou aminoácidos de genes ou proteínas de duas ou mais espécies. Existem dois tipos de alinhamento o global, na qual as sequências são alinhadas de um extremo a outro do alinhamento originando apenas um resultado, e o local, na qual procura-se alinhar as regiões mais conservadas independente da localização (PROSDOCIMI, et al. 2002).

As metodologias filogenéticas são essencialmente estatísticas e podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com seus critérios, podendo ser quantitativos (métodos de distância) ou qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança) (TAMURA, et al. 2013).

Nos métodos de distância, também conhecidos como métodos fenéticos, as diferenças entre duas sequências são reduzidas a uma só variável, neste caso o número de diferenças, não sendo relevantes suas relações filogenéticas (HAUBOLD & WIEHE, 2006). Existem diferentes modelos que podem ser utilizados para a construção de uma matriz de distância, como Distância P, Distância de Jukes-Cantor, Distância de Tajima e Nei, Distância Gama e

muitos outros (PROSDOCIMI, et al. 2002). A partir dessas matrizes pode ser reconstruída a árvore com os algoritmos UPGMA, Evolução Mínima e Neighbor-Joining (NJ), os mais conhecidos e utilizados em análises fenéticas (PROSDOCIMI, et al. 2002).

Partindo do princípio que a árvore é aditiva e ultramétrica o método UPGMA assume que todos os táxons são igualmente distantes da raiz, embora seja improvável. Por esta e outras razões, o UPGMA é raramente utilizado atualmente. O método de Agrupamento de Vizinhos é similar ao UPGMA na medida em que manipula uma matriz de distância, reduzindo seu tamanho a cada etapa e depois constrói a árvore baseado no conjunto de matrizes geradas. A principal diferença entre os dois métodos é que o NJ não forma agrupamentos, mas calcula diretamente as distâncias aos nós internos. Vale ressaltar que, ao contrário do UPGMA, o NJ não assume que todos os táxons são equidistantes da raiz (HAUBOLD & WIEHE, 2006). No método de ME, as medidas corretas das distâncias para múltiplos acessos nos mesmos locais são utilizados. A topologia mostra o menor valor da soma de todos os ramos (S) é escolhido como uma estimativa da árvore correta (TAMURA, et al. 2013).

Também existem métodos cladísticos, baseado em algoritmos heurísticos, para avaliar relações filogenéticas. Dentre eles a Máxima Parcimônia parte do princípio de que a melhor hipótese para explicar um processo é aquela que requer o menor número de passos (PROSDOCIMI, et al. 2002). O Método é baseado no princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica é porque essa foi herdada do último ancestral comum a ambos. Por sua vez, o método da Máxima Verossimilhança baseia-se na reconstrução filogenética através da busca por uma árvore que maximize a probabilidade dos dados observados. Portanto, encontrar a árvore mais verossímil envolve não somente a análise das topologias possíveis, mas também das variações de comprimento de ramos para cada topologia (HAUBOLD & WIEHE, 2006).

A Inferência Bayesiana realiza uma análise de regressão baseada em probabilidades futuras, a partir de tendências identificadas. Esta apresenta várias vantagens comparadas a outros métodos filogenéticos de inferência, destacando-se por sua fácil interpretação de resultados, capacidade de incorporar a análise e informações prévias, além de algumas vantagens computacionais. Existem vários softwares capazes de realizar a Inferência Bayesiana, dentre os mais comuns podem-se destacar o PAUP e o MrBAYES. O MrBAYES utiliza o Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para prever tendências nas árvores filogenéticas (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC. **Estatística Nacional**.Disponível em: <<http://www.abccam.com.br>>. Acesso em: 09 janeiro 2014.

ABCC; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA; GOVERNO FEDERAL. Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011. **Convênio ABCC/MPA: Nº 756578/2011**, p.11, 2013.

ALCAIDE, E.; BLASCO, M. D. & ESTEVE, Co-occurrence of drug-resistant bacteria in two european eel farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 3348- 3350. 2005.

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

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

AVISE, J.C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 371 ã 379, 1998.

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

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

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

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

BRETTAR, I.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M. G. *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.2211-2217, 2002.

BOTHE, H. et al. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. **FEMS Microbiology Review**, v.24, p.673-690, 2000.

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

BOWMAN, J. P. **Genus XIII. Shewanella** Macdonell and Colwell. 1986, 355VP (Effective publication: MacDonell and Colwell 1985, 180). Edited by D. J. Brenner, N. R. Crieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 480-491. 2005.

BOZAL, N., MONTES, M. J., TUDELA, E., JIMÉNEZ, F. & GUINEA, J. *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.195-205, 2002.

BRINK, A. J.; VAN STRATEN, A. & VAN RENSBURG, A. J. *Shewanella* (Pseudomonas) *putrefaciens* bacteremia. **Clin Infect Dis**, v.20, p.1327-1332. 1995.

BROWDY, C. L. et al. IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. **Journal of Crustacean Biology**, v.13, p.87-94, 1993.

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

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

CABELLO, F. C. Antibiotics and aquaculture in Chile: Implications for human and animal health. **Revista Medica de Chile**, v.132, p. 1001-1006. 2004.

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

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

CHANG, H. W.; ROH, S. W.; KIM, K. H.; NAM, Y. D.; JEON, C. O.; OH, H. M.; BAE, J. W. *Shewanella basaltis* sp. nov., a marine bacterium isolated from black sand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1907-1910, 2008.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W. & LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of clinical Microbiology**. Washington, DC. v.39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.

COLE, A. C.; SEMMENS, M. J. & LAPARA, T. M. Stratification of activity and bacterial community structure in biofilms grown on membranes transferring oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 1982-1989. 2004.

COSTA, A. C. **Pesquisa de vibrio no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do ceará**. Fortaleza, UFCE. 2006. p.18. Dissertação (Ciências Marinhas Tropicais).

DANTAS, D. et al. Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.1, p.85-90, jan.-mar. 2009.

DAVIES, D. G. & G. G. GEESEY. Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 860-867. 1995.

DEBNATH, P.; KARIM, M. & BELTON, B. Comparative study of the reproductive performance and White Spot Syndrome Virus (WSSV) status of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) collected from the Bay of Bengal. **Aquaculture**, v.424, p. 71-77. 2014.

DEBOIS, J., DEGREEF, H., VANDEPITTE, J. & SPAEPEN, J. *Pseudomonas putrefaciens* as a cause of infection in humans. **J Clin Pathol**, v. 28, p. 993-996. 1975.

DU, J.; OU, J.; LI, W.; DING, Z.; WU, T.; MENG, Q.; GU, W.; WANG, W. Primary hemocyte culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to the novel pathogen spiroplasma strain MR-1008. **Aquaculture**, v.330, p.21-28. 2012.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G. & CUZON, G. Capítulo 12 - Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. MIODRAG DARKO MATOVIC (Ed.), p.448. ISBN: 978-953-51-1106-1, InTech, DOI: 10.5772/53902. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-bft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-food-industry>. 2013.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Cultured aquatic species information programme. Disponível em :<[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en)>. Acesso em: 16 janeiro 2014

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

FAR, H. Z. et al. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, v.8 , n.14, p.3369-3376, July. 2009.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura, testes de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: EMBRAPA, v.1, 2010. BARCELLOS, F. G. & HUNGRIA, M. Parte 3: Técnicas moleculares e aplicações da genética nas áreas agrícolas. Capítulo 1: Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. p.190-221.

FUHRMAN, J. A. et al. Use of  $^{13}\text{N}$  as tracer for bacterial and algal uptake of ammonium from seawater. **Marine Ecology Progress Series**, v.45, p.271-278, 1988.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ed. 2º. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2003. 309p.

GAO, H.; OBRAZTOVA, A.; STEWART, N.; POPA, R.; FREDRICKSON, J. K.; TIEDJE, J. M.; NEALSON, K. H.; ZHOU, J. *Shewanella loihica* sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1911-1916, 2006.

GAUTHIER, G.; GAUTHIER, M.; CHRISTEN, R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. **International Journal of Systematic and Bacteriology**. 45, p.755-761, 1995.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP Analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobial* strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Washington, DC. v.56, p. 217-229, 2006.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L. & SWINGS, J. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, New York. v.3, p. 733-739, 2005.

GRAM, L.; TROLLE, G.; HUSS, H. H. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 uC) and high (20 uC) temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v4, p.65ñ72, 1987.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.121ñ137, 1996.

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

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

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 233, p. 1ñ14, 2004.

HARMSSEN, H. J.; AKKERMANS, A. D.; STAMS, A. J. & DE VOS, W. M. Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.2163ñ2168. 1996.

HAU, H. H. & GRALNICK, J. A. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p. 237-258. 2007.

HAUBOLD, B.; WIEHE, T. **Introduction to Computational Biology. An Evolutionary Approach**. Textbook, 328p. Birkhauser, Basel. Ed. 1º, p. 1-12. 2006.

HOLMES, B.; LAPAGE, S. P.; MALNICK, H. Strains of *Pseudomonas putrefaciens* from clinical material. **Jornal of Clinical Pathology**, V.28, P.149-155, 1975.

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

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

HUANG, J.; SUN, B.; ZHANG, X. *Shewanella xiamenensis* sp. nov., isolated from coastal sea sediment. Int. J. Syst. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.1585-1589, 2010.

HUANG, C. T.; XU, K. D.; MCFETERS, G. A. & STEWART, P. S. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p. 1526-1531. 1998.

HUANG, C. T.; YU, F. P.; MCFETERS, G. A. & STEWART, P. S. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p. 2252-2256. 1995.

HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics Applications Note**, v. 17, n. 8. p. 754-755. 2001.

IVANOVA, E. P.; SAWABE, T.; GORSHKOVA, N. M.; SVETASHEV, V. I.; MIKHAILOV, V. V.; NICOLAU, D. V.; CHRISTEN, R. *Shewanella japonica* sp.

nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1027–1033, 2001.

IVANOVA, E. P.; SAWABE, T.; HAYASHI, K.; GORSHKOVA, N. M.; ZHUKOVA, N. V.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; MIKHAILOV, V. V.; NICOLAU, D. V.; CHRISTEN, R. *Shewanella fidelis* sp. nov., isolated from sediments and sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.577-582, 2003.

IVANOVA, E. P.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; SAWABE, T.; ZHUKOVA, N. V.; FROLOVA, G. M.; NICOLAU, D. V.; MIKHAILOV, V. V.; BOWMAN, J. P. *Shewanella affinis* sp. nov., isolated from marine invertebrates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1089-1093, 2004.

IVANOVA, E. P.; GORSHKOVA, N. M.; BOWMAN, J. P.; LYSENKO, A. M.; ZHUKOVA, N. V.; SERGEEV, A. F.; MIKHAILOV, V. V.; NICOLAU, D. V. *Shewanella pacifica* sp. nov., a polyunsaturated fatty acidproducing bacterium isolated from sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1083–1087, 2004a.

IVANOVA, E. P.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; SAWABE, T.; ZHUKOVA, N. V.; FROLOVA, G. M.; NICOLAU, D. V.; MIKHAILOV, V. V.; BOWMAN, J. P. *Shewanella affinis* sp. nov., isolated from marine invertebrates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1089–1093, 2004b.

JHA, A. K. Probiotic technology : an effective means for Bioremediation in shrimp farming ponds. **Journal of Bangladesh Academy of Sciences**, v. 35, p. 237-240, 2011.

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

KIM, D.; BAIK, K. S.; KIM, M. S.; JUNG, B.; SHIN, T.; CHUNG, G.; RHEE, M. S.; SEONG, C. N. *Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2926–2931, 2007.

KIM, K.; KIM, Y.; PARK, S.; KANG, S.; NAM, B.; KIM, D. N.; OH, T.; YOON, J. *Shewanella upenei* sp. nov., Lipolytic Bacterium Isolated from Bensasi Goatfish *Upeneus bensasi*. **The Journal of Microbiology**, v.49, n.3, p.381-386, 2011.

KIM, S. J.; PARK, S. J.; OH, Y. S.; LEE, S. A.; SHIN, K. S.; ROH, D. H.; RHEE, S. K. *Shewanella arctica* sp. nov., an iron-reducing bacterium isolated from Arctic marine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1128-1133, 2012.

KONISHI, Y.; OHNOA, K.; SAITOHA, N.; NOMURAA, T.; NAGAMINEA, S.; HISHIDAB, H.; TAKAHASHIC, Y. & URUGAD, T. Bioreductive deposition of platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella algae*. **Journal of Biotechnology**, v.128, p. 648–653. 2007a.

KONISHI, Y.; TSUKIYAMA, T.; TACHIMI, T.; SAITOH, N.; NOMURA, T. & NAGAMINE, S. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 186–192. 2007b.

KOSTKA, J. E.; STUCKI, J. W.; NEALSON, K. H.; WU, J. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. **Clays Clay Miner**, v.44, p.522–529, 1996.

LEE, O. O.; LAU, S. C. K.; TSOI, M. M. Y.; LI, X.; PLAKHOTNIKOVA, I.; DOBRETISOV, S.; WU, M. C. S.; WONG, P.-K.; WEINBAUER, M.; QIAN, P. Y. *Shewanella irciniae* sp. nov., a novel member of the family *Shewanellaceae*, isolated from the marine sponge *Ircinia*

*dendroides* in the Bay of Villefranche, Mediterranean Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2871-2877, 2006.

LEE, M. H.; YOON, J. H. *Shewanella litorisediminis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a tidal flat sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.102, p.591-599, 2012.

LEQUETTE, Y. & GREENBERG, E. P. Timing and localization of rham- nolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 37-44. 2005.

LEVIN, R. E. Correlation of DNA base composition and metabolism of *Pseudomonas putrefaciens* isolates from food, human clinical specimens, and other sources. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 38, p.121-127. 1972.

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

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.J. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**. v.147, p.747-748. 1965.

LOEBMANN, D.; MAI, A. C. G.; LEE, J. T. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil. **Revista Biologia Tropical**. v.58, n.3, p.909-923, 2010.

LOVLEY, D. R.; PHILLIPS, E. J. P. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 54, p. 1472-1480, 1988.

LPSN ñ **List of Prokaryotic Names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/shewanella.html>. Acessado em: 31 de janeiro, 2014.

MACDONELL, M. T.; COLWELL, R. R. Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.6, p.171ñ182, 1985.

MAJORS, P. D.; MCLEAN, J. S.; PINCHUK, G. E.; FREDRICKSON, J. K.; GORBY, Y. A.; MINARD, K. R. & WIND, R. A. NMR methods for in situ biofilm metabolism studies. **Journal of Microbiology Methods**. v. 62. p. 337ñ344. 2005.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU1, L.; FIERRO1, J. M.; GOMES, X. V.; GOODWIN, B. C.; HE1, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK1, G. P.; JANDO, S. C.; ALLENQUER, M. L. I.; JARVIE1, T. P.; JIRAGE1, K. B.; KIM, J.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU1, P.; BEGLEY, R. F. & ROTHBERG, J. M. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. **Nature**. v.437, n.7057, p. 376ñ380, 2005.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N. & MARÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, n. 4, p. 315-32, 2006.

MINZ, D.; FLAX, J. L.; GREEN, S. J.; MUYZER, G.; COHEN, Y.; WAGNER, M.; RITTMANN, B. E. & STAHL, D. A. Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and

anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 4666-4671. 1999.

MIRANDA, C. D. & ZEMELMAN, R. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. **Aquaculture**, v. 212, p. 31-47. 2002.

MIYAZAKI, M.; NOGI, Y.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K. *Shewanella surugensis* sp. nov., *Shewanella kaireitica* sp. nov. and *Shewanella abyssi* sp. nov., isolated from deep-sea sediments of Suruga Bay, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1607-1613, 2006.

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

MORIARTY, D. J. W. Disease control in shrimp Aquaculture with probiotic bacterial. Microbial interactions in aquaculture. Microbial Biosystems: New Frontiers. **Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology**. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999.

MORIARTY, D. J. W. The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 151, p. 333-349, 1997.

MORIARTY, D. J. W.; DECAMP, O. & LAVENS, P. Probiotics in aquaculture. **AQUA Culture AsiaPacific Magazine**. Sep/Oct. p. 14-16. 2005.

MYERS, C. R. & NEALSON, K. H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. **Science**, v.240, p.1319-1321, 1988.

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

NEALSON, K. H.; MYERS, C. R.; WIMPEE, B. Isolation and identification of manganese reducing bacteria, and estimates of microbial manganese reducing potential in the Black Sea. **Deep Sea Research**, v.38, p.907-920, 1991.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A.H. & AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**. v.416, p.10, 2013.

NIELSEN, A. T.; TOLKER-NIELSEN, T.; BARKEN, K. B. & MOLIN, S. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. **Environmental Microbiology**. v. 2, p. 59-68. 2000.

NIMRAT, S.; SUKSAWAT, S.; BOONTHAI, T. & VUTHIPHANDCHAI, V. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 443-450. 2012.

NINAWA, A. S. & SELVIN, J. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, n.1, p.43-66. 2009.

NOGI, Y.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Taxonomic studies of deepsea barophilic *Shewanella* strains and description of *Shewanella violacea* sp. nov. **Archives Microbiology**, v.170, p.331-338, 1998.

NOZUE, H.; HAYASHI, T.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; HAMASAKI, K.; OHWADA, K. & TERAOKA, Y. Isolation and characterization of *Shewanella* alga from human clinical

specimens and emendation of the description of *S. alga* Simidu et al., 1990, 335. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 42, 628-634. 1992.

OKABE, S.; ITOH, T.; SATOH, H. & WATANABE, Y. Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic waste- water biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 5107-5116. 1999.

OLIVEIRA, S. S. et al. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "fluorescent *in situ* hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, Rio Grande, v.28,n.1. p. 33-45, 2006.

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

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

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. & SOTO, D. **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA). Curitiba, p. 171-173. 2007.

PARK, S.C.; BAIK, K.S.; KIM, M.S.; KIM, D. & SEONG, C.N. *Shewanella marina* sp. nov., isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.1888-1894, 2009.

PERRY, K. A.; KOSTKA, J. E.; LUTHER, G. W. III; NEALSON, K. H. Mediation of sulfur speciation by a Black Sea facultative anaerobe. **Science**, v.259, p. 801-803, 1993.

PETROVSKIS, E. A.; VOGEL, T. M. & ADRIAENS, P. Effects of electron acceptors and donors on transformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* MR-1. **FEMS Microbiol Lett**, v.121, p.357-364, 1994.

POULSEN, L. K.; BALLARD, G. & STAHL, D. A. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, p.1354-1360. 1993.

PROSDOCIMI, F.; COUTINHO, G.; NINNECW, E.; SILVA, A. F.; DOS REIS, A. N.; MARTINS, A. C.; DOS SANTOS, A. C. F.; NHANI JÚNIOR, A.; CAMARGO FILHO, F. Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n.29, p.12-25, 2002.

PURIVIROJKUL, W. Application of Probiotic Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria in Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* culture. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.13, p. 187-196. 2013.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P. & PICKUP, R. W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p. 3883-3890. 2000.

ROCHA, I. P. A importância da aquicultura e da carcinicultura no contexto da produção mundial de pescado: Desafios e oportunidades para o Brasil. **Revista da ABCC**. Ano 15, n.2, p. 16-24, 2013.

SÁ, T. D. Projeto de carcinicultura Salina Nova Vida Beberibe/CE. Ceará Aquacultura Ltda. Estudo de Impacto Ambiental (EIA). **Geoconsult Consultoria, Geologia e Meio Ambiente**, Fortaleza, v. 1, tomo A, 2003.

SALSA, L. C.; NEWMAN, M. M.; LILES M. R. Fluorescence In Situ Hybridization of Bacterial Cell Suspensions. doi: 10.1101/pdb.prot5493. **Cold Spring Harb protocol**, 2010.

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

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

SATOMI, M.; OIKAWA, H.; YANO, Y. *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.491-499, 2003.

SATOMI, M.; VOGEL, B. F.; GRAM, L.; VENKATESWARAN, K. *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.243-249, 2006.

SATOMI, M.; VOGEL, B. F.; VENKATESWARAN, K.; GRAM, L. Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.347-352, 2007.

SCHNEIDER, H. 2007. **Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. 2ª edição. Ribeirão Preto. Editora e Sociedade Brasileira de Genética p. 13-15.

SEMPLE, K. M. & WESTLAKE, D. W. S. Characterization of iron-reducing *Alteromonas putrefaciens* strains from oil field fluids. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.366-371, 1987.

SHAKIBAZADEH, S.; ROOS, S. C.; HAFEZIEH, M.; CHRISTIANUS, A.; KAMARUDIN M. S. & KAMARUZAMAN, S.A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. v.11, n.4. p. 849-866. 2012.

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

SHAKIBAZADEH, S.; SAAD, C. R.; SINAIAN, P.; KAMARUDIN, M. S.; SIJAM, K. & CHRISTIANUS, A. Assessment of possible human risk of probiotic application in shrimp farming. **International Food Research Journal**, v.18, p. 433-437. 2011.

SHNIT-ORLAND, M.; SIVAN, A.; KUSHMARO, A. *Shewanella corallii* sp. nov., a marine bacterium isolated from a Red Sea coral. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** , v.60, p.2293-2297, 2010.

SILVA, A. L. S. **Estudos ecogenômicos e bioprospectivos de *Shewanella* spp.** Natal, UFRN, p.30, 2009. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

SIMIDU, U.; KITA-TSUKAMOTO, K.; YAMASATO, T.; YOTSU, M. Taxonomy of Four Marine Bacterial Strains That Produce Tetrodotoxin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.331-336, 1990.

SKERRATT, J. H.; BOWMAN, J. P.; NICHOLS, P. D. *Shewanella olleyana* sp. nov., a marine species isolated from a temperate estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.2101-2106, 2002.

SOUZA, D. M.; SUITA, S. M.; LEITE, F. P. L.; ROMANO, L. A.; WASIELESKY, W. & BALLESTER, E. L. C. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero exchange system. **Aquaculture Research**. v.43, p. 1828-1837. 2012.

SRAVAN KUMAR, R.; SASI JYOTHSNA, T. S.; SASIKALA, C.; SEONG, C. N.; LIM, C. H.; PARK, S. C.; RAMANA, C. V. *Shewanella fodinae* sp. nov., isolated from a coal mine and from a marine lagoon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.1649-1654, 2010.

STENSTROM, I. M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p.601-618, 1990.

STEARNS, S. C. & HOEKSTRA, R. F. **Evolução: uma Introdução**. São Paulo: Atheneu Editora. ed. 1º, p. 240-250. 2003.

SUCHARITA, K.; SASIKALA, C.; PARK, S. C.; BAIK, K. S.; SEONG, C. N.; RAMANA, C. V. *Shewanella chilikensis* sp. nov., a moderately alkaliphilic gammaproteobacterium isolated from a lagoon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.3111-3115, 2009.

SUNG, H. R.; YOON, J. H.; GHIM, S. Y. *Shewanella dokdonensis* sp. nov., isolated from seawater **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1636-1643, 2012.

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

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

TEAL, T. K. **Studies of the Spatial Organization of Metabolism in *Shewanella oneidensis* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms**. Pasadena, California Institute of Technology. 2008. p.5. Tese (Doutorado em Biotecnologia).

TEAL, T. K.; LIES, D. P.; WOLD, B. J. & NEWMAN, D. K. Spatiometabolic Stratification of *Shewanella oneidensis* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n. 11, p. 7324. 2006.

TOFFIN, L.; BIDAULT, A.; PIGNET, P.; TINDALL, B. J.; SLOBODKIN, A.; KATO, C.; PRIEUR, D. *Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deepmarine sediment of the Nankai Trough. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1943-1949, 2004.

THORMANN, K. M.; DUTTLE, S.; SAVILLE, R. M.; HYODO, M.; SHUKLA, S.; HAYAKAWA, Y. & SPORMANN, A. M. Control of Formation and Cellular Detachment

from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. **Journal of Bacteriology**. v.188, n. 7, p. 2681-2691. 2006.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERBSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological Reviews**, Washington, DC. v.60, n.2, p.407-438, 1996.

VENKATESWARAN, K.; DOLLHOPF, M. E.; ALLER, R.; STACKEBRANDT, E.; NEALSON, K. H. *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.965-972, 1998.

VENKATESWARAN, K.; MOSER, D. P.; DOLLHOPF, M. E.; LIES, D. P.; SAFFARINI, D. A.; MACGREGOR, B. J.; RINGELBERG, D. B.; WHITE, D. C.; NISHIJIMA, M.; OTHER AUTHORS. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.705-724, 1999.

VERMA, P.; PANDEY, P. K.; GUPTA, A. K.; KIM, H. J.; BAIK, K. S.; SEONG, C. N.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. *Shewanella indica* sp. nov., isolated from sediment of the Arabian Sea **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, p.2058-2064, 2011.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

WAAR, K.; DEGENER, J. E.; VAN LUYN, M. J. & HARMSSEN, H. J. M. Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus*

*faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**. v. 54, p. 937-944. 2005.

WASIELESKY, W.; KRUMMENAEUR, D.; LARA, G.; FÓES, G. & POERSH, L. Cultivo de camarões em sistema de bioflocos: realidade e perspectivas. **Revista ABCC**, Ano 15, n.2, p.30-36, 2013.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIE, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. Washington, DC. v.173, p. 97-703, 1991.

WENTLAND, E. J.; STEWART, P. S.; HUANG, C. T. & MCFETERS, G. A. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. **Biotechnology Progress**. V.12, p. 316-321. 1996.

WERNER, E., ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; PITTS, B. & STEWART, P. S. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p.6188-6196. 2004.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, DC. v.51, p.221-271. 1987.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC. v.87, p.4576-4579, 1990.

WHEELER, P. A.; KIRCHMAN, D. L. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. **Limnology and Oceanography**, v.31, p.998-1009, 1986.

WHITCHURCH, C. B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P. C.; e Mattick, J. S.. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v.295, n.5559, p.1487, 2002.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W. & SUZUKI, K. I. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed, p. 1750.

XIAO, X.; WANG, P.; ZENG, X.; BARTLETT, D. H.; WANG, F. *Shewanella psychrophila* sp. nov. and *Shewanella piezotolerans* sp. nov., isolated from west Pacific deep-sea sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, 60–65, 2007.

XU, M.; GUO, J.; CEN, Y.; ZHONG, X.; CAO, W. & SUN, G. *Shewanella decolorationis* sp. nov., a dye-decolorizing bacterium isolated from activated sludge of a waste-water treatment plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.363–368. 2005.

XU, K. D.; STEWART, P. S.; XIA, F.; HUANG, C. T. & MCFETERS, G. A. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 4035–4039. 1998.

YANG, S. H.; KWON, K. K.; LEE, H. S.; KIM, S. J. *Shewanella spongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2879–2882, 2006.

YANG, S. H.; LEE, J. H.; RYU, J. S.; KATO, C.; KIM, S. J. *Shewanella donghaensis* sp. nov., a psychrophilic, piezosensitive bacterium producing high levels of polyunsaturated fatty acid, isolated from deep-sea sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.208–212, 2007.

YOON, J. H.; KANG, K. H.; OH, T. K.; PARK, Y. H. *Shewanella gaetbuli* sp. nov., a slight halophile isolated from a tidal flat in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.487ñ491, 2004.

YOSHIDA, A., & KURAMITSU, H. K. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (PgtfB:gfp) construct to monitor development. **Microbiology**. v.148, p.3385ñ3394. 2002.

ZHAO, J. S.; MANNO, D.; BEAULIEU, C.; PAQUET, L.; HAWARI, J. *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na<sup>+</sup>-requiring and hexahydro- 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading bacterium from marine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1511ñ1520, 2005.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação serão apresentados no artigo **Identificação e caracterização de cepas *shewanella algae* isoladas no cultivo heterotrófico de *litopenaeus vannamei* (boone, 1931)** (manuscrito), que será submetido à publicação para a **Aquaculture** (ISSN: 0044-8486) com fator de impacto 2,552 e classificação B1 pela CAPES 2012.



---

## 5. ARTIGO

### IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS *Shewanella algae* ISOLADAS NO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)

Rogério William Santos Portela<sup>a,b</sup>, Carolina Kropniczki Gouveia<sup>a,b</sup>, Arthur Lira Gabriel<sup>b</sup>, José de Paula Oliveira<sup>b</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>c</sup>, Ranilson de Souza Bezerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

<sup>b</sup>Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Laboratório de Biologia do Solo e Laboratório de Genoma, Bongi, 50761-000, Recife-PE, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Bioquímica e Biofísica, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Corresponding author:

Ranilson Souza Bezerra

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

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

E-mail: ransoube@uol.com.br

## RESUMO

*Shewanella algae* é uma bactéria comumente isolada do trato digestivo de animais marinhos, principalmente em ambientes de cultivo de peixes e crustáceos. Apresenta ação lipolítica, proteolítica, amilolítica e antagonismo a bactérias patogênicas, características de um potencial probiótico para carcinicultura e piscicultura. Este estudo teve por objetivo identificar potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas e estômago do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracteriza-las através de análises morfológicas, bioquímicas, produção de biofilme e antibiograma. A partir do cultivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei*, foram selecionadas as cepas IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252 para identificação através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e comparados ao *GenBank* e NCBI e RDP - *Seqmatch*. As cepas foram alinhadas a 45 espécies do gênero *Shewanella* e avaliadas filogeneticamente utilizando os métodos Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Quanto às análises morfológicas foram avaliados parâmetros de acordo com a similaridade a padrões estabelecidos. Os testes bioquímicos foram realizados com o auxílio dos kits BACTRAY (Labroclin®). Foram realizados ainda a avaliação da capacidade de formação de biofilme e o antibiograma as cepas bacterianas. O sequenciamento das cepas revelou alta similaridade a espécie *Shewanella algae*, utilizando o GenBank e o RDP-seqmath. A Inferência Bayesiana apresentou maior aporte estatístico e fidelidade dentre os métodos analisados. A *Shewanella upenei* apresentou alta similaridade as cepas estudadas, assim como a *S. algae*. As análises filogenéticas não descartam a hipótese de novas espécies para IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252. As cepas estudadas foram sensíveis aos antibióticos Ampicilina/Subactan, Ofloxacina e Tetraciclina. A caracterização fenotípica fortalece a hipótese de especiação para as cepas testadas. Portanto, a capacidade de formação de biofilme, adicionada ao alto potencial enzimático e antagonismo a patógenos, característico do gênero *Shewanella*, tornam estas cepas potenciais probióticos para carcinicultura.

**Palavras-chave:** carcinicultura; sistema heterotrófico, bactérias probióticas, *Shewanella algae*, 16S rRNA.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura é cotada como setor da indústria primária com maior perspectiva de evolução no panorama mundial (ROCHA, 2013). A carcinicultura não é diferente (BURGOS-HERNÁNDEZ et al., 2005), no entanto, o Brasil oscila quanto a produção no setor (ROCHA, 2013). Portanto, faz-se necessário a utilização de alternativas para tornar o setor mais competitivo no panorama mundial (EMERENCIANO et al., 2013).

A adoção do *Litopenaeus vannamei* como espécie alvo da carcinicultura brasileira foi decorrente do seu alto grau de rusticidade, rentabilidade, crescimento, conversão alimentar e grande aceitação no mercado internacional que, aliados às condições edafo-climáticas das diversas macro-regiões do Brasil e, de forma especial da Região Nordeste, possibilitaram o desenvolvimento do setor (ANDREATTA & BELTRAME, 2004).

Apontado como alternativa aos sistemas tradicionais, o sistema heterotrófico é considerado o sistema mais vantajoso em termos econômicos e sociais (EMERENCIANO et al., 2013). Wasielesky et al. (2013), por sua vez, acrescenta ainda que o sistema de bioflocos apresenta maior produtividade utilizando menos áreas de cultivo, é mais seguro, apresenta baixíssima ou nenhuma taxa de renovação da água, reduz a concentração de proteínas nas rações ofertadas, aumenta a oferta de alimento natural, as bactérias atuam como probiótico, apresenta menor impacto ambiental e ainda permitindo o cultivo em regiões afastadas da costa.

Este sistema também pode ser obtido através de probióticos, baseado no princípio da exclusão competitiva (GULLIAN et al., 2004; MORIARTY et al., 2005). O sistema de bioflocos é uma alternativa eficiente aos cultivos tradicionais, por promover a manutenção da qualidade da água, através da absorção de compostos nitrogenados, e também muito importante como fonte de alimento para camarões cultivados (EMERENCIANO et al., 2013; WASIELESKY et al., 2013).

Probióticos são microrganismos administrados por via oral, que propiciam benefícios à saúde, controle de patógenos, principalmente doenças bacterianas, atuando por exclusão competitiva e imunomodulação. Normalmente isolados do trato digestivo do próprio animal hospedeiro, os probióticos podem também melhorar o apetite e levar a um maior crescimento e melhor conversão alimentar (NEWAJ-FYZUL et al., 2013). Ainda, tem-se observado que a utilização de probiótico afim da inibição patogênica, incremento em taxas de crescimento, digestão e competência imunológica é crescente (MORIARTY et al., 2005; NAYAK, 2010).

No entanto, o grande obstáculo para a compreensão destas relações tem sido a dificuldade na identificação das bactérias devido às técnicas convencionalmente utilizadas (OLIVEIRA et al. 2006).

Em bactérias as relações filogenéticas e taxonômicas são avaliadas utilizando o gene 16S rRNA (WHITMAN et al, 2012; FIGUEIREDO et al., 2010; VANDAMME et al., 1996; WEISBURG et al., 1991; WOESE et al., 1987; WOESE et al., 1990). Os amplicons obtidos através da região 16S rRNA são seqüenciados e analisados usando um banco de dados na qual estão depositadas seqüências do gene 16S rRNA por meio de softwares apropriados, permitindo rápida identificação de bactérias com base em seqüências ribossomais (FIGUEIREDO et al., 2010).

Por sua vez, o Gênero *Shewanella* pertence à classe *Gammaproteobactérias*, ordem *Alteromonales* e família *Shewanellaceae*, compondo um grupo de bactérias gram-negativas, móveis, baciliforme, oxidase positiva, aeróbias não fermentativas e facultativas, bactérias aquáticas e comumente encontradas em ambiente marinho (KIM et al., 2007; BOWMAN, 2005; GAUTHIER et al., 1995; MACDONELL & COLWELL, 1985; VENKATESWARAN et al., 1999). O gênero têm sido encontrado em ambientes extremos e variados, inclusive áreas de baixa temperatura e em locais com histórico de contaminação por petróleo. O gênero *Shewanella* ainda é o mais estudado dentro do grupo das bactérias redutoras de ferro (SILVA, 2009), platina (KONISHIA et al., 2007<sup>a</sup>) e ouro (KONISHI et al., 2007<sup>b</sup>). Estudos realizados por Shakibazadeh et al. (2008) apontam *S. algae* como razoável resposta antimicrobiana em ampla gama de temperatura e pH contra os *Vibrio parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*, além de antagonismo frente ao *Vibrio harveyi* (SHAKIBAZADEH et al., 2012).

Por conseguinte, este estudo objetivou identificar e analisar filogeneticamente potenciais bactérias probióticas retiradas do hepatopâncreas e estômago do camarão cultivado em sistema heterotrófico, avaliar as relações filogenéticas das cepas com o gênero *Shewanella* e caracteriza-las fenotipicamente através de análises morfológicas, bioquímicas, além de estudar a capacidade de produção de biofilme e antibiograma.

## MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo heterotrófico do *L. vannamei* foi realizado na Estação de Aquicultura Continental Professor Johei Koike localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco

(UFRPE) em 2010. Contudo, o isolamento bacteriano, caracterização e identificação foram realizados nos Laboratório de Biologia do Solo e Genoma do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

### **Obtenção das cepas bacterianas competentes como probiótico**

As cepas foram inicialmente coletadas a partir do cultivo experimental realizado na UFRPE na qual foram obtidas amostras da água e camarões cultivados. Foram isoladas 233 cepas bacterianas. Posteriormente foram selecionadas as cepas mais promissoras, quanto à produção de probiótico, através de testes enzimáticos amilolíticos e proteolíticos, objetivando obter cepas potenciais probióticas na carcinicultura. Destas, foram selecionadas as cepas bacterianas IPA-S.51 (isolada do camarão), IPA-S.111 (isolada da água do cultivo) e IPA-S.252 (isolado do camarão) para caracterização morfológica e bioquímica, realização do antibiograma, identificação e análise filogenética.

### **Extração do DNA bacteriano**

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Grange (2005). As bactérias foram cultivadas em meio específico durante 48 h em temperatura de 30°C. As culturas de bactérias foram então lavadas por três vezes com solução salina (NaCl 0,85%). Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 400  $\mu$ L de TE 50:20 (5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 100 mL de água ultrapura). Foram adicionados 50  $\mu$ L de SDS (10 %) 10  $\mu$ L de Lisozima (5 mg/mL), 5  $\mu$ L de Proteinase K (20 mg/mL) e 1  $\mu$ L de RNase (10 mg/mL). A mistura foi homogeneizada lentamente por inversão e incubada a 37°C durante uma hora. Foram acrescentados 30  $\mu$ L de NaCl 0,25 M e 60  $\mu$ L de AcNa 0,3 M. As amostras foram homogeneizadas lentamente e deixadas em repouso por uma hora a 4°C. Em seguida foi realizada centrifugação a 13.200 g durante 15 min e o sobrenadante recolhido (aproximadamente 400  $\mu$ L) e transferido para tubos de 1,5 mL. Foi adicionado duas vezes o volume de Etanol 95% (800  $\mu$ L) e a incubação realizada em temperatura de -20°C overnight. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.200 g durante 15 min, o etanol foi descartado, os precipitados colocados para secar em temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h e, em seguida, ressuspendidos em água ultrapura estéril. O DNA extraído foi estocado a -20°C.

O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (Espectrofotômetro Bel® SPECTRO S05- comprimento de onda 260 nm) e sua integridade verificada por eletroforese horizontal (Loccus® LCH 12x14) em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X pH 8,0, a 110V (fonte Loccus® LPS 600V) durante 1 h 30min e corado com Syber Gold (Invitrogen®). Posteriormente visualizado e fotodocumentado (Loccus® L-PIX HE).

### **Amplificação e Sequenciamento das cepas**

Foram identificadas as bactérias IPA-S.51, IPA-S.111, IPA-S.252 e como bactéria testemunha, uma cepa de *Bacillus subtilis* ATCC6633 (B.S.) cedida pelo Departamento de Antibióticos da UFPE. A reação foi realizada utilizando os primers fD1 (5' - AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5' - AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), que correspondem a posição 8 ã 28 e 1526 ã 1542 respectivamente do gene 16S rRNA da *Escherichia coli* (Weisburg et al., 1991). A amplificação ocorre nas seguintes condições: 1x tampão PCR 10x, MgCl<sub>2</sub> (2,6 mM), dNTP (0,5 mM), 1 µM de cada *primer*, Taq DNA polimerase (2,5 U/µL), DNA (20 ng/µL) e o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 50 segundos a 92°C, 50 segundos a 62,3°C e 1 minuto e 45 segundos a 72°C; seguida de extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1,2% (p/v) com o marcador de massa 100pb DNA Ladder® (Invitrogen®) e purificados segundo Lyra (2001).

Após a purificação as bactérias foram encaminhadas à ACTGene Análises Moleculares LTDA®. Cada amostra de DNA foi sequenciada pelo primer fD1 (forward) e rD1 (reverse), sendo depositado em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL com 30 a 60 ng de DNA-molde e 4,5 pmol de primer em um volume final de 6 µL completado com água ultrapura (Mili-Q).

### **Identificação e estudo filogenético**

Com o auxílio do programa CodonCode Aligner® (2002 ã 2010) foi avaliada a qualidade das sequências através de seus respectivos eletroferogramas. Com o mesmo programa foram avaliadas a qualidade e criação de sequências consenso entre os fragmentos sequenciados. As sequências foram avaliadas pelo programa PHRED (Quality Base Calling) também presente no aplicativo CodonCode Aligner®, selecionando as sequências com PHRED

> 30. Que por sua vez avalia a probabilidade de erro no seqüenciamento, apresentando probabilidade de 1/1000 com PHRED igual a 30.

Para a criação do banco de dados dos isolados seqüenciados foi utilizado o programa online OligoCalculator® (<http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html>). Neste foram analisados o conteúdo de Guanina (G) e Citosina (C), tamanho do fragmento, temperatura TM (Melting Temperature) °C e peso molecular.

As seqüências obtidas foram comparadas no banco de dados NCBI-Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribossomal Data Base Project) - Seqmath (<http://rdp.cme.msu.edu/>) com o objetivo de identificar as cepas em nível de espécie. Para construção das árvores filogenéticas foram utilizadas as três (3) cepas em estudo (IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252), selecionados quarenta e cinco (45) representantes do gênero *Shewanella* e um (1) representante do gênero *Vibrio* (*Vibrio cholerae* não espécie tipo do gênero).

As sequencias do gene 16S rRNA foram obtidas pelo NCBI-Genbank na qual foram coletadas as seqüências dos representantes de cada espécie. O alinhamento das sequencias foi realizado utilizando o software Mega5® (Molecular Evolutionary Genetics Analysis - TAMURA et al., 2011) utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 2000) editando manualmente quando necessário. Foram construídas árvores para análises fenética e filogenética. Para a análise fenética foi construída uma árvore pelo método neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) com Mega6® (TAMURA et al., 2013), a confiabilidade da árvore foi mensurada por análise de bootstrap com 2000 simulações e editada com MEGA6® (TAMURA et al., 2013). A árvore filogenética foi construída pelo método Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood tree) com Mega6® (TAMURA et al., 2013), a confiabilidade da árvore foi mensurada por análise de bootstrap com 2000 repetições e editada com MEGA6® (TAMURA et al., 2013).

Também foram realizadas análises filogenéticas pelo método de Inferência Bayesiana (IB) utilizando o software MrBAYES®. Inicialmente foi realizado um teste para avaliar os modelos ideais para utilização da Inferência Bayesiana a partir do software Mega6® (TAMURA et al., 2013), posteriormente foi selecionado o modelo HKI +G+I (Hasegawa-Kishino-Yano). Os alinhamentos realizados no MEGA6® (TAMURA et al., 2013) foram exportados para o software MrBAYES® no formato NEXUS®. Posteriormente foi criada a árvore filogenética a partir de um milhão (1.000.000) de repetições. A árvore foi visualizada e editada no software FigTree® v1.3.1 (ANDREW RAMBAUT, 2006-2009).

## **Caracterização fenotípica das cepas de *S. algae* selecionadas**

### **Crescimento bacteriano e análise morfológica das cepas**

As cepas S.51, S.111 e S.252 foram submetidas aos meios de cultura AM HIMEDIA® (Agar Marinho ã ZOBELL, 1941), LB (Luria & Bertani), Mueller-Hinton HIMEDIA® (Mueller & Hinton, 1941) TSA HIMEDIA® (Trypticase Soy Agar) e TCBS HIMEDIA® (Agar de Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose - KOBAYASHI, 1963) avaliando-se o crescimento entre 4°C a 57°C. A dinâmica de crescimento bacteriano foi realizada utilizando as cepas em estudo em meio LB líquido (pH 8.0, NaCl 25%, Temperatura 30°C, 2000 RPM por 60h) e avaliando o crescimento bacteriano a cada 4h, utilizando espectrofotômetro (Espectrofotômetro Bel® SPECTRO S05- comprimento de onda 660 nm).

As cepas foram avaliadas de acordo com a similaridade aos padrões já estabelecidos de forma, borda, elevação, superfície, consistência, cor, luz transmitida e refratada. Decorrente do crescimento bacteriano em meio sólido (Muller-Hilton) por 24h em estufa a 30°C.

### **Testes bioquímicos**

A técnica com coloração de Gram foi realizada em meio específico (AM) para incubação em estufa bacteriológica por 24h a 30 °C. As lâminas com os esfregaços bacterianos foram submetidas aos seguintes reagentes para avaliação do perfil de coloração: cristal violeta (corante primário), iodo-lugol (mordente), etanol (agente descolorante) e safranina (contrastante). As Gram-negativas garantiram uma cor rósea ou avermelhada e as Gram-positivas, púrpura (TORTORA, 2010).

Os testes para Catalase e Oxidase iniciaram-se com o crescimento das cepas em meio sólido LB por 24h. Ademais, o teste de Catalase desenvolveu-se através da adição de 50µl de peróxido de hidrogênio no esfregaço bacteriano e verificação da produção de gás. O teste de Oxidase realizou-se utilizando as fitas para determinação de oxidase (Probac do Brasil®), avaliando a mudança de coloração do esfregaço bacteriano.

Outros testes bioquímicos foram realizados com o auxílio dos kits BACTRAY I, BACTRAY II e BACTRAY III (Laborclin®). Executou-se um total de 30 testes bioquímicos. Após crescimento de 24h as cepas foram suspendidas em água destilada autoclavada na concentração final semelhante a 0,5 McFarland. Posteriormente, as análises foram realizadas

219 em acordo com o protocolo estabelecido pela Laborclin®, realizando três repetições para cada  
220 teste.

### 221 **Antibiograma das cepas selecionadas**

222 Na realização do antibiograma, as bactérias foram incubadas a 37°C por 24h.  
223 Posteriormente, foi realizada a suspensão bacteriana de 1mL à 0,5 McFarland e aplicadas à  
224 técnica de Kirby e Bauer, com três repetições. Entre as classes de antibióticos utilizados estão  
225 os •-Lactâmicos (Amoxicilina, Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ácido Clavulânico,  
226 Penicilina, Ampicilina e Oxacilina), Tetraciclina (Tetraciclina), Macrolídeos (Azitromicina),  
227 Quinonas (Ofloxacina), Glicopeptídeos (Vancomicina), Aminoglicosídeos (Amicacina),  
228 Fenicóis (Clorofenicol) e Polipeptídeos (Bacitracina), Laborclin®. Para aferição do halo de  
229 inibição foi utilizado paquímetro digital Zaas Precision®(300mm).

### 230 **Produção de Biofilme**

231 A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo Christensen  
232 et al. (1982). Na qual as cepas foram inoculadas em 10ml de meio LB líquido por 24h a 30°C  
233 em crescimento estático. Posteriormente os tubos foram esvaziados e corados com corante  
234 Cristal violeta 0,1% por 1 minuto. Sendo realizada quatro (4) repetições para cada tratamento.

235

## 236 **RESULTADOS**

237 As bactérias isoladas apresentaram crescimento nos meios de cultura Agar marinho,  
238 TCBS, TSA, Mueller- Hinton, LB sólido e líquido (pH 8.0 e NaCl 25%). As cepas IPA-S.51,  
239 IPA-S.111 e IPA-S.252 obtiveram crescimento a partir de 8°C. A cepa IPA-S.51 obteve  
240 crescimento até 54°C nos meios supracitados. As cepas IPA-S.111 e IPA-S.252 apresentaram  
241 crescimento até 46°C nos meios AM e LB, e 44°C para todos os meios analisados. Quando as  
242 fases decrescimento bacteriano, as cepas mantiveram-se na fase Lag até 8h de crescimento. A  
243 fase Log apresentou-se a partir das 8h até às 18h de crescimento. A fase Estacionária entre as  
244 18h e 48h. A fase de morte foi observada a partir das 48h até o final do ciclo de crescimento  
245 (60h). A cepa com maior taxa de crescimento foi a IPA-S.111 com D.O. igual a 3,278 em  
246 54h, seguida da IPA-S.252 (D.O. 3,212 em 54h) e IPA-S.51 (D.O. 2,509 em 54h).

247 Os resultados morfológicos obtidos referentes às cepas IPA-S.111 e IPA-S.252  
248 descrevem-nas como Baciliformes, apresentando tamanho entre 1mm e 2mm, com forma  
249 circular, borda lisa, com colônias homogenias, de cor Laranja, e translúcidas, apresentando

elevação do tipo Drop-Like (forma de gota), com consistência butírica, muco escasso e com pouco elasticidade, alterando o pH do meio para básico (Tabela 1).

Tabela 1. Morfologia das cepas bacterianas analisadas.

| Morfologia        | IPA-S.51    | IPA-S.111   | IPA-S.252   |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| Forma Bactéria    | Baciliforme | Baciliforme | Baciliforme |
| Tamanho Colônia*  | > 2mm       | 1-2mm       | 1-2mm       |
| Forma             | Irregular   | Circular    | Circular    |
| Borda             | Lobulada    | Lisa        | Lisa        |
| Homogeneidade     | Homogênia   | Homogênia   | Homogênia   |
| Cor               | Branca      | Laranja     | Laranja     |
| Trasparência      | Opaca       | Translúcida | Translúcida |
| Elevação          | Plana       | Drop-like   | Drop-like   |
| Consistência      | Viscosa     | Butírica    | Butírica    |
| Muco              | Abundante   | Escasso     | Escasso     |
| Alteração no meio | Básico      | Básico      | Básico      |
| Elasticidade      | Muito       | Pouco       | Pouco       |

(\*) Avaliação em 24h de crescimento.

Os resultados da cepa IPA-S.51 caracterizam-na com uma bactéria baciliforme, com tamanho superior a 2mm, em 24h de crescimento, apresenta forma irregular, com borda lobulada, com colônias homogenias, com cor branca, opaca, possuindo elevação plana, consistência viscosa, muco abundante e muito elástica, alterando o pH do meio para básico (Tabela 1).

Os resultados observados no teste de Gram classificam todas as cepas como Gram Negativas. Os testes da Catalase e Oxidase foram positivos para todas as cepas analisadas (Tabela 2). Contudo os demais testes bioquímicos apresentara resultados distintos para cada cepa.

A cepa IPA-S.51 apresentou testes positivos para •-Galactosidase (ONPG), Arginina desidrogenase (ADH), Lisina descarboxilase (LDC), Ornitina descrboxilase (ODC), Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), Escurina (ESC), Arginina (CTL) e Arginina Dehidrolase (ARG). Apresentando resultados negativos para os demais testes (Tabela 2).

Os testes bioquímicos realizados com a cepa IPA-S.111 foram positivos para •-Galactosidase (ONPG), Arginina desidrogenase (ADH), Lisina descarboxilase (LDC), Ornitina descrboxilase (ODC), Urease (URE), Acetoina (VP), Citrato (CIT), Arabinose (ARA), Escurina (ESC), Arginina (CTL) e Arginina Dehidrolase (ARG), sendo negativo para os demais testes (Tabela 2).

Nos resultados bioquímicos obtidos pela cepa IPA-S.252 foram positivos os testes da Arginina desidrogenase (ADH), Lisina descarboxilase (LDC), Ornitina descarboxilase (ODC), Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), Arabinose (ARA), Escurina (ESC), Arginina (CTL) e Arginina Dehidrolase (ARG), apresentando demais testes negativos (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização Bioquímica.

| Testes Bioquímicos                       | Cepas Bacterianas |           |           |
|------------------------------------------|-------------------|-----------|-----------|
|                                          | IPA-S.51          | IPA-S.111 | IPA-S.252 |
| Teste Gram*                              | N                 | N         | N         |
| Catalase*                                | P                 | P         | P         |
| Oxidase*                                 | P                 | P         | P         |
| • -Galactosidase (ONPG)                  | P                 | N         | P         |
| Arginina Desidrogenase (ADH)             | P                 | P         | P         |
| Lisina descarboxilase (LDC)              | P                 | P         | P         |
| Ornitina descarboxilase (ODC)            | P                 | P         | P         |
| Sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S) | N                 | P         | P         |
| Urease (URE)                             | P                 | N         | N         |
| Acetoina (VP)                            | P                 | N         | N         |
| Adesaminação da fenilalanina (PD)        | N                 | N         | N         |
| Indol (IND)                              | N                 | N         | N         |
| Citrato (CIT)                            | P                 | N         | N         |
| Malonato (MAL)                           | N                 | N         | N         |
| Rhamnose (RAM)                           | N                 | N         | N         |
| Adonitol (ADO)                           | N                 | N         | N         |
| Salicina (SAL)                           | N                 | N         | N         |
| Arabinose (ARA)                          | P                 | P         | N         |
| Inositol (INO)                           | N                 | N         | N         |
| Sorbitol (SOR)                           | N                 | N         | N         |
| Sacarose (SAC)                           | N                 | N         | N         |
| Manitol (MAN)                            | N                 | N         | N         |
| Rafinose (RAF)                           | N                 | N         | N         |
| Cetrimide (CET)                          | N                 | N         | N         |
| Acetamida (ACE)                          | N                 | N         | N         |
| Maltose (MLT)                            | N                 | N         | N         |
| Esculina (ESC)                           | P                 | P         | P         |
| Arginina (CTL)                           | P                 | P         | P         |
| Arginina dehidrolase (ARG)               | P                 | P         | P         |

(\*) Testes realizados individualmente.

( ) Testes realizados no BACTRAY®.

Os testes bioquímicos realizados com a cepa IPA-S.111 foram positivos para • -Galactosidase (ONPG), Arginina desidrogenase (ADH), Lisina descarboxilase (LDC),

Ornitina descarboxilase (ODC), Urease (URE), Acetoina (VP), Citrato (CIT), Arabinose (ARA), Escurina (ESC), Arginina (CTL) e Arginina Dehidrolase (ARG), sendo negativo para os demais testes (Tabela 2).

Nos resultados bioquímicos obtidos pela cepa IPA-S.252 foram positivos os testes da Arginina desidrogenase (ADH), Lisina descarboxilase (LDC), Ornitina descarboxilase (ODC), Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), Arabinose (ARA), Escurina (ESC), Arginina (CTL) e Arginina Dehidrolase (ARG), apresentando demais testes negativos (Tabela 2).

Quanto aos testes de produção de biofilme utilizados (CHRISTENSEN, et al. 1982) as cepas IPA-S.51 e IPA-S.252, isoladas do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei*, foram positivas na produção do biofilme bacteriano. Contudo, referente à aderência ao substrato, diferente da cepa IPA-S.252, a cepa IPA-S.51 apresentou pouca aderência. Por sua vez, a cepa IPA-S.111 apresentou resultado negativo por obter baixíssima produção de biofilme. Em todas as quatro (4) repetições os resultados foram idênticos para cada cepa.

Tabela 3. Antibiógrama das cepas estudadas.

| Antibiótico                  | IPA-S. 51       | IPA-S. 111       | IPA-S. 252      |
|------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Bacitracina                  | 0               | 0                | 0               |
| Amoxicilina (10µg)           | 3,55 mm ± 1,04  | 8,82 mm ± 0,55   | 0               |
| Clorafenicol (30µg)          | 11,49 mm ± 0,53 | 12,2 mm ± 1,22   | 9,52 mm ± 0,15  |
| Amicacina (30µg)             | 9,91 mm ± 1,12  | 8,20 mm ± 0,77   | 7,77 mm ± 0,75  |
| Vancomicina                  | 8,24 mm ± 0,34  | 2,79 mm ± 0,77   | 1,24 mm ± 0,42  |
| Ampicilina/Sulbactam (10µg)* | 10,36 mm ± 0,67 | 11,00 mm ± 0,80  | 7,78 mm ± 0,62  |
| Amox./Ac. Clavulânico(30µg)  | 10,43 mm ± 0,58 | 10,52 mm ± 0,57  | 4,88 mm ± 1,79  |
| Ofloxacina (5µg)*            | 12,04 mm ± 0,36 | 9,31 mm ± 1,46   | 11,42 mm ± 1,51 |
| Azitromicina (15µg)          | 12,71 mm ± 0,65 | 13,86 mm ± 2,49  | 9,22 mm ± 0,67  |
| Tetraciclina (30µg)          | 6,71 mm ± 1,55  | 9,24 mm ± 0,13   | 6,07 mm ± 0,43  |
| Penicilina (10µg)            | 5,38 mm ± 1,39  | 8,26 mm ± 0,72   | 1,25 mm ± 1,09  |
| Ampicilina (10µg)            | 5,22 mm ± 0,46  | 10,52 mm ± 0,086 | 1,52 mm ± 1,64  |
| Oxacilina (1µg)              | 6,28 mm ± 0,24  | 0                | 0               |

Desvio padrão 1%.

() Concentração dos antibióticos.

(\*) Antibióticos eficazes contra as cepas testadas.

Dentre os resultados observados na realização do antibiógrama a Bacitracina mostrou-se ineficaz nas três bactérias testadas, somando-se a Oxacilina (IPA-S.111, IPA-S.252) e Amoxicilina (IPA-S. 252), com halo de inibição igual a zero. O maior halo de inibição foi

obtido com a IPA-S.51, submetida à Azitromicina, no entanto foi possível observar a presença de ação seletiva. Contudo a Azitromicina apresentou-se sensível para as duas outras bactérias. Todas as cepas apresentaram sensibilidade a Ampicilina, porém a IPA-S.51 e IPA-S.252 com halos inibitórios muito curtos. As bactérias IPA-S. 51, IPA-S. 111 e IPA-S. 252 mostraram-se sensíveis frente aos antibióticos: Tetraciclina, Ofloxacina e Ampicilina/Sulbactam (Tabela 3).

Os resultados obtidos no sequenciamento do gene 16S rRNA apontaram alta qualidade nos eletroferogramas obtidos. As cepas IPA-S.51, IPA-S.111, IPA-S.252 e o *Bacillus subtilis* apresentaram respectivamente valor do PHRED igual a 652, 665.5, 714 e 719.5 (Tabela 4), todos maiores que o valor mínimo recomendado (PHRED 30). Quanto ao conteúdo G/C o *Bacillus subtilis* apresentou concentração G/C 55%, contudo as demais cepas apresentaram G/C igual a 54% (Tabela 1). A temperatura Melting ( $T_m$ ) observado foi 86.4 (S.51), 86.8 (S.111), 86.7 (S.252) e 86.9 (*B. subtilis*). Todas as cepas apresentaram contigs com tamanho superior a 1400pb (Tabela 4).

Na identificação das cepas foram contabilizados os 20 primeiros acessos de cada contig blastado nos bancos de dados genéticos NCBI/GenBank e RDP-Seqmach. O contig da cepa S.51 foi altamente similar a *Shewanella algae* JF414773.1 (acesso melhor pontuado segundo parâmetros do GenBank) quando blastada no NCBI/GenBank e identificada com *Shewanella algae* no RDP-Seqmach (Tabela 4). Quando acessados no GenBank apresentaram frequência de 41% em acessos de *Shewanella algae*, 33% em acessos identificados como *Shewanella* sp. e 26% com outras denominações (Uncultured Bacterium, Bacteria, outras espécies). Comparados ao RDP-Seqmach as cepas apresentaram similaridade a acessos de *Shewanella algae* com frequência de 70%, *Shewanella* sp. em 25% e a *Shewanella upenei* em 5%.

A cepa IPA-S.111 apresentou alta similaridade a acessos de *Shewanella algae* em ambos os bancos de dados (Tabela 4). Tendo no NCBI/GenBank similaridade de 40% a acessos identificados como *Shewanella algae*, 33% como *Shewanella* sp., 7% como *Shewanella haliotis* e similar em 20% a acessos com outras identificações. No RDP-Seqmach apresentou similaridade em 60% a acessos de *Shewanella algae*, 20% em acessos de *Shewanella* sp., 10% como *Shewanella haliotis* e 10% de similaridade a acessos com outras denominações.

A cepa IPA-S.252 foi altamente similar a *Shewanella algae* GQ372874.1 (acesso melhor pontuado segundo parâmetros do GenBank), mesmo acesso obtido quando blastada a cepa IPA-S.111 (Tabela 4). Quando submetida ao NCBI/GenBank apresentou frequência de 37% a acessos identificados como *Shewanella algae*, 35% como *Shewanella* sp. e 28% com acessos identificados com outras denominações. Utilizando o RDP-SeqMath obteve-se 45% dos acessos identificados como *Shewanella algae*, 30% como *Shewanella* sp. e 25% outros.

As análises fenéticas utilizando o método neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) resultaram no agrupamento visível na Figura 1. O agrupamento realizado apresentou topologia semelhante à árvore filogenética criada através do método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood tree), este presente na Figura 2. Objetivando facilitar o entendimento das mudanças topológicas do agrupamento e árvore realizados, estes foram subdivididos em cinco (5) grupos.

Tabela 4: Análise das sequências e identificação através do NCBI/GenBank e RDP.

| Cepas                  | PHRED* | G/C | Tm°  | Tamanho | NCBI/GenBank**                                          | RDP-SeqMath**                                 |
|------------------------|--------|-----|------|---------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| IPA-S.51 <sup>A</sup>  | 652    | 54  | 86.4 | 1442    | <i>Shewanella algae</i> [JF414773.1]                    | <i>Shewanella algae</i> [X81622]              |
| IPA-S.111              | 665,5  | 54  | 86.8 | 1455    | <i>Shewanella algae</i> [GQ372874.1]                    | <i>Shewanella algae</i> [U91547]              |
| IPA-S.252 <sup>A</sup> | 714    | 54  | 86.7 | 1480    | <i>Shewanella algae</i> [GQ372874.1]                    | <i>Shewanella algae</i> [X81622]              |
| B.S.                   | 719,5  | 55  | 86.9 | 1471    | <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> [CP002183.1] | <i>B. subtilis subsp. subtilis</i> [AB018486] |

(\*) Média do Base Calling das sequências Forward e Reverse baseado no PHRED.

(\*\*) Acessos melhor pontuados em cada banco de dados.

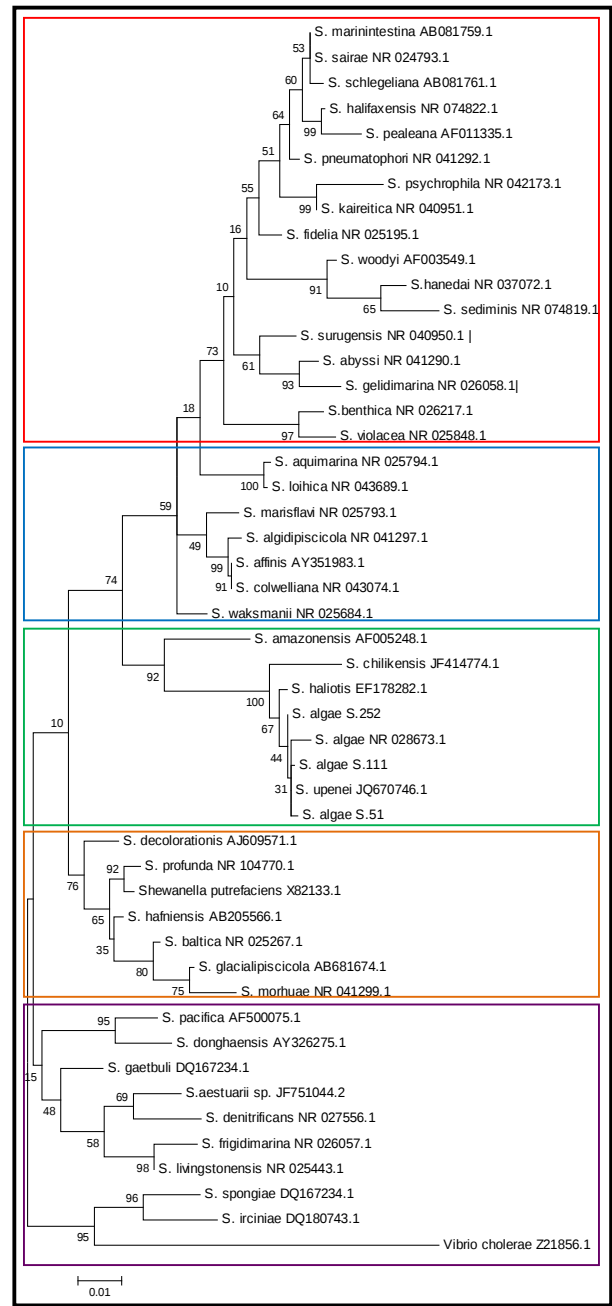
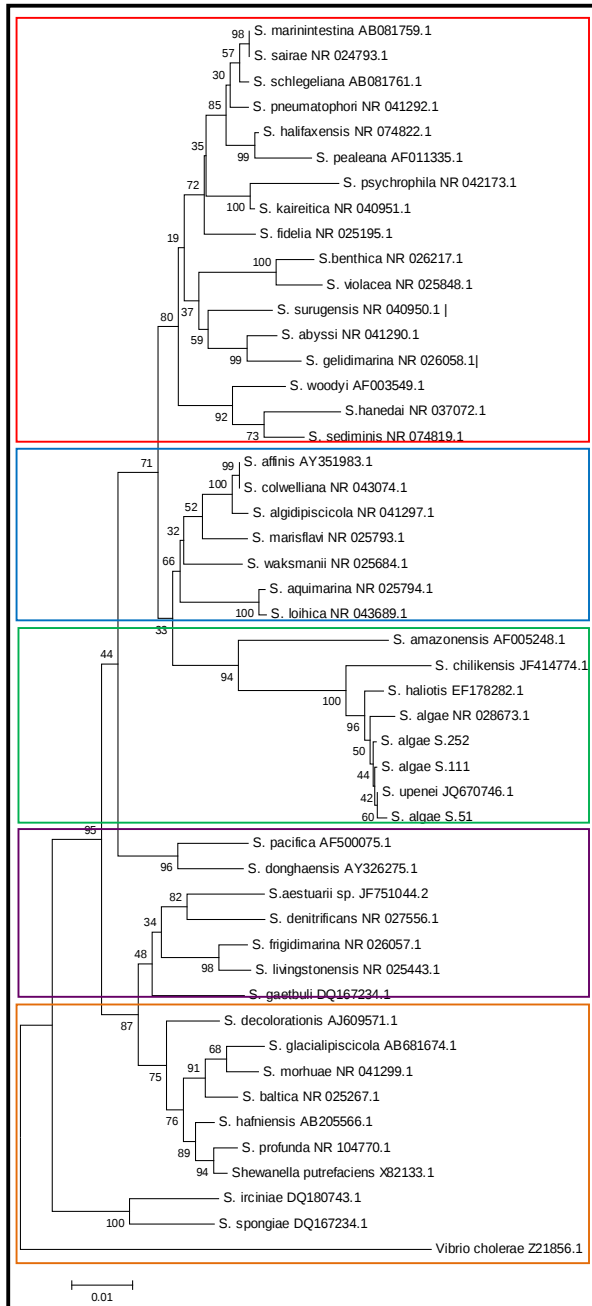
(A) Cepas bacterianas encontradas no hepatopâncreas e estômago do camarão.

O grupo 1 é composto pelas espécies *S. marinintestina* AB081759.1, *S. sairae* NR 024793.1, *S. schlegeliana* AB081761.1, *S. halifaxensis* NR 074822.1, *S. pealeana* AF011335.1, *S. pneumatophori* NR 041292.1, *S. psychrophila* NR 042173.1, *S. kaireitica* NR 040951.1, *S. fidelia* NR 025195.1, *S. woodyi* AF003549.1, *S. hanedai* NR 037072.1, *S. sediminis* NR 074819.1, *S. surugensis* NR 040950.1, *S. abyssi* NR 041290.1, *S. gelidimarina* NR 026058.1, *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 (Figura 1 e 2). Quanto as mudanças na topologia do agrupamento e árvore filogenética, a *S. pneumatophori* NR 041292.1, no agrupamento observado no sub-ramo suportado estatisticamente por Bootstrap30 (Figura 1) foi deslocado um ramo abaixo na árvore de Máxima Verossimilhança, pelas espécies *S. halifaxensis* NR 074822.1 e *S. pealeana* AF011335.1 (Figura 2). Outra mudança observada no grupo 1 é a substituição ocorrida no ramo suportado estatisticamente por Bootstrap 19 (Figura 1). As espécies *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1

368 foram trocadas de posição com *S. woodyi* AF003549.1, *S. hanedai* NR 037072.1 e *S.*  
 369 *sediminis* NR 074819.1 (Figura 2).

370 Figura 1. Agrupamento por neighbor-joining.

Figura2.Árvore MáximaVerossimilhança.



371

372 ■ Grupo 1

373 ■ Grupo 2

374 ■ Grupo 3

375 ■ Grupo 4

376 ■ Grupo 5

377

No grupo 2 estão presentes os acessos *S. affinis* AY351983.1, *S. colwelliana* NR 043074.1, *S. algidipiscicola* NR 041297.1, *S. marisflavi* 025793.1, *S. waksmanii* NR 025684.1, *S. aquimarina* NR 025794.1 e *S. loihica* NR 043689.1, grupo passivo de várias alterações na topologia (Figura 1 e 2). O agrupamento apresentou apenas um ramo principal (Figura 1) enquanto a filogenia foi possível observar três (3) subdivisões (Figura 2). No agrupamento o ramo superior sustentado pelo Bootstrap 52 (Figura 1) foi deslocado para uma zona medial na árvore filogenética (Figura 2). Logo abaixo no ramo com Bootstrap 32 (figura 1) a espécie *S. waksmanii* NR 025684.1 foi posicionada, na árvore filogenética, como a espécie plesiomórfica do grupo 2 (Figura 2). Por fim, as espécies *S. aquimarina* NR 025794.1 e *S. loihica* NR 043689.1 também localizadas no ramo com Bootstrap 32 (Figura 1), basais no agrupamento, foram posicionadas como as espécies apomórficas do grupo 2 (Figura 2).

O grupo 3 é representado pelas cepas IPA-S.51, IPA-S.252 e IPA-S.111 e os acessos *S. amazonensis* AF005248.1, *S. chilikensis* JF414774.1, *S. haliotis* EF178282.1, *S. algae* NR 028673.1 e *S. upenei* JQ670746.1 (Figura 1 e 2). Diferente do método neighbor-joining (Figura 1), na máxima Verossimilhança é possível observar a formação de um clado representado pelos taxons *S. algae* NR 028673.1, IPA-S.111, *S. upenei* JQ670746.1 e IPA-S.51, a partir da IPA-S.252 com bootstrap 31 (Figura 2).

Não obstante, o grupo 4 composto pelas espécies *S. pacifica* AF500075.1, *S. donghaensis* AY326275.1, *S. aestuarii* JF751044.2, *S. denitrificans* NR 027556.1, *S. frigidimarina* NR 027556.1, *S. livingstonensis* NR 025443.1 e *S. gaetbuli* DQ 167234.1 (Figura 1), foi deslocado, na filogenia, para o grupo 5 acrescida da alteração topográfica do acesso *S. gaetbuli* DQ 167234.1 (Figura 2).

Por fim, o grupo 5 é constituído pelos acessos *S. decolorationis* AJ609571.1, *S. glaciopiscicola* AB681674.1, *S. morhuase* NR 041299.1, *S. baltica* NR 025267.1, *S. hafniensis* AB205566.1, *S. profunda* NR 104770.1, *Shewanella putrefaciens* X82133.1, *S. irciniae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1 e o acesso *Vibrio cholerae* Z21856.1 como grupo externo (Figura 1).

Estes, por sua vez, foram deslocados, quando comparados ao método de Máxima Verossimilhança (Figura 2), para o grupo 4. Sendo preservados apenas os táxons *S. irciniae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1 e o grupo externo *Vibrio cholerae* Z21856.1 (Figura 2). Contudo, foi possível observar algumas alterações topológicas entre o agrupamento e o método de Máxima Verossimilhança. No entanto estas alterações não abalaram a estrutura, preservando a interpretação fenética e filogenética, em respectivas análises.

A Inferência Bayesiana (IB) realizada apresentou algumas variações na estrutura da árvore comparada ao método de Máxima verossimilhança (MV), ainda, apresentando ramos com maior suporte estatístico do que os observados nos outros métodos. Justificado pela presença de apenas oito (8) ramos com probabilidade inferior a 70%. No grupo 1 (Figura 3) na árvore Bayesiana, observa-se a presença do grupo externo e os táxons *S. irciniae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1, invertendo a topologia da árvore (Figura 3), comparada ao grupo 1 (Figura 2) da árvore elaborada pelo método da Máxima Verossimilhança (MV). Ainda, várias inversões na topologia da árvore podem ser observadas.

O táxon *S. schlegeliana* AB081761.1, que na máxima M.V. encontrava-se agrupado no mesmo clado da *S. marinintestina* AB081759.1 e *S. sairae* NR 024793.1 (Figura 2), na I.B. apresenta-se mais afastado filogeneticamente em outro ramo, com probabilidade de 82% (Figura 3). Os acessos *S. pneumatophori* NR 041292.1 e *S. fidelia* NR 025195.1, na M.V. em clados diferentes (Figura 2), apresentam-se no mesmo clado na I.B. somado aos acessos *S. psychrophila* NR 042173.1 e *S. kaireitica* NR 040951.1 (Figura 3). Outra mudança observa-se na formação do clado composto pelos taxons *S. surugensis* NR 040950.1, *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 (Figura 3).

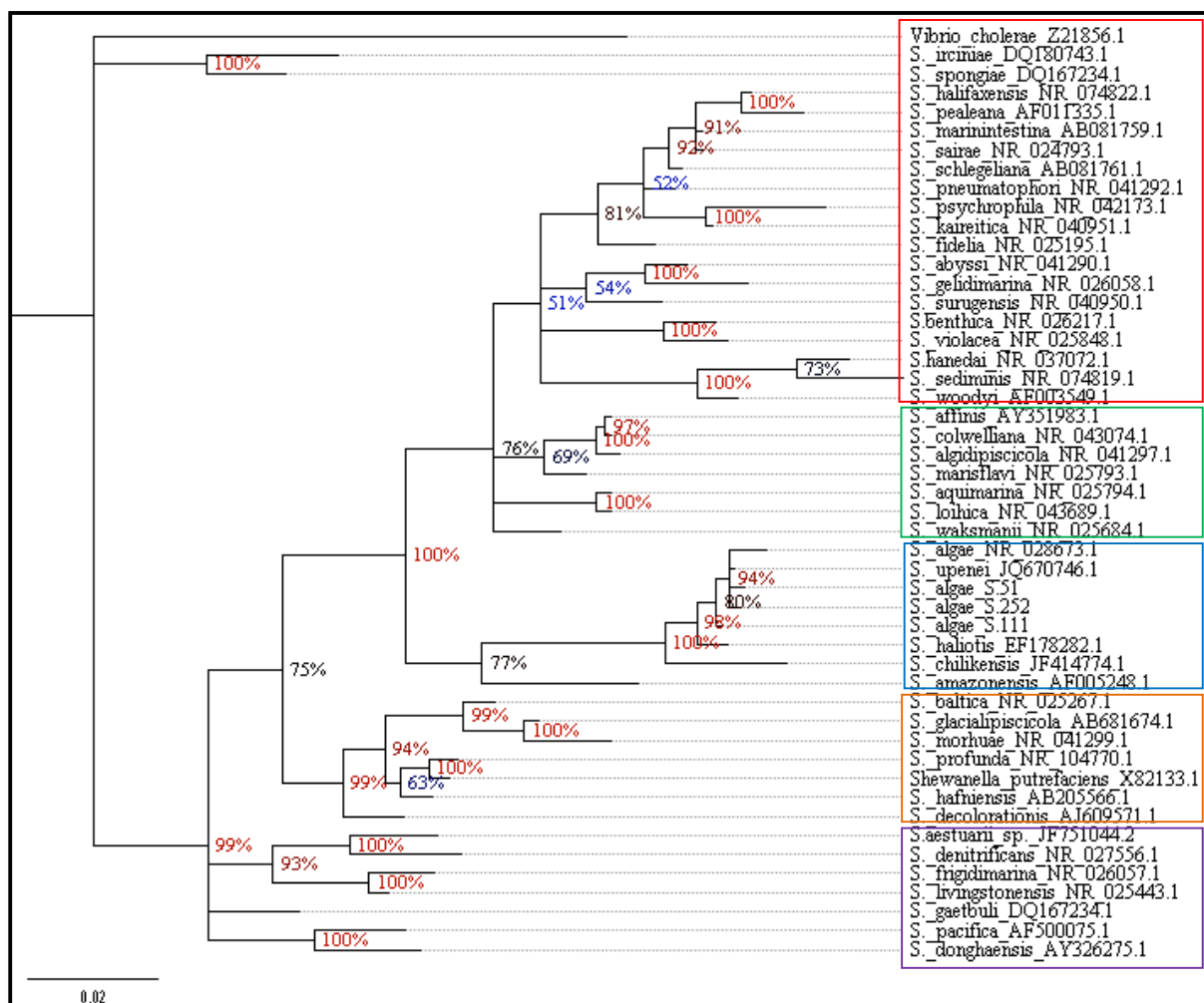
O táxon *S. schlegeliana* AB081761.1, que na máxima M.V. encontrava-se agrupado no mesmo clado da *S. marinintestina* AB081759.1 e *S. sairae* NR 024793.1 (Figura 2), na I.B. apresenta-se mais afastado filogeneticamente em outro ramo, com probabilidade de 82% (Figura 3). Os acessos *S. pneumatophori* NR 041292.1 e *S. fidelia* NR 025195.1, na M.V. em clados diferentes (Figura 2), apresentam-se no mesmo clado na I.B. somado aos acessos *S. psychrophila* NR 042173.1 e *S. kaireitica* NR 040951.1 (Figura 3). Outra mudança observa-se na formação do clado composto pelos taxons *S. surugensis* NR 040950.1, *S. benthica* NR 026217.1 e *S. violacea* NR 025848.1 (Figura 3).

Na árvore filogenética construída pela I.B., o grupo 2 destaca-se pelo deslocamento do clado referente aos táxons *S. woodyi* AF003549.1, *S. hanedai* NR 037072.1 e *S. sediminis* NR 074819.1, antes do grupo 1 na M.V. (Figura 2), para o grupo 2 (Figura 3).

O grupo 3 apresenta apenas um inversão entre as cepas IPA-S.252 e IPA-S.111, quando comparado a I.B.(Figura 3) e M.V. (Figura 2). O grupo 4 não apresentou nenhuma alteração significativa entre a I.B.(Figura 3) e M.V. (Figura 2). Por fim, o 5º grupo destaca-se apenas a mudança no enraizamento da árvore que acarretou no deslocamento do grupo externo e os táxons *S. irciniae* DQ180743.1, *S. spongiae* DQ 167234.1 para o grupo 1 (Figura 3).

A cepa IPA-S.51 apresentou altas similaridades com os táxons *S. upenei* JQ670746.1 (99,85%), *S. algae* NR 028673.1 (99,57%) e *S. haliotis* EF178282.1 (99,57%). Ao passo que a IPA-S.111 foi muito similar aos acessos *S. upenei* JQ670746.1 (99,93%), *S. algae* NR 028673.1 (99,64%) e *S. haliotis* EF178282.1 (99,71%). Por fim a cepa IPA-S.252 apresentou grande similaridade aos táxons *S. upenei* JQ670746.1 (99,93%), *S. algae* NR 028673.1 (99,64%) e *S. haliotis* EF178282.1 (99,71%).

Figura 3. Árvore filogenética construída pelo método Inferência Bayesiana (KHI-INV).



(\*) Ramos azuis probabilidade < 70%. Ramos em preto probabilidade ≥ 70%; Ramos em vermelho probabilidade ≥ 90%.

Grupo 1

Grupo 2

Grupo 3

Grupo 4

Grupo 5

## DISCUSSÃO

O alinhamento, utilizado na construção das árvores fenética e filogenéticas, foi composto por 1405, representando 91,88% do gene 16S rRNA da *Escherichia coli*, dados semelhantes aos observados por KIM e colaboradores (2011) em estudos utilizando *S. upenei*. O método com maior suporte estatístico foi a Inferência Bayesiana (I.B.), justificado pelas probabilidades observadas nos ramos criados, não obstante os métodos Neighbor-Joining e Máxima verossimilhança apresentaram topologias semelhantes a outros estudos realizados (KIM et al., 2007; KIM et al., 2011). No entanto a mudança do enraizamento da árvore Bayesiana constata que o grupo externo utilizado (*Vibrio cholerae*) não foi adequado. Porém, este grupo externo vem sendo utilizado em vários estudos (KIM et al, 2011; PARK et al. 2009). Ainda, a topologia da árvore foi compatível com outros estudos realizados com espécies do gênero *Shewanella* utilizando-se do método neighbor-joining (SIMIDU et al., 1990; IVANOVA et al., 2003; KIM et al., 2007; KIM et al., 2011).

As cepas em análise foram identificadas com o auxílio do NCBI-GenBank e RDP-*Seqmach* como do Gênero *Shewanella*, espécie *Shewanella algae*. Todas as cepas analisadas apresentaram similaridade maior que 99,8% com o taxon *S. upenei* JQ670746.1 (99,93%), sendo este similar em 99,64% a *S. algae* NR 028673.1. A maior similaridade a *S. upenei* pode ser justificada pelo processo de edição no alinhamento, na qual foram deletados trechos iniciais e finais do alinhamento objetivando eliminar falsas apomorfias. Esta técnica pode tem eliminado, das análises filogenéticas, mutações que distanciariam as cepas analisadas da *S. upenei*.

Contudo, espécies distintas como *S. aquimarina* e *S. loihica* apresentaram similaridade de 99,85%, ainda, *S. sairae* e *S. marinintestina* com similaridade de 100%, ademais as espécies *S. sediminis* e *S. affinis*. Como nos gêneros *Burkholderia* (COENEY et al., 2001) e *Bradyrhizobium* (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006) o gene 16S rRNA apresenta baixa variabilidade, o que dificulta a clara definição de espécie (FIGUEIREDO, et al., 2010). Ainda, a alta taxa de transferências horizontais de materiais genéticos em bactérias torna os genomas dinâmicos ocorrendo comumente perdas e incorporações de materiais genéticos (GEVERS et al., 2005). Tornando necessário a realização de análises complementares como o gene *gyrB* (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1995), o gene 23S rDNA ou espaço intergênico 16S-23S rRNA (IGS, região intergênicas), que apresentam maior variabilidade entre as espécies (GERMANO et al., 2006).

Neste aspecto a caracterização fenotípica tem importância crucial não apenas na caracterização, mas também no processo de identificação entre espécies. A cepa IPA-S.51 comparada fenotipicamente com a *S. upenei* diferencia-se por apresentar Colônias brancas, irregulares, com consistência membranosa, opaca, com crescimento até 54°C, positiva para o teste da Uréase, Esculina, produção de H<sub>2</sub>S, •-Galactosidase e com conteúdo G+C de 54%, comparado a Kim *et al.* (2011).

As cepas IPA-S.111 e IPA-S.252, quando comparadas a *S. upenei* são morfologicamente semelhantes, diferenciando-se por apresentarem testes positivo para Esculina, possuir crescimento até 44°C, apresentar conteúdo G+C de 54%, semelhante a *S. algae* assim como sua sensibilidade a Ampicilina apenas pela IPA-S.111. Ainda, a cepa S.252 difere da *S. upenei* por apresentar teste positivo para •-Galactosidase, quando comparados a Kim *et al.* (2011) e Simidu *et al.* (1990). Por fim S.111 e S.252 apresentam teste positivo para Ornitina, incompatível com o mesmo teste para *S. algae* (SIMIDU *et al.*, 1990).

Quanto à aplicação na aquicultura, vários estudos apontam a *Shewanella algae* com potencial probiótico. Contudo, estudos referentes à utilização da *S. upenei* e *S. haliotis* são escassos. As cepas IPA-S.51 e IPA-S.252 isoladas do trato digestivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, apresentaram resultado positivo para produção de biofilme. Mas a IPA-S.252 apresentou baixa aderência ao substrato. A competição pela aderência entre bactérias probióticas e patogênicas pode trazer benefícios ao hospedeiro. Ainda a colonização bacteriana simbiótica do intestino de peixes e crustáceos está diretamente relacionada à sua capacidade de aderir à superfície da mucosa intestinal (SHAKIBAZADEH *et al.*, 2012; WESTERDAHL *et al.*, 1991; OLSSON *et al.*, 1992). No ambiente de cultivo, a alta produção de biomassa e biofilme, observada na S.51, pode produzir incremento na produção de biofloco bacteriano, consequentemente aumentando a demanda de alimento fresco para o camarão. Ainda, a alta atividade bioquímica observada nas cepas sustenta a hipótese de que estas bactérias podem atuar na melhoria da qualidade da água do cultivo. Em adição ao fato de que, em estudos em andamento (dados não publicados), as cepas IPA-S.51 e IPA-S.252 apresentaram antagonismo às espécies *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus*, resultados que corroboram os relatados por Shakibazadeh *et al.* (2008 & 2012). Fato este que aumenta a necessidade do esclarecimento sobre a especiação destas cepas.

A caracterização fenotípica das cepas analisadas e os estudos filogenéticos apontam a proposição de novas espécies para cada cepa isolada. Mesmo com alta similaridade das cepas IPA-S.51, IPA-S.111 e IPA-S.252 a espécie *Shewanella algae*, as cepas possuem

características fenotíficas e genotípicas independentes que sugerem espécies diferentes. Propõe ainda, a reavaliação de *Shewanella upenei* como espécie independente a *S. algae*, reavaliar a relação entre *S. aquimarina* e *S. loihica*, *S. sairae* e *S. marinintestina* e ainda a relação entre as espécies *S. sediminis* e *S. affinis*.

## CONCLUSÕES

AS cepas analisadas S.51, S.111 e S.252 foram identificadas como representantes do gênero *Shewanella*, possuindo características fenotípicas e filogenéticas que as diferenciam entre si sendo sugeridas como novas espécies. A inferência bayesiana apresentou-se como mais confiável dentre as árvores filogenéticas criadas, sendo a mais informativa dentro do grupo na qual as cepas analisadas pertenciam. As cepas estudadas foram sensíveis aos antibióticos Ampicilina/Subactan, Ofloxacina e Tetraciclina. A caracterização fenotípica fortalece a hipótese de especiação para as cepas testadas. A capacidade de formação de biofilme, adicionada ao alto potencial enzimático e antagonismo a patógenos, característico do gênero *Shewanella*, tornam estas cepas probióticos em potencial para uso na carcinicultura. Por fim, propõem-se a reavaliação da espécie *Shewanella upenei*, e a relação entre *S. aquimarina* e *S. loihica*, *S. sairae* e *S. marinintestina* e *S. sediminis* e *S. affinis*, utilizando métodos adicionais para análise filogenética.

## BIBLIOGRAFIA

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

BOWMAN, J. P. **Genus XIII**. 2005. *Shewanella* Macdonell and Colwell. 1986, 355VP (Effective publication: MacDonell and Colwell 1985, 180). Edited by D. J. Brenner, N. R. Crieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer. **In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Ed.2º, vol. 2, part B, p. 480-491.

BURGOS-HERNÁNDEZ, A., FARIAS, S. I., TORRES-ARREOLA, W. EZQUERRABRAUER, J. M. 2005. *In vitro* studies of effects of aflatoxin B1 and fimonisin

B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture** 250, 99-410.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, T. T. 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC 39, 3427-3436.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. A.; BADDOUR, L. M.; BARRET, F. M.; MELTON, D. M. & BEACHEY, E. H. 1985. Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for adherence of *Staphylococci* to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology** 22, 996-1006.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G. & CUZON, G. Capítulo 12 - Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. MIODRAG DARKO MATOVIC (Ed.), p.448. ISBN: 978-953-51-1106-1, InTech, DOI: 10.5772/53902. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-bft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-food-industry>. 2013.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura, testes de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: EMBRAPA, v.1, 2010. BARCELLOS, F. G. & HUNGRIA, M. Parte 3: Técnicas moleculares e aplicações da genética nas áreas agrícolas. Capítulo 1: Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. p.190-221.

FULLER, R. 1989. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology** 66, 365-378.

GAUTHIER, G.; GAUTHIER, M.; CHRISTEN, R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 45, 755-761.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. 2006. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobial* strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, Washington, DC, 56, 217-229.

GERVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, New York 3, 733-739.

GRANGE, L. A. **Análise polifásica na reclassificação filogenética de *Rhizobium etli* e o estudo da diversidade genética de isolados dos cerrados brasileiros**. 2005. 153p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

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

IVANOVA, E. P.; SAWABE, T.; HAYASHI, K.; GORSHKOVA, N. M.; ZHUKOVA, N. V.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; MIKHAILOV, V. V.; NICOLAU, D. V.; CHRISTEN, R. 2003. *Shewanella fidelis* sp. nov., isolated from sediments and sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 53, 577-582.

KIM, D.; BAIK, K. S.; KIM, M. S.; JUNG, B.; SHIN, T.; CHUNG, G.; RHEE, M. S.; SEONG, C. N. 2007. *Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone,

- 616 Haliotis discus hannai. **International Journal of Systematic and Evolutionary**  
 617 **Microbiology** 57, 2926–2931.
- 618
- 619 KIM, K.; KIM, Y.; PARK, S.; KANG, S.; NAM, B.; KIM, D. N.; OH, T.; YOON, J.  
 620 2011. *Shewanella upenei* sp. nov., Lipolytic Bacterium Isolated from Bensasi Goatfish  
 621 *Upeneus bensasi*. **The Journal of Microbiology** 49, 381–386.
- 622
- 623 KOBAYASHI, T., S. Enomoto, R. Sakazaki, and S. Kuwahara. 1963. A new selective  
 624 medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). **Japanese Journal of**  
 625 **Bacteriology** 18, 387.
- 626
- 627 KONISHI, Y.; OHNO, K.; SAITO, N.; NOMURA, T.; NAGAMINE, S.;  
 628 HISHIDAB, H.; TAKAHASHI, Y. & URUGAD, T. 2007a. Bioreductive deposition of  
 629 platinum nanoparticles on the bacterium *Shewanella algae*. **Journal of Biotechnology** 128,  
 630 648–653.
- 631
- 632 KONISHI, Y.; TSUKIYAMA, T.; TACHIMI, T.; SAITO, N.; NOMURA, T. &  
 633 NAGAMINE, S. 2007b. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing  
 634 bacterium *Shewanella algae*. **Electrochimica Acta** 53, 186–192.
- 635
- 636 LYRA, M. C. C. P. 2001. **Estudios genéticos y fisiológicos del gen nifH de la región**  
 637 **específica de cultivar, nifXWBTUV, de la bacteria de amplio rango de nodulación**  
 638 **HH103 y sus implicaciones en el Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS)**. Sevilla,  
 639 Universidad de Sevilla. España, Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular). 159p.
- 640
- 641 MACDONELL, M. T.; COLWELL, R. R. 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae and  
 642 recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. **Systematic and Applied**  
 643 **Microbiology** 6, 171–182.
- 644

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.;  
 MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene a of  
 elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied  
 Microbiology**, Stuttgart29, 315-332.

MORIARTY, D. J. W.; DECAMP, O. & LAVENS, P. 2005. Probiotics in aquaculture.  
**AQUA Culture AsiaPacific Magazine** Sep/Out, 14-16.

MUELLER, J.H., AND J. HINTON. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the  
*gonococcus* and *meningococcus*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and  
 Medicine**, 48, 330-333.

NAYAK, SK. 2010.Probiotics and immunity: a fish perspective.**Fish Shellfish Immunology**  
 29, 2-14.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A.H. & AUSTIN, B. 2013.Review: Developments in the  
 use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**416, 10.

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

OLSSON, J. C., WESTERDAHL, A., CONWAY, P. AND KJELLEBERG, S., 1992.  
 Intestinalcolonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda*  
*limanda*)associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. **Applied  
 andEnvironmental Microbiology** 58, 551-556.

PARK, S.C.; BAIK, K.S.; KIM, M.S.; KIM, D. & SEONG, C.N. 2009. *Shewanella marina* sp. nov., isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59, 1888-1894.

ROCHA, I. P. A. 2013. Importância da aquicultura e da carcinicultura no contexto da produção mundial de pescado: Desafios e oportunidades para o Brasil. **Revista da ABCC** 15, 16-24.

SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution** 4, 406-425.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** 28, 2731-2739.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30, 2725-2729.

THOMPSON, J. D.; PLEWNIAK, F.; THIERRY, J. C. & POCH, O. 2000. DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. **Nucleic Acids Research**, 28, 2919-2926.

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

SHAKIBAZADEH, S.; ROOS, S. C.; HAFEZIEH, M.; CHRISTIANUS, A.; KAMARUDIN  
M. S. & KAMARUZAMAN, S.2012. A putative probiotic isolated from hatchery reared  
juvenile *Penaeus monodon*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**11, 849-866.

SILVA, A. L. S. **Estudos ecogenômicos e bioprospectivos de *Shewanella spp.*** Natal, UFRN,  
p.30, 2009. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

SIMIDU, U.; KITA-TSUKAMOTO, K.; YAMASATO, T.; YOTSU, M. 1990. Taxonomy of  
Four Marine Bacterial Strains That Produce Tetrodotoxin. **International Journal  
of Systematic Bacteriology**40, 331-336.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6.  
Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**30,  
2725-2729.

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

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERBSTERS, K.; SWINGS, J. 1996.  
Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological  
Reviews**, Washington, DC. 60, 407-438.

VENKATESWARAN, K.; MOSER, D. P.; DOLLHOPF, M. E.; LIES, D. P.; SAFFARINI,  
D. A.; MACGREGOR, B. J.; RINGELBERG, D. B.; WHITE, D. C.; NISHIJIMA, M.;  
OTHER AUTHORS. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of  
*Shewanella oneidensis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**49, 705-  
724.

WASIELESKY, W.; KRUMMENAEUR, D.; LARA, G.; FÓES, G. & POERSH, L. 2013. Cultivo de camarões em sistema de bioflocos: realidade e perspectivas. **Revista ABCC** 15, 30-36.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIE, D. A.; LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173, 97-703.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W. & SUZUKI, K. I. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed, p. 1750.

WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews** 51, 221-271

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archae, Bacteria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 87, 4576-4579.

YAMAMOTO, S. & S. HARAYAMA. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. 61, 1104-1109.

ZOBELL, 1941, J. Marine Research, 4:42

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cepas estudadas foram identificadas e propostas como novas espécies para o gênero *Shewanella*, mostrando-se também bactérias importantes na dinâmica do cultivo intensivo heterotrófico do camarão *Litopenaeus vannamei*. Todavia, a relação entre as cepas e as espécies *S. algae* e *S. upenei* devem ser mais estudadas. A análise filogenética do 16S rRNA revelou várias incongruências quanto a validade de algumas espécies. A caracterização fenotípica e o antibiograma realizados sustentam a hipótese de que as cepas estudadas podem constituir novas espécies. A capacidade de produção de biofilme e fixação por algumas cepas é um resultado importantíssimo a um candidato a probiótico. Por conseguinte, as cepas devem ser reavaliadas filogeneticamente com o auxílio dos genes *gyrB*, o gene 23S rDNA e espaço intergênico 16S-23S rRNA, ademais a bactéria *S. upenei* como espécie e reavaliar a relação entre *S. aquimarina* e *S. loihica*, *S. sairae* e *S. marinintestina* e a relação entre as espécies *S. sediminis* e *S. affinis*. Ainda, as cepas estudadas apresentam características que as qualificam como probióticos em potencial e devem ser avaliadas na dinâmica do cultivo intensivo heterotrófico de *Litopenaeus vannamei*.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Normas da revista ñ Aquaculture

#### INTRODUCTION

##### *Types of paper*

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

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

*Short Communications* are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not

be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

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

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

#### ***Contact details for submission***

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

#### **Nutrition:**

D.M. Gatlin

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

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

Manuscripts concerning other areas of nutrition using novel or advanced methods are also welcome.

Please note that in regard to various diet additives such as probiotics, prebiotics, herbal extracts, etc., a very large number of papers have already been published. Therefore, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present initial and preliminary

investigations of such additives. Manuscripts addressing these and other feed additives will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved in their metabolism. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

#### **Aquaculture Production Science:**

B.Costa-Pierce

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

#### **Physiology and Endocrinology:**

E.M. Donaldson

The Physiology and Endocrinology Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the physiology and endocrinology of cultured aquatic animals and plants, providing that their content is relevant to solving aquaculture problems.

Manuscripts submitted to the journal must have a valid hypothesis or objective, clearly state the relevance to aquaculture, have proper experimental design with appropriate controls and utilize appropriate statistical analysis. When a study involves the administration of a pharmaceutical or other commercial product, please use generic or scientific names rather than trade names especially in the Title. The trade name can be mentioned in the Materials and Methods together with an exact description of its composition.

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

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

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

#### **Diseases:**

B. Austin

The Diseases Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the diseases of aquatic animals and plants, so long as their content is relevant to solving aquaculture problems.

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

#### **Genetics:**

G. Hulata

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

#### **Sustainability and Society:**

D.C. Little

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

#### ***Page charges***

This journal has no page charges.

#### **BEFORE YOU BEGIN**

#### ***Ethics in publishing***

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

### ***Policy and ethics***

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm);

*Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

### ***Conflict of interest***

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

### ***Submission declaration and verification***

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

<http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### ***Contributors***

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

### ***Changes to authorship***

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

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the

corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

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

### **Copyright**

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

### **Retained author rights**

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

### **Role of the funding source**

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

### ***Funding body agreements and policies***

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

### ***Open access***

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

### ***Language and language services***

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

### ***Submission***

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

## ***Referees***

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

## **PREPARATION**

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

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

### ***LaTeX***

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

## ***Article structure***

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

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

### ***Introduction***

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

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

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

### *Theory/calculation*

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

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

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

### *Conclusions*

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

### *Appendices*

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

Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### ***Essential title page information***

¶**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

¶**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

¶**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

**ÇPresent/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be not longer than 400 words.

### ***Keywords***

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

### ***Abbreviations***

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

### ***Acknowledgements***

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

### ***Nomenclature and units***

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

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. 2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified

by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.<sup>3</sup> All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. 4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied

Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

### ***Database linking and Accession numbers***

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

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

ÇGenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI)

(GenBank ID: BA123456)

ÇPDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)

ÇCCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)

ÇTAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)

ÇNCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)

ÇOMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)

ÇMINT: Molecular INteractions database (MINT ID: 6166710)

ÇMI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)

ÇUniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article. Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)". Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below). Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below). Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

### ***Math formulae***

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup> and not Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### ***Footnotes***

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

### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

☐ Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

☐ Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.

☐ Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.

☐ Number the illustrations according to their sequence in the text.

☐ Use a logical naming convention for your artwork files.

☐ Provide captions to illustrations separately.

☐ Produce images near to the desired size of the printed version.

☐ Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

#### *Formats*

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

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

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

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

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

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

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

☐ Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;

☐ Supply files that are too low in resolution;

☐ Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

#### *Figure captions*

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

#### *Text graphics*

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

#### **Tables**

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

#### **References**

##### *Citation in text*

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

### *Web references*

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

### *References in a special issue*

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

### *Reference management software*

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

### *Reference style*

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

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
  2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
  3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....' *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

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

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

an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### ***Journal Abbreviations Source***

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

### ***Video data***

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

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

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

### ***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### ***Linking to and depositing data at PANGAEA***

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

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

### ***Submission checklist***

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

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

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

☐ E-mail address

☐ Full postal address

☐ Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

☐ Keywords

☐ All figure captions

☐ All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

☐ Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

☐ References are in the correct format for this journal

☐ All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

☐ Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

☐ Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

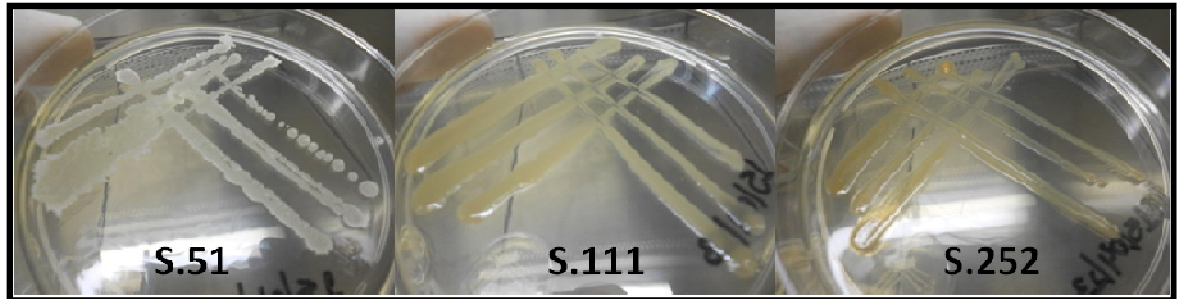
☐ If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

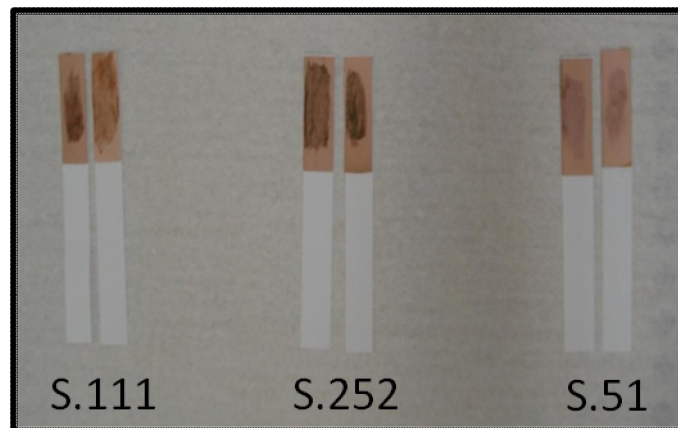
## 8. APÊNDICES

### 8.1. Fotodocumentações das análises realizadas utilizando as cepas S.51, S.111 e S.252.

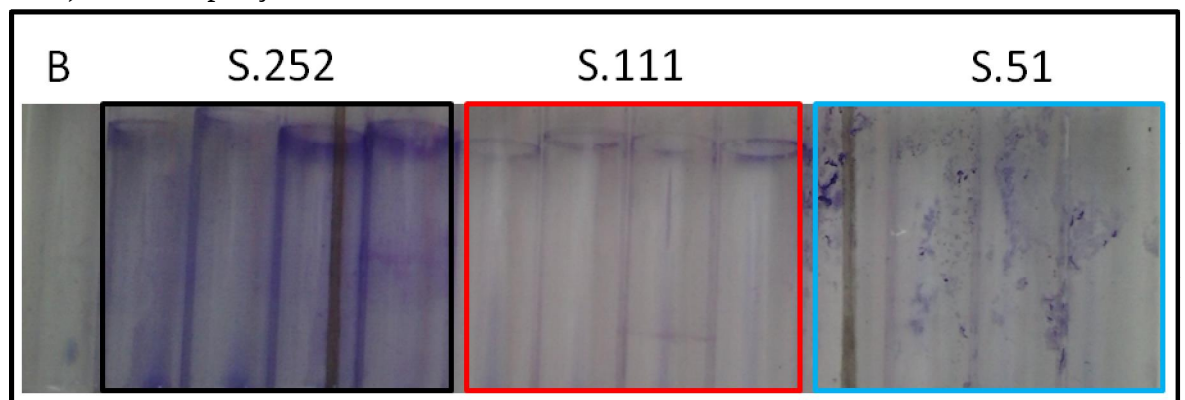
FiguraA1. Características das colônias Bacterianas.



FiguraA2. Teste de Oxidase utilizando tiras para teste oxidase Probac do Brasil®.



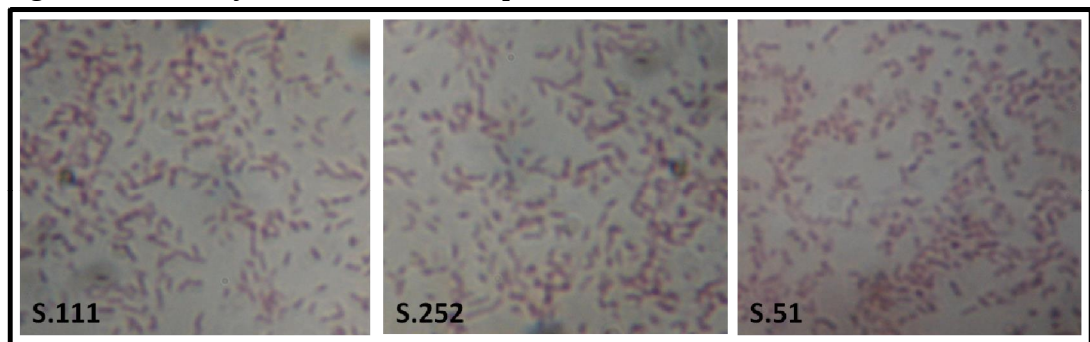
FiguraA3. Avaliação da capacidade de produção de biofilme (Christensen et al., 1982), com 4 repetições.



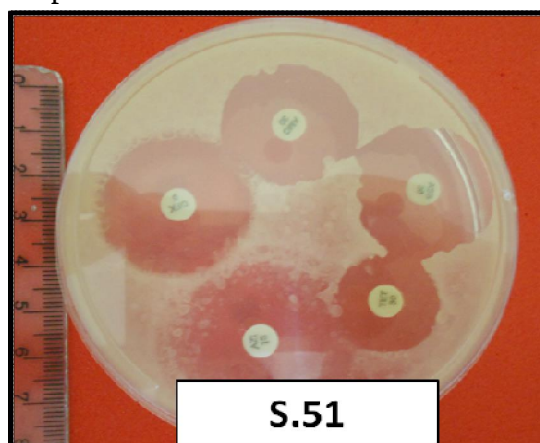
FiguraA4. Realização dos testes bioquímicos a partir do Kit BACTRAY I, BACTRAY II e BACTRAY III (Laborclin®), foto cepa S.252.



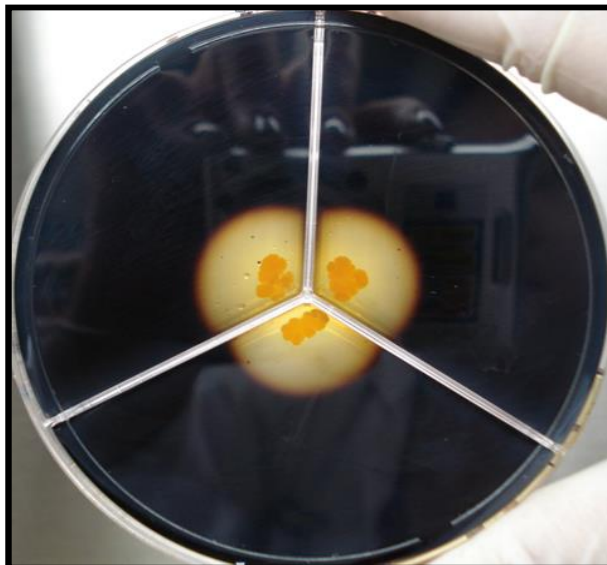
FiguraA5. Coloração de GRAM das cepas estudadas.



FiguraA6. Antibiograma da cepa S.51, antibióticos: Ofloxacina, Tetraciclina, Azitromicina, Amoxicilina/Ac. Clavulânico e Ampicilina/Sulbactan.



FiguraA7. Teste Enzimático amilolítico cepa S.252.



FiguraA8. Antagonismo ao *Vibrio harveyi* pela cepa S.252.

