

AValiação bacteriológica aplicada à produção de pós-larvas de *Penaeus vannamei*

JOSÉ LUIZ PEDREIRA MOURINO, CELSO CARLOS BUGLIONE, FELIPE DO NASCIMENTO VIEIRA, CRISTINA RAMIREZ, FABIULA SANTIAGO PEDROTTI, FRANK BELETTINI, WALTER SEIFFERT, ELPÍDIO BELTRAME.

Laboratório de Camarões Marinhos – LCM, Endereço: Beco dos Coroas, (fundos) - Cep: 88062-601. Barra da Lagoa | Florianópolis | Santa Catarina | Brasil. E-mail: mourino@lcm.ufsc.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo rastrear as fontes de contaminação da água dentro do Laboratório de Camarões Marinhos(LCM), pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); quantificar a carga bacteriana ao longo de diferentes etapas do setor produtivo; avaliar a eficiência do cloro como desinfetante e avaliar o efeito da oxitetraciclina sobre a qualidade larval mediante a aplicação de índice multicritério. A carga bacteriana foi quantificada através da contagem direta em placas de petri contendo agar MARINE e agar TCBS. Foi observada uma carga bacteriana de 1×10^3 UFC/mL (Unidades formadoras de colônia por volume de amostra) na água captada para a produção de larvas. A cloração da água nas cisternas foi pouco eficiente, não havendo diferença na carga bacteriana encontrada na água de captação e na cisterna clorada. A presença de filtros aumentou a carga bacteriana na água durante a distribuição para os diferentes setores do laboratório. Na água da larvicultura foi observada grande quantidade de bactérias do gênero *Vibrio*, entre 1×10^2 e 1×10^3 UFC/mL. Quando esta carga aumentou para 1×10^4 UFC/mL, detectou-se a queda da qualidade das larvas, demonstrando que índices multicritérios funcionariam como sistemas de prevenção a enfermidades. Após aplicação do antibiótico oxitetraciclina na concentração de 1 ppm, ocorreu a queda da carga de vibriões na água e a melhoria da qualidade larval. A avaliação microbiológica otimizou o manejo e a desinfecção na distribuição de água de forma racional e efetiva, eliminando o uso excessivo de químicos e antimicrobianos nas larvicultura de camarões marinhos.

PALAVRAS-CHAVE: *Penaeus vannamei*, bactérias, profilaxia, antibiótico.

ABSTRACT

Bacteriological assessing applied to the hatchery of *Penaeus vannamei*.

This study aimed to track the sources of water contamination in the Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) pertaining to the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); to quantify the bacterial load during the stages of shrimp production; to evaluate chlorination efficiency as disinfectant, as well as to evaluate the effect of oxitetracycline on larval quality by application of a multiple criteria method. Bacterial load was quantified by direct counting in plates with Marine Agar and TCBS Agar. A bacterial load of 1×10^3 CFU/mL (colony-forming units) was observed in the water used for larvae production. Differences in bacterial load were not detected between water with and without chlorine addition in the cisterns, indicating the low efficiency of conventional water disinfection. Similarly, the presence of filters not only did not reduce bacterial load in the water network, but was responsible for its increase. Water from hatchery presented a high counting of *Vibrio* genus, between 1×10^2 and 1×10^3 CFU/mL. When this load reached 1×10^4 CFU/mL, decrease in larval quality was detected, demonstrating that the application of multiple criteria may prevent enfermities. After antibiotic application (oxitetracycline) at 1ppm, the *Vibrio* load in hatchery water decreased as the larval quality improved. The bacteriological assessing has optimized production management and disinfection of water system in an effective and rational way, reducing the excessive use of chemicals and antimicrobians in marine shrimp hatchery.

KEYWORDS: *Penaeus vannamei*, bacteria, profilaxy, antibiotic

INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção de larvas de organismos aquáticos, as práticas inadequadas de manejo e desinfecção da água, altas densidades de cultivo e elevados índices de material orgânico provenientes de restos alimentares e animais mortos, influenciam a comunidade bacteriana estimulando o crescimento de bactérias patogênicas oportunistas (Boyd & Massaut 1999).

Em fazendas e laboratórios de cultivo de camarões, as infecções bacterianas são geralmente controladas por antibióticos, levando a uma seleção de bactérias resistentes (Costerton 1995).

A utilização de antibióticos pode causar um efeito negativo no meio aquático. Portanto, medidas profiláticas são recomendadas para evitar o uso desta

estratégia terapêutica na aquicultura. Entre estas medidas estão o acompanhamento freqüente da qualidade larval e da água, a desinfecção adequada de materiais e sistemas e dos animais. Estes procedimentos influenciam diretamente o crescimento bacteriano e suas possíveis infecções (Flegel & Alday-Sanz 1998). Neste sentido, um monitoramento microbiológico eficiente pode indicar onde estão localizados os pontos de contaminação bacteriana, otimizando o manejo do sistema produtivo e diminuindo a necessidade do uso de antibióticos.

Este estudo teve como objetivo: (a) rastrear as fontes de contaminação da água dentro do Laboratório de Camarões Marinhos(LCM), pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); (b) quantificar a carga bacteriana ao longo de diferentes etapas do setor produtivo; (c) avaliar a eficiência do

cloro como desinfetante e (d) avaliar o efeito de diferentes antibioticos sobre a qualidade larval mediante a aplicação de índice multicritério.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização dos pontos de avaliação da carga bacteriana

Durante o processo da produção de larvas de camarões marinhos, a água do mar utilizada é captada na praia da Barra da Lagoa, localizada na costa leste da Ilha de Santa Catarina. A captação é realizada através de ponteiros submersas instaladas na região infra-maré. (Figura 1).

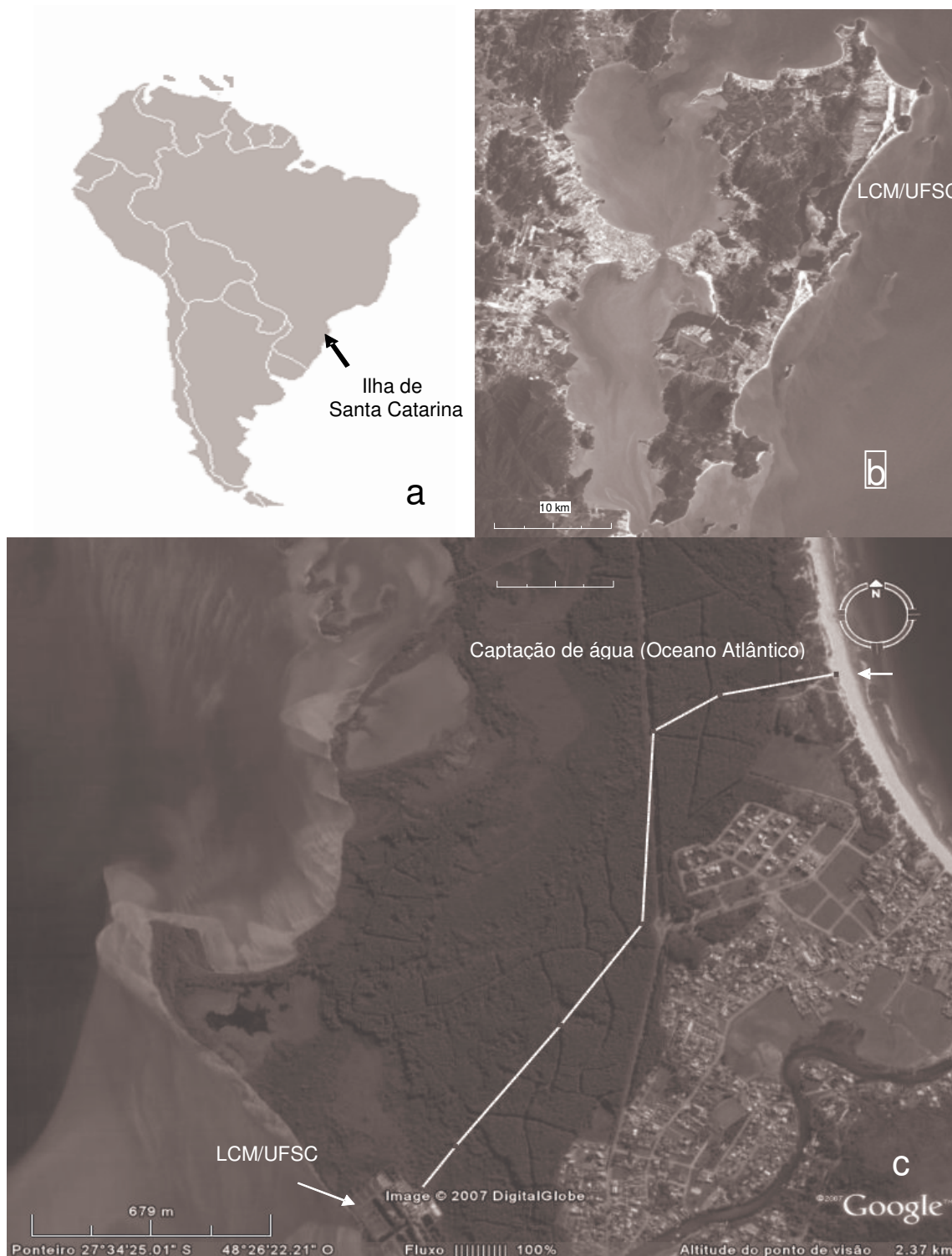


FIGURA 1 – Localização do laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM/UFSC): a) América do Sul, b) Ilha de Santa Catarina, c) captação de água do LCM e localização do laboratório.

Caracterização dos pontos de coleta

A água da região infra-maré é então bombeada por cerca de 2,5 quilômetros(Km) até ser recebida em uma caixa de 1000L (ponto 1 – P1)(Figura 2). Após passar por um sistema de filtro de areia para a remoção da matéria orgânica, a água é armazenada em duas cisternas de 300.000L. Para evitar a

contaminação bacteriana é utilizado cloro (2ppm) como tratamento desinfetante para água armazenada. Após o tratamento químico o cloro desta água é neutralizado com aplicação de Tiosulfato aproximadamente na concentração de 2,5 ppm (ponto 2 – P2) (Figura 2).

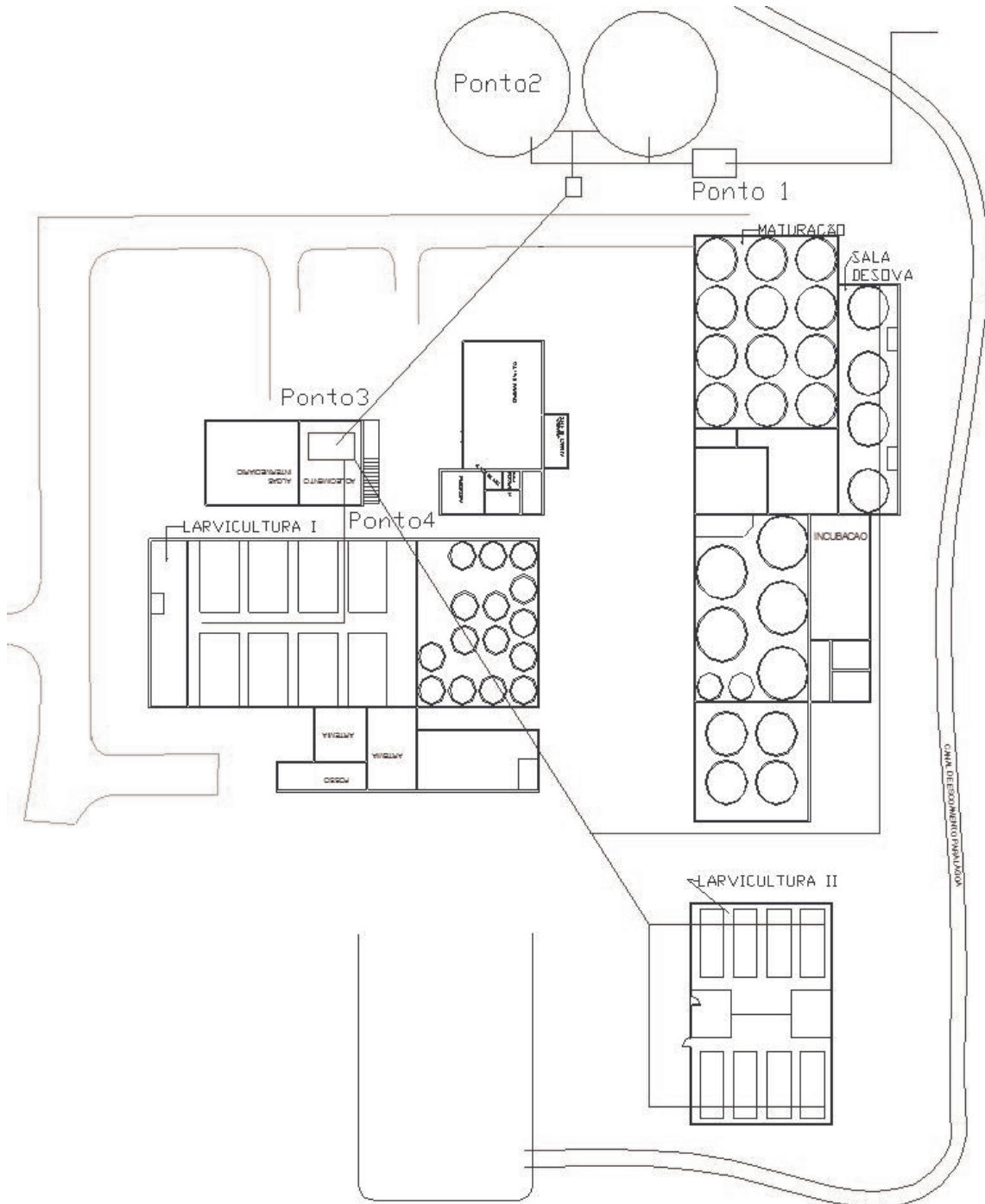


FIGURA 2 – Sistema de abastecimento de água do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM/UFSC), onde P1 é a Caixa de Captação de água, P2 é Cisterna fria, P3 é Cisterna quente e P4 a Caixa de distribuição de água para os diferentes setores do laboratório.

Como a água utilizada pela larvicultura necessita ser aquecida, a água neutralizada na cisterna 1 (ponto 2) é novamente filtrada por 6 filtros de cartucho de 100 micras (ponto 3 – P3) e aquecida por uma caldeira juntamente com aquecedores de titânio em um fluxo de 20 toneladas de água por hora, sendo posteriormente armazenada em outras cisternas de 75000L, à temperatura de 28°C. (ponto 4 – P4)(Figura 2).

Determinação da carga bacteriana

O período de abrangência deste estudo foi desde o dia 6 de dezembro até o dia 7 de abril de 2006, com um total de quarenta e oito análises microbiológicas para o sistema de captação de água e vinte e cinco análises microbiológicas para a avaliação dos tanques de larvicultura.

Para a coleta das amostras de água dos pontos monitorados do sistema de captação, utilizou-se recipientes estéreis com volume de 100mL. De acordo com metodologia descrita por APHA, AWWA, WEF (1994), alíquotas de 0,1mL foram semeadas em agar Marine (Difco) para a contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias marinhas heterotróficas ou autotróficas facultativas. Em seguida, as placas semeadas foram incubadas a 30°C por 24hs para posterior contagem total de colônias viáveis.

Para a quantificação de UFC/mL (Unidades formadoras de colônias viáveis por volume de amostra) de vibrionáceas nos tanques de larvicultura, foram retiradas diariamente amostras de água em tanques de produção de larvas, desde o estágio de náuplio V até pós-larva I. Com essas amostras foram

elaboradas diluições seriadas fator 10 até 10⁵, e depois semeadas em placas de petri estéreis contendo Agar TCBS, sendo então incubadas a 30°C por 24 h (APHA, AWWA, WEF 1994).

Antibiograma e determinação do índice de qualidade larval

Na população de bactérias isoladas a partir da água dos tanques de larvicultura, realizaram-se quatro antibiogramas para quatro tipos de antibióticos diferentes, os discos de antibióticos testados foram: oxitetraciclina, eritromicina, enrofloxacina e magnamicina. Os discos foram inseridos em placas de petri contendo meio de cultura Agar Marine recém semeado com as cepas isoladas, em seguida as placas foram incubadas a 30°C por 24 h para a verificação da formação de halos de inibição.

A avaliação da qualidade larval por microscopia foi feita diariamente com 50 larvas de cada tanque da larvicultura segundo a atividade natatória, homogeneidade de estágio de desenvolvimento, reserva de lipídios no hepatopâncreas, coloração relativa à dieta utilizada, conteúdo intestinal, cordões fecais, deformidades de apêndices, epibiontes, partículas aderidas (larvas sujas) e necroses.

Para cada parâmetro avaliado foi atribuída uma pontuação com escore variando de 0 a 1. O total de pontos dados durante o período de avaliação foi somado para obter o índice de qualidade larval, variando de ótimo (superior a 8,5 pontos), bom (de 6,5 a 8,5 pontos), satisfatório (de 5,0 a 6,5 pontos) a ruim (abaixo de 5,0 pontos) como sugerido pela FAO (2003), formando assim um mecanismo de avaliação larval (Tabela 1).

TABELA 1 – Parâmetros utilizados para avaliação do índice de qualidade larval adaptado de FAO (2003).

Parâmetros	Avaliação	Pontuação*
Atividade Natatória	Acima de 90%	1
	Entre 70 e 90%	0,5
	Abaixo de 90%	0
Homogeneidade de estágio	Acima de 80% no mesmo estágio	1
	Entre 70 e 80% no mesmo estágio	0,5
	Menos de 70% no mesmo estágio	0
Hepatopâncreas, reserva de lipídios.	Acima de 90% dos animais amostrados	1
	Entre 70 e 90% dos animais amostrados	0,5
	Abaixo de 70% dos animais amostrados	0
Hepatopâncreas, coloração relativa a dieta utilizada	Animais com hepatopâncreas amarelo escuro a marrom	1
	Hepatopâncreas amarelo claro	0,5
	Hepatopâncreas com pouco coloração e áreas vazias	0
Conteúdo intestinal	Acima de 70% dos animais amostrados	1
	Entre 20 e 70% dos animais amostrados	0,5

Parâmetros	Avaliação		Pontuação*
	Abaixo de 20% dos animais amostrados		
Necroses, indicação de contaminação bacteriana ou canibalismo	Não encontrados nos animais		1
	Quando até 15% dos animais amostrados apresentarem necrose		0,5
	Quando acima de 15% dos animais apresentarem necrose		0
Deformidades	Não encontrado nos animais		1
	Abaixo de 10% dos animais amostrados		0,5
	Acima de 10% dos animais amostrados		0
Epibiontes	Não encontrado nos animais amostrados		1
	Epibiontes temporais, abaixo de 15% dos animais amostrados		0,5
	Epibiontes permanentes, acima de 15% dos animais amostrados		0
Partículas aderidas	Larvas limpas com poucas partículas aderidas nas pontas dos apêndices (<5%); ou entre 5 a 10% dos organismos, abaixo de 25% dos animais amostrados		1
	Larvas com poucas partículas aderidas, entre 10 a 40% dos apêndices dos organismos, entre 25 a 60% dos animais amostrados		0,5
	Larvas com partículas aderidas, acima de 40% dos apêndices ou do organismo, superior a 60% dos animais		0
Cromatóforos	Apresentam nível normal de cromatóforos expandidos		1
	Nível moderado de cromatóforos expandidos (somente nos apêndices)		0,5
	Alto nível de cromatóforos expandidos (em todo o animal)		0
Síndrome de "Bollitas"	Nenhuma célula epitelial do Hepatopâncreas ou do intestino dentro do trato digestório.		1
	Células epiteliais do Hepatopâncreas ou do intestino dentro do trato digestório		0,5
	Células epiteliais do Hepatopâncreas ou do intestino dentro do trato digestório (numero de células superior a 3)		0
Luminescência, contaminação bacteriana	Não encontrado nos animais		1
	15% dos animais apresentam luminescência		0,5
	Acima de 15% dos animais apresentam luminescência		0

*A soma total da pontuação dos parâmetros avaliados foi considerada de ótimo (superior a 8,5 pontos), bom (de 6,5 a 8,5 pontos), satisfatório (de 5,0 a 6,5 pontos) a ruim (abaixo de 5,0 pontos). O número amostral para elaboração do escore total foi de 50 larvas para a utilização da tabela adaptada de FAO (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistema de abastecimento de água do mar

O primeiro ponto monitorado (P1) no setor de captação está localizado na chegada da água ao laboratório. A contagem inicial estava em 1×10^2 UFC/mL e após o sétimo dia não foi mais observado crescimento bacteriano (Figura 3). Este resultado foi observado após uma limpeza periódica semanal com aplicação de cloro e formalina da tubulação que abastece o laboratório com água do oceano. A concentração de cloro a 10 ppm e formalina a 5 ppm para desinfetar a tubulação de captação de água geram um enorme prejuízo ao sistema pois a tubulação percorre uma distância de 2,5 km da estação de bombeamento.

Após o dia quadragésimo nono dia foi observado $1,56 \times 10^3$ UFC/mL na água coletada (Figura 3). Muitos fatores ambientais e ecológicos podem afetar a população bacteriana na água do

mar, podendo o aumento da carga bacteriana ter sido causado pela poluição da área de captação devido ao aumento populacional gerado pelo turismo local. Este aporte de bactérias para o sistema de produção de larvas se manteve até o final do monitoramento.

Os resultados obtidos nas contagens totais da água presente no cisterna quente (P3) revelaram que o filtro de areia estava contribuindo com o aumento do aporte total de bactérias para o sistema de abastecimento (Figura 3). Também foi observado que o processo de cloração não estava influenciando de maneira eficiente o processo de eliminação das bactérias presentes na água (Figura 3), pois não houve diminuição na carga bacteriana deste ponto em relação ao P1, somente na segunda de análise onde houve limpeza da tubulação da que vinha da praia com formalina (formol a 10%) na concentração de 5ppm.

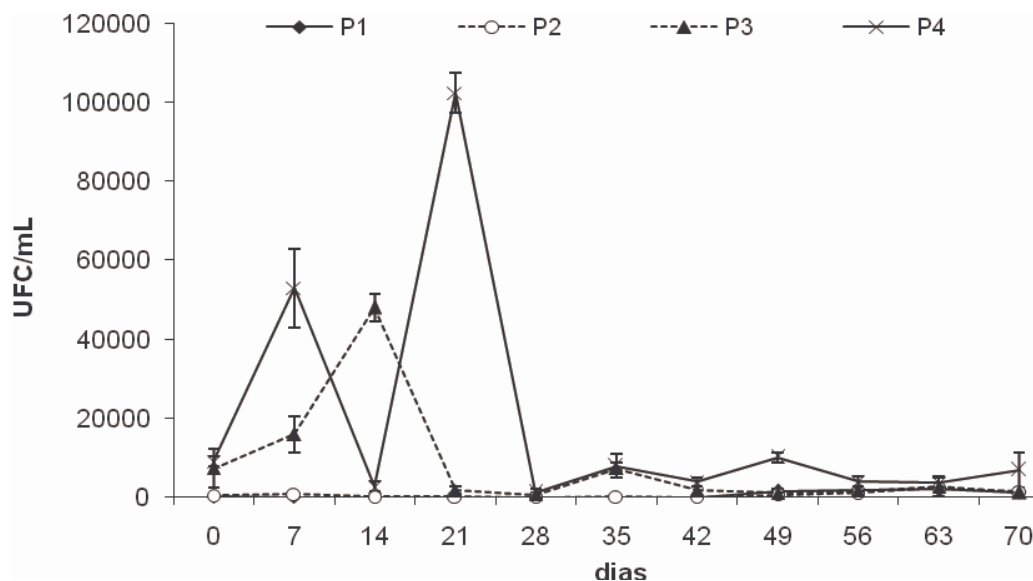


FIGURA 3 – Carga bacteriana de água marinha (UFC/mL) no setor de captação e distribuição de água no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. P1-Caixa de captação de água, P2-Cisterna Fria, P3-Cisterna Quente, P4- Caixa de distribuição de água para os diferentes setores do laboratório.

Segundo (Eaton et al., 1995), o cloro e seus compostos atacam a atividade respiratória, o transporte através da parede celular e o ácido nucléico das bactérias. Acredita-se que a habilidade de um desinfetante oxidar ou romper a parede celular, se difundir dentro da célula e interferir nas atividades celulares é o principal mecanismo controlador da eficiência da desinfecção no tratamento da água. Certos microorganismos podem desenvolver resistência aos desinfetantes com o tempo, protegendo-se dos agentes químicos por absorção ou seqüestro de partículas orgânicas inertes na água. Verifica-se que, em sistemas de distribuição de água, mudando o desinfetante químico, muda-se a população microbiológica resistente remanescente.

Como os compostos clorados são agentes oxidantes fortes e uma quantidade suficiente de cloro livre deve ser aplicada a fim de superar a demanda de cloro da matéria orgânica e de outras substâncias que reagem com cloro livre, de modo a convertê-la em cloretos não tóxicos ou compostos de cloro menos tóxicos, o processo de cloração que sempre é elaborado em concentração estipulada pode estar não sendo eficiente para combater a carga microbiana (White, 1992).

No ponto P3, situado após a passagem da água pelo sistema de filtros, verificou-se um grande aumento na carga bacteriana presente na água da

tubulação que era coletada logo após os filtros (Figura 3). Após a retirada destes filtros após o vigésimo oitavo dia de avaliação, as contagens totais revelaram que a população de bactérias presentes na água da tubulação que abastece a cisterna de água quente (P4), se manteve próxima às contagens realizadas na cisterna de abastecimento de água (P2). A carga microbiana no final do sistema de abastecimento após a retirada do filtro foi reduzida de $1,89 \times 10^4$ UFC/mL a $4,51 \times 10^3$ UFC/mL em Agar Marine.

Uma desinfecção ineficaz das estruturas de cultivo poderia explicar a contaminação cruzada, ocasionando o surgimento do agente patogênico oportunista *Vibrio* spp, que pode contaminar o sistema durante o processo de produção (Lavilla-Pitogo et al, 1990). Para o controle destas enfermidades, a utilização profilática de antibióticos tem sido a estratégia mais utilizada na carcinicultura (Skjermo & Vadstein, 1999).

Produção de larvas

As quantificações iniciais de UFC/mL de vibriões nos tanques de larvicultura se mantiveram entre 1×10^2 e 1×10^3 UFC/mL. O gráfico 2 mostra a quantificação de vibriões durante as fases larvais em dois tanques de larvicultura. Observou-se um pico de contaminação no segundo dia após o povoamento de larvas devido à entrada de material orgânico, como

ração, microalgas e fezes, com posterior decréscimo e estabilização da população destas bactérias no tanque.

Um segundo pico de contaminação bacteriana foi verificado no sétimo e oitavo dia. As larvas começaram a apresentar sintoma característico de enfermidade microbiana, como presença de necroses e baixa atividade natatória, resultando em uma diminuição do índice de qualidade larval. As colônias que cresceram em Agar TCBS nestes dias apresentaram forma de bacilos pequenos e curvos gram negativo, catalase e motilidade positiva,

características do gênero *Vibrio* (Austin & Austin, 1987).

Das colônias acima descritas procedeu-se a realização de antibiogramas para avaliar o antibacteriano de melhor ação (Tabela 2). Dos antibióticos testados o que obteve maior halo de inibição foi a enrofloxacina, seguido da eritromicina, magnamicina e oxitetraciclina respectivamente. Como tratamento para estes tanques foi utilizado a oxitetraciclina a 1ppm, por ser único antibiótico até então liberado pelo Ministério da Agricultura para organismos aquáticos.

TABELA 2 – Halos de inibição (em mm) *in vitro* dos antibiogramas realizados com as cepas isoladas da água dos tanques de larvicultura monitorados.

Antibiótico	Antibiograma (mm) ± dp	
	Tanque 1	Tanque 2
Eritromicina	13,0±0,1 ^c	12,9±0,2 ^c
Enrofloxacina	14,9±0,1 ^a	15,0±0,2 ^a
Magnamicina	14,1±0,1 ^b	14,0±0,1 ^b
Oxitetraciclina	8,1±0,2 ^d	6,2±0,1 ^d

Legenda: dp= desvio padrão; as letras após as médias indicam diferença estatística p<0,05 pelo teste T (ANOVA) entre os antibióticos testados.

Após a administração do tratamento, foi observada diminuição da carga bacteriana da água, indicando efeito inibitório sobre estes tipos de

bactérias. Como consequência, houve uma melhoria no índice de qualidade larval, que passou de ruim para satisfatório, e posteriormente para bom (Figura 4).

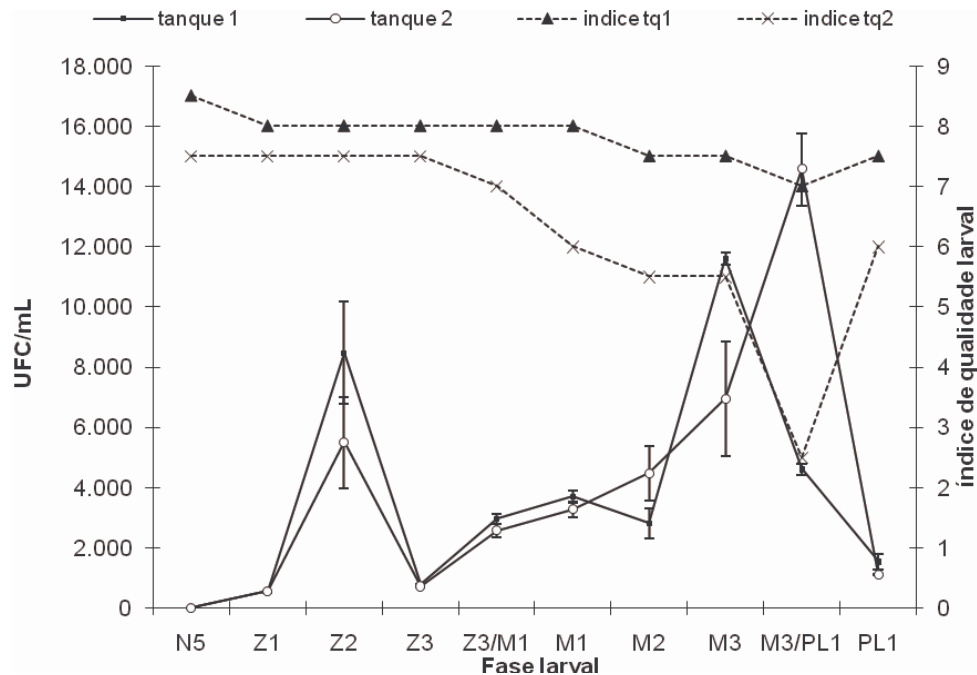


FIGURA 4 – Contagem de vibrios totais em Agar TCBS da água e índice de qualidade larval dos tanques 1 e 2 de larvicultura. Legenda: N = náuplio; Z = protozoocoea; M = misis, PL = pós-larva e os números indicam os estádios dentro das fases.

De acordo com Stubbs (2004), com o apoio do índice multicritério, conjunto de métodos e técnicas capazes de auxiliar as tomadas de decisão na presença de uma multiplicidade de critérios sobre os indicadores de desempenho, foi possível tomar a decisão de aplicação de antimicrobianos, havendo assim um uso racional destes agentes nas larviculturas.

O biofilme encontrado nas tubulações e nos tanques de produção pode ser considerado um reservatório de bactérias patogênicas que quando não eliminadas afetam diretamente a produção de larvas (Karunasagar *et al*, 1994). Tais bactérias oportunistas têm sido responsáveis por severas perdas na produção de camarão, pois podem causar necroses, malformação, atrasos no crescimento e na metamorfose larval e queda da sobrevivência (Austin & Austin 1987).

Os efeitos e a severidade das infecções bacterianas variam em função da espécie da bactéria causadora, bem como da densidade celular, qualidade da água, manejo, alimentação e qualidade dos alimentos, podendo resultar na colonização do trato digestivo da larva e causar alterações na digestão e na assimilação dos nutrientes (Lightner & Redman 1996).

A entrada de bactérias na larvicultura é facilitada devido ao acúmulo de material orgânico, níveis infecciosos devem ser prevenidos com manejo adequado de renovação e desinfecção da água utilizada. O possível papel de outros microorganismos e das condições ambientais no desenvolvimento de enfermidades de organismos aquáticos deve ser monitorado.

CONCLUSÃO

Este trabalho visou o desenvolvimento científico e tecnológico, auxiliando o uso racional dos recursos naturais e matérias primas utilizadas e buscando a prevenção da poluição sendo possível rastrear e observar os pontos de contaminação bacteriana no setor de distribuição de água e observar a contaminação de acordo com o manejo de cultivo empregado para os respectivos estádios larvais dentro dos tanques de larvicultura do LCM/ UFSC.

O monitoramento microbiológico otimizou o manejo e a desinfecção na distribuição de água de

forma racional e efetiva, eliminando o uso excessivo de antimicrobianos nas desinfecções de tubulações e nas larviculturas de camarões marinhos linearizando e simplificando o processo de tratamento de água, tornando-o mais eficiente e previsível gerando uma diminuição nos gastos com agentes químicos desinfetantes.

Estudos adicionais sobre a abundância e transmissão vertical e horizontal de agentes patogênicos primários e oportunistas são necessários para estabelecer um controle eficaz contra infecções microbianas nos laboratórios de produção aquícolas.

LITERATURA CITADA

- APHA, AWWA, WEF. 1994. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Franson MA. (ed), American Public Health Assoc., Washington, D.C.
- AUSTIN, B.; D.A. AUSTIN. 1987. *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. John Wiley & Sons, West Sussex, 364 p.
- BOYD, C.E., L. MASSAUT. 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture, *Aquaculture*, 20:13-132.
- COSTERTON J.W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Indust. Microbiol.* 15:137-140.
- EATON A.D., L.S. CLESCERI, A.E. GREENBERG. 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19 th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- FAO. 2003. Health Management and Biosecurity Maintenance in White Shrimp (*Penaeus vannamei*) Hatcheries in Latin America. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER, nº 450, Rome, FAO, 58p.
- FLEGEL, T.W., V. ALDAY-SANZ. 1998. The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. *Journal of Applied Ichthyology* 14:269-273.
- KARUNASAGAR, I., R. PAI, G.R. MALATHI, e , I. KARUNASAGAR. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.
- LAVILLA-PITOGO, C R., C. L. BATICADOS, E. R. CRUZ-LACIERDA L. D. DE LA PENA.1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*, 91:1-13.
- LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164:201-220.
- SKEJERMO, J., VADSTEIN O., 1999. Techniques for microbiological control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177:333-343.
- STUBBS, E. A. 2004. Indicadores de desempenho: natureza, utilidade y construcción. *Ciência da Informação*, Brasília, v. 33, n. 1, p. 149-154.
- WHITE, G. 1992. *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*. 3rd Ed. New York: Van Nostrand Reinhold.