

## Caracterização molecular e susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos de camarões

*Molecular characterization and susceptibility to antimicrobial drugs of isolated bacteria from shrimps ("Litopenaeus vannamei")*

FRANCO, Isabelle<sup>1\*</sup>; BAGALDO, Adriana Regina<sup>1</sup>; GIL, Laura<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Eduardo Alves Gamosa de<sup>3</sup>; ALBINATI, Ricardo Castelo Branco<sup>1</sup>; COSTA, Mateus Matiuzzi da<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Produção Animal, Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Virologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Laboratório de Biotecnologia, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco, Departamento de Zootecnia, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

\*Endereço para correspondência: isafelinos@hotmail.com

### RESUMO

Objetivou-se isolar bactérias provenientes do trato intestinal de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, por meio da caracterização bioquímica e molecular, atividade de inibição *in vitro* do *Bacillus cereus* e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. As espécies bacterianas identificadas foram *Aeromonas caviae* (n = 7), *Alcaligenes denitrificans* (n = 1), *Bacillus cereus* (n = 1) e *Enterobacter* spp. (n = 3). *Bacillus cereus* obtido neste estudo não apresentou atividade de inibição frente às demais bactérias isoladas de camarões. Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, foram observados 68,7% de eritromicina, 50% de tetraciclina, 81,2% de sulfametoxazol/trimetoprina, neomicina e estreptomicina, 12,5% de lincomicina e ampicilina, 87,5% de enrofloxacina e nitrofurantoína, 93,7% de ceftriaxona, 100% de norfloxacina e ácido nalidíxico. A caracterização molecular é útil para identificação dos microrganismos estudados. O ácido nalidíxico e a norfloxacina foram eficientes contra os isolados de camarões.

**Palavras-chave:** bactérias, carcinicultura, drogas antimicrobianas.

### SUMMARY

The objective was to isolate bacteria from gut of shrimps from *Litopenaeus vannamei*, by biochemical characterization and molecular identification, inhibition activity *in vitro* of *Bacillus cereus* and sensitivity pattern determination. The bacterial species isolated were: *Aeromonas caviae* (n = 7), *Alcaligenes denitrificans* (n = 1), *Bacillus cereus* (n = 1) and *Enterobacter* spp. (n = 3). *Bacillus cereus* isolated in this study did not have inhibitory activity to other shrimps isolated bacteria evaluated. In the susceptibility to antimicrobial drug test, it were observed 68,7% to erythromycin, 50% to tetracycline, 81,2% to trimethoprim:sulfamethoxazole, neomycin and streptomycin, 12,5% to lincomycin and ampicillin, 87,5% to enrofloxacin and nitrofurantoin, 93,7% to ceftriaxone, 100% to norfloxacin and nalidixic acid. The characterization molecular is important on identifying the microorganisms studied. The nalidixic acid and norfloxacin are antimicrobial drugs with high sensitivity for bacteria isolated from shrimps.

**Keywords:** antimicrobial drugs, bacteria, shrimp production

## INTRODUÇÃO

A atividade do cultivo de camarão é um dos segmentos da aquicultura de maior destaque no setor pesqueiro mundial, pois constitui uma das alternativas de elevado crescimento econômico no setor primário, em que a qualificação de mão de obra não representa impedimento para a implantação dos empreendimentos. O cultivo de camarão também contribui de forma positiva para o desenvolvimento de tecnologias que beneficiam toda a aquicultura (CARLI, 2002; ROCHA, 2007).

Como ocorre com os outros animais, as doenças de camarões resultam do desequilíbrio entre o organismo, o ambiente e o patógeno. Quando ocorrem mudanças bruscas no meio ambiente, o sistema imune de defesa do organismo fica debilitado devido ao gasto de energia utilizado na sua adaptação às novas condições. Dessa forma, ele se torna mais vulnerável ao ataque de patógenos presentes no meio (SMITH et al., 2008).

As enfermidades que acometem os animais têm sido uma importante preocupação dos carcinicultores e podem ser responsáveis por perdas significativas de indivíduos na população e pelo decréscimo na produção de camarões (BUENO & GASTELÚ, 1998). A utilização de antibióticos na aquicultura pode selecionar bactérias resistentes e, dessa forma, representar risco para a saúde pública e ao meio ambiente (CHANG & LIU, 2002). As restrições ao uso de antimicrobianos, mediante imposições legais, aliadas a maior conscientização quanto à necessidade de garantir produtos saudáveis e inócuos ao consumidor final, contextualizam a importância de estudos sobre probióticos (SOTOMAYOR & BALCÁZAR, 2003). Segundo Verschuere et al. (2000), probióticos são adjuntos microbianos

vivos que têm efeito benéfico sobre um hospedeiro, ao modificarem a comunidade microbiana associada a ele ou ao ambiente. Seu uso na criação animal pode melhorar o valor nutricional do produto, ao acentuar a resposta do animal a doenças, ou ao aumentar a qualidade de seu ambiente imediato. Em estudo sobre o uso de probióticos em peixes, existe a relação e dependência direta entre a microbiota intestinal e o meio aquático, e diversas bactérias têm sido utilizadas em substituição aos antimicrobianos no cultivo de camarões marinhos, com o objetivo de promover a saúde dos animais, com possibilidade de serem adicionadas diretamente à água, ou por meio de carreadores vivos, como artêmias e rotíferos, segundo descrições de Cahill (1990).

Na literatura, é possível encontrar estudos que identificam alguns microrganismos com ação probiótica que podem ser utilizados na criação de peixes em cativeiro, entretanto, para a carcinicultura, poucas são ainda as pesquisas realizadas (GILDEBERG et al., 1995; BOIJINK & BRANDÃO, 2001). Objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização bioquímica e molecular de bactérias provenientes do trato intestinal de camarões, bem como determinar a atividade de inibição *in vitro* do *Bacillus cereus* e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados bacterianos obtidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram feitas seis coletas de camarões cinza (*Litopenaeus vannamei*), adaptados à água doce, no estágio juvenil e alimentados com ração, sacos plásticos estéreis vedados imediatamente de forma asséptica, sem contato direto com os

camarões, na Fazenda BAHIA PESCA, especializada em aquicultura, localizada no município de Santo Amaro/BA. A partir dos espécimes coletados, foram obtidos os conteúdos digestivos por meio da remoção de todo o trato intestinal dos camarões após a desinfecção dos mesmos com álcool a 70%, cujo excesso foi removido por evaporação. O material obtido foi então encaminhado para o isolamento e identificação no Laboratório de Bacterioses (LABAC) da UFBA com a utilização da capela de fluxo laminar para evitar contaminações cruzadas.

Para o isolamento dos microrganismos, foram realizados quatro “pools” do trato intestinal (com cinco camarões em cada) em seis coletas, semeados em diferentes meios de cultura. Foram utilizados tubos com APA (Água Peptonada Alcalina) e APT (Água Peptonada Tamponada), meios selecionados para o pré-enriquecimento das bactérias, ambos incubados a 25°C por 24 a 48 horas. Em seguida, uma alíquota de cada meio, retirada com alça de platina, foi semeada pela técnica de esgotamento por estrias, em placas de Ágar Sangue Ovino 5%, ágar TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrase) e ágar TSA (Tryptone Soya Agar), que foram incubadas a 25°C por 24 a 48 horas.

A identificação das bactérias, após isolamento, foi realizada por meio de características morfológicas, bioquímicas (provas de catalase, oxidase, citrato, mobilidade, ureia, manitol, glicose, sacarose, adonitol, lactose, malonato, vermelho de metila, indol, inositol, esculina, gelatina, redução de nitrato, lisina, arginina, ornitina e oxidação/fermentação) e tintoriais, conforme descrições de Quinn et al. (1994). As bactérias com perfil fenotípico de *Aeromonas* spp. foram submetidas à técnica de reação em cadeia da

polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática, para caracterização da espécie bacteriana. Essa técnica seguiu descrições de Borrel et al. (1997) & Ghatak et al. (2007) e foi realizada no Laboratório de Microbiologia no Campus da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Na PCR foram utilizados *primers* AerRFLP/F

5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3' e AerRFLP/R

5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'

específicos para o fragmento de DNA que codifica o rRNA16S do gênero *Aeromonas*. Para realização da reação, foram utilizados 2µL de DNA molde, *primers* (0,5ng de cada), *Taq buffer* (10mM Tris, 50mM KCl, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>), 1mM de dNTPs, 0,125 U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotech) e água ultra pura (Ludwig Biotech) q.s.p 20µL. As condições para amplificação seguiram descrições de Borrel et al. (1997) & Ghatak et al. (2007), com algumas modificações e envolveram a desnaturação a 94°C por 2 min e 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30seg, anelamento a 46,7°C por 30seg e um passo de extensão a 72°C por 2min. Após a ciclagem, foi realizada uma extensão final a 72°C por 7min.

Para os isolados com identificação fenotípica duvidosa, foi realizada uma reação de PCR com *primers* universais para amplificação de um fragmento de aproximadamente 800pb correspondente a uma região que codifica a subunidade 16S do rRNA de bactérias (FREDRICKS & RELMAN, 1998). Os fragmentos amplificados foram purificados a partir de géis de agarose de acordo com a metodologia descrita por Li & Ownby (1993) e submetidos ao sequenciamento automático em equipamento MegaBace500. A reação de terminação de cadeia foi implementada com o uso do kit DYEnamic ET. As

sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas no GenBank (BENSON et al., 2002), pelo programa BLASTn. Para um alto nível de qualidade das sequências, admitiram-se índices de confiança para cada nucleotídeo acima de 97% e níveis de identidade de sequência acima de 93%, em que  $E = 1e-100$ .

O teste de inibição *in vitro* dos microrganismos foi realizado conforme descrições de (SPANGGAARD et al., 2001). As bactérias foram inoculadas em caldo Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, com auxílio de *swabs*, foram semeadas em placas de Petri com ágar Mueller Hinton, em que foram realizadas perfurações, para inoculação de 20µL, por meio de suspensão bacteriana do potencial probiótico (*Bacillus cereus*), bactéria escolhida devido aos relatos na literatura da atividade antimicrobiana (GOMEZ-GIL et al., 2000; HONG et al., 2005). Para o teste, a turvação bacteriana foi ajustada de acordo com a escala 0,5 MacFarland ( $10^6$ UFC/ml), e as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

A avaliação da atividade inibitória *in vitro* foi realizada com observação da formação de halos de inibição do crescimento das bactérias avaliadas. O teste de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado, a partir de uma turvação microbiana na escala 0,5 de Mac Farland em caldo Mueller Hinton (BAUER et al., 1966; NCCLS, 2000). Essa cultura foi transferida com *swab* estéril para placas de ágar Mueller Hinton, em que foram aplicados os discos com os antimicrobianos: lincomicina (2µg), enrofloxacina (5µg), ceftriaxona (30µg), nitrofurantoína (300µg), estreptomomicina (10µg), norfloxacina (10µg), neomicina (30µg), ampicilina (10µg), eritromicina (15µg), ácido nalidíxico (30µg),

sulfametoxazol/trimetoprina (25µg), tetraciclina (30µg). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, em seguida, foi realizada a leitura dos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização bioquímica dos isolados permitiram a identificação de *Aeromonas* spp. (n = 2), *Plesiomonas shigelloides* (n = 1), *Pasteurella* spp. (n = 2), *Enterobacter aerogenes* (n = 2), Bacilos gram-negativos (n = 2), *Aeromonas salmonicida* (n = 1), *Vibrio alginolyticus* (n = 1), *Vibrio parahaemolyticus* (n = 1), *Bacillus* spp. (n = 1), *Vibrio* spp. (n = 1) e *Alcaligenes denitrificans* (n = 1). Para identificação da espécie de alguns desses isolados e confirmação de sua identidade na caracterização molecular, foram identificados os seguintes microrganismos (Tabela 1) *Aeromonas caviae* (n = 7), *Alcaligenes denitrificans* (n = 1), *Bacillus cereus* (n = 1) e *Enterobacter* spp. (n = 3).

O complexo *Aeromonas* agrega bactérias patogênicas importantes em peixes e causa septicemias e perdas econômicas associadas ao cultivo mundial de peixes (COSTA & CYRINO, 2006). As metodologias para identificação das espécies de *Aeromonas* abrangem o estudo de complexas rotas metabólicas, que se reflete em diversos testes bioquímicos (ABOTT, 1992), de diferenças em componentes celulares e nas sequências de nucleotídeos (FIGUERAS et al., 2000). Neste estudo, o polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) (BORREL et al., 1997), foi utilizado para identificação de algumas espécies, bem como a técnica de amplificação do DNA por PCR para a detecção desses microrganismos através

de seus produtos de secreção (CASCÓN et al., 1996), e a espécie *A. caviae* foi encontrada nos isolados de camarões. É importante destacar que isolados identificados bioquimicamente como *Vibrio* spp. foram classificados pela PCR

como *A. caviae*, o que indica a importância da técnica de PCR para discriminação dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* cujas características bioquímicas podem ser similares.

Tabela 1. Caracterização bioquímica e molecular de bactérias isoladas em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*

Isolado	Identificação Bioquímica	PCR RFLP rRNA 16S <i>Aeromonas</i> spp.	Sequenciamento rDNA 16S
01	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
02	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
03	<i>Pasteurella</i> spp.	NR	NR
04	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
05	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NR	NR
06	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NR	NR
07	Bacilos gram -	Negativo	<i>Enterobacter</i> spp.
08	Bacilos gram -	Negativo	<i>Enterobacter</i> spp.
09	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
10	<i>Pasteurella</i> spp.	NR	<i>Enterobacter</i> spp.
11	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
12	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
13	<i>Bacillus</i> spp.	NR	<i>Bacillus cereus</i>
14	<i>Vibrio</i> spp.	<i>Aeromonas caviae</i>	NR
15	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	NR	<i>Alcaligenes denitrificans</i>

NR = não Realizado.

Além dessa discriminação, os métodos moleculares foram essenciais à identificação de outras bactérias, como *Enterobacter* spp. e *Bacillus cereus* cuja identificação fenotípica convencional pode resultar em falhas. A técnica de PCR, principalmente quando associada ao sequenciamento de DNA, vem sendo muito útil à taxonomia de microrganismos (HA et al., 2002).

Em oposição a outros trabalhos na literatura (REPINGAT et al., 1998; RAVI et al., 2007), o isolado de *Bacillus cereus* obtido neste estudo não apresentou atividade de inibição *in vitro* para nenhum dos outros microrganismos isolados dos

camarões e com potencial patogênico para organismos aquáticos. Ravi et al. (2007) revelaram que *Bacillus cereus* são eficientes na inibição de patógenos em larvas de camarões, como *Vibrio* spp. e *Vibrio harveyi*, ambos *in vitro* e *in vivo*. Algumas espécies de *Bacillus* spp. têm mostrado atividade inibitória contra vários patógenos (RENGIPAT et al., 1998). Diversos estudos informaram que esse microrganismo produz antibióticos polipeptídeos, como a bacitracina, gramicidina S, polimixina e tirotricidina, que são ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (PEREZ et al., 1993).

Todos os 15 isolados de camarões cinza (*Litopenaeus vannamei*), foram sensíveis à norfloxacina e ao ácido nalidíxico. Com relação às demais drogas antimicrobianas testadas, os perfis de susceptibilidade obtidos foram de 68,7% a eritromicina,

50% a tetraciclina, 87,5% a nitrofurantoína, 81,2% a sulfametoxazol/trimetoprina, neomicina e estreptomicina, 12,5% a lincomicina e ampicilina (Figura 1).

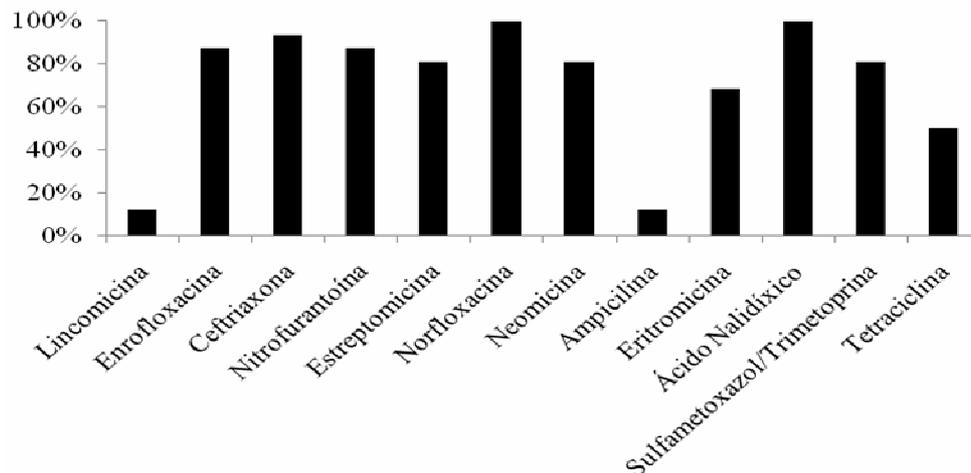


Figura 1. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados bacterianos obtidos de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*

*Aeromonas* spp. é um dos principais patógenos na aquicultura e pode ocasionar infecções alimentares em seres humanos (AUSTIN & AUSTIN, 1993). Os isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos, com destaque para o ácido nalidíxico e a norfloxacina, o que corrobora com resultados de Costa et al. (2008). Neste experimento, foi observado que os isolados foram menos sensíveis à lincomicina e à ampicilina. A resistência a esses antimicrobianos pode ser disseminada por plasmídeos (AKIMBOWALE et al., 2006). Da mesma forma, os isolados de *Aeromonas* spp. (n = 8) possuem uma resistência à ampicilina, o que é também descrito na literatura (SAAVEDRA et al., 2004). Essa situação tem alertado para a necessidade da criação de medidas profiláticas e terapêuticas eficazes, ambientalmente

corretas e que não tragam risco à saúde humana. O controle de doenças na aquicultura exige, cada vez mais, uma abordagem efetiva e ambientalmente segura (SMITH et al., 2008).

O desenvolvimento de um probiótico efetivo, para qualquer sistema de produção de organismos aquáticos requer a identificação de probiontes normalmente encontrados no ambiente aquático e no trato intestinal, de forma a considerar a complexidade de relações entre hospedeiro e habitat (VERSCHUERE et al., 2000). Neste trabalho, a partir do intestino dos animais, foi encontrado isolado de *Bacillus cereus*, uma das principais espécies descritas como probióticos na aquicultura (GOMEZ-GIL et al., 2000). Apesar de os bacilos não serem considerados bactérias autóctones, fato que poderia tornar inviável sua

utilização como probiótico, muitos apresentam um ciclo de vida duplo, que envolve germinação de esporos, proliferação e reesporulação sob condições adversas, o que lhes permite crescer e sobreviver no meio ambiente e no intestino de animais. Esse ciclo é a base do seu efeito probiótico (HONG et al., 2005). Não foram encontrados relatos que descrevam *B. cereus* como patogênico para camarões *Litopenaeus vannamei*. Neste estudo não foi encontrada nenhuma atividade de inibição do *Bacillus cereus* para as bactérias testadas. Contudo, outros estudos devem ser realizados para confirmar atividade inibitória dessa espécie, uma vez que vários fatores podem estar associados com a inibição de patógenos por probióticos, como a exclusão competitiva (GULLIAN et al., 2004).

Nesta pesquisa, obteve-se também o isolamento de microrganismos do gênero *Enterobacter*. Em seu estudo, McDaniel (1979) encontrou essas bactérias em 2% dos animais avaliados, sendo que não foram encontrados outros relatos de doenças causadas por esse microrganismo em peixes. A maioria das doenças gastrintestinais causadas por representantes da família *Enterobacteriaceae* envolvem surtos pelo consumo de alimentos do mar e água não tratada (SALERNO et al., 2007), o que indica impacto à saúde pública e fraco potencial probiótico.

Por conta da crescente preocupação de técnicos e da população com a presença dos resíduos de antimicrobianos nos produtos para consumo humano e animal e com a seleção de bactérias resistentes (CABELLO, 2006), a busca por técnicas alternativas para controle de doenças é muito importante. Neste sentido, o isolamento e a caracterização de bactérias encontradas normalmente no ambiente aquático são fundamentais

para a investigação de potenciais probióticos (VERSCHUERE et al., 2000). Contudo, os microrganismos isolados do ambiente aquático possuem uma caracterização bioquímica laboriosa e, em alguns pontos, imprecisa (HARMSSEN & KARCH, 2004). Nesse sentido, o uso de técnicas moleculares tem se mostrado eficaz como uma ferramenta de apoio, o que foi observado neste estudo, em que as técnicas moleculares, em particular o sequenciamento do fragmento do gene que codifica para o rRNA 16S, permitiu a correta identificação dos microrganismos. As técnicas de PCR-RFLP e o sequenciamento do fragmento que codifica para o rRNA 16S são úteis para reduzir problemas na caracterização fenotípica dos microrganismos estudados.

Os camarões podem ser portadores de bactérias descritas como patogênicas, logo a busca por medidas alternativas deve ser adotada, como o manejo adequado e o uso de antimicrobianos planejado com a finalidade de reduzir riscos aos seres humanos e ao ambiente. Os resultados obtidos neste trabalho são uma preocupação no que diz respeito à resistência antibiótica em relação à saúde pública, ambiental e ao setor econômico.

## REFERÊNCIAS

- ABOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; KROSKE-BYSTROM, S.; MALEKZADEH, T.; JANDA, J.M. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.5, p. 1262-1266, 1992. [ [Links](#) ].

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal Applied Microbiology**, v.110, p.1103-1113, 2006. [ [Links](#) ].

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish**. Ellis Horwood, Chichester, UK, 1993. p.196-224. [ [Links](#) ].

BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966. [ [Links](#) ].

BENSON, D.A.; MIZRACH-KARSCH, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.1, p.17-20, 2002. [ [Links](#) ].

BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, D.A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de Jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.687-690, 2001. [ [Links](#) ].

BORREL, N.; ACINAS, S.G.; FIGUERAS, M-J.; MARTINEZ-MURCIA, A.J. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.7, p.1671-1674, 1997. [ [Links](#) ].

BUENO, S.L.S.; GASTELÚ, J.C. Doenças em camarões de água doce. In: Valenti, C.W. **Carcinicultura de água doce**. Brasília: IBAMA, 1998. 308p. [ [Links](#) ].

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v.8, n.7, p.1137-1144, 2006. [ [Links](#) ].

CAHILL, M.M. Bacterial flora of fishes: a review. **Microbiology Ecology**, v.19, n.1, p.21-41, 1990. [ [Links](#) ].

CARLI, J.C. Carcinicultura: produção de camarão marinho aumentou 83,5%. **CNA**, n.185, julho de 2002. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/site/noticia.php?n=1085>>. Acesso em: 11 jun. 2008.

CASCÓN, A.; ANGUITA, J.; HERNANZ, C.; SÁNCHEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; NAHARRO, G. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1167-1170, 1996. [ [Links](#) ].

CHANG, C.I.; LIU, W.Y. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. **Journal of Fish Diseases**, v.25, n.5, p.311-315, 2002. [ [Links](#) ].

COSTA, A.B.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p.281-284, 2006. [ [Links](#) ].

COSTA, M.M.; PEIXOTO, R.M.; BOIJINK, C.L.; CASTAGNA, L.; MEURER, F.; VARGAS, A. C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.10, p.477-480, 2008. [ [Links](#) ].

FIGUERAS, M.J.; SOLER, L.; CHACÓN, M.R.; GUARRO, J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, n.6, p.2069-2073, 2000. [ [Links](#) ].

FREDERICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetholesulfonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.10, p.2810-2816, 1998. [ [Links](#) ].

GHATAK, S.; AGARWAL, R.K.; BHILEGAONKAR, K.N. Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, n.5, p.550-554, 2007. [ [Links](#) ].

GILDEBERG, A.; JOHANSEN, A.; BOGWALD, J. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fishprotein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v.138, n.1-4, p.23-24, 1995. [ [Links](#) ].

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v.191, n.1, p.259-270, 2000. [ [Links](#) ].

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, n.1-4, p.1-14, 2004. [ [Links](#) ].

HA, Y.M.; PARK, Y.H.; KIM, Y.J. A taxonomic study of *Bacillus* spp. isolated from Korean salt fermented anchovy. **Molecular Biology Today**, v.3, n.1, p.25-29, 2002. [ [Links](#) ].

HARMSEN, D.; KARCH, H. 16S rDNA diagnosing pathogens: a living tree. **ASM News**, v.70, n.1, p.19-24, 2004. [ [Links](#) ].

HONG, A.H.; DUC, H.L.; CUTTING, M.S. The use of spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.4, p.813-835, 2005. [ [Links](#) ].

LI, Q.; OWNBY, C.L. A rapid method for extraction of DNA from agarose gels using a syringe. **Biotechniques**, v.15, n.6, p.976-978, 1993. [ [Links](#) ].

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wahsington: WOLFE, 1994. 648p. [ [Links](#) ].

MCDANIEL, D. **Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens**. Washington: American Fisheries Society, 1979. 118p. [ [Links](#) ].

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved standard M2-A7. Wayne, NCCLS, 2000. [ [Links](#) ].

PEREZ, C.; SUAREZ, C.; CASTRO, G.R. Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans* cluster. **Folia Microbiol**, v.38, n.1, p.25-28, 1993. [ [Links](#) ].

RAVI, A.V.; MUSTHAFI, K.S.; JEGATHAMMAL, G.; KATHIRESAN, K.; PANDIAN, S.K. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.219-223, 2007. [ [Links](#) ].

RENGIPAT, S.; PHIANPHAK, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. **Aquaculture**, v.167, n.3/4, p.301-313, 1998. [ [Links](#) ].

ROCHA, I.P. Carcinicultura brasileira: desenvolvimento tecnológico, sustentabilidade ambiental e compromisso social. **Revista da ABCC**, setembro 2007. [ [Links](#) ].

SALERNO, A.; DELÉTOILE, A.; LEFEVRE, M.; CIZNAR, I.; KROVACEK, K.; GRIMONT, P.; BRISSE, S. Recombing population structure of *Plesiomonas shigelloides* (*Enterobacteriaceae*) revealed by multilocus sequence typing. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.21, p.7808-7818, 2007. [ [Links](#) ].

SAAVEDRA, M.J.; GUEDES-NOVAIS, S.; ALVES, A.; REMA, P.; TACÃO, M.; CORREIA, A.; MARTINEZ-MURCIA, A. Resistance to B-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Microbiology**, v.7, n.3, p.207-211, 2004. [ [Links](#) ].

SMITH, P. R.; BRETON, A. L., HOSBERG, T. E.; CORSIN, F. Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guide antimicrobial use in animals**. Oxford, Blackwell Publishing, 2008. p.206-217. [ [Links](#) ].

SOTOMAYOR, M.A.; BALCÁZAR, L.J. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. **Revista AquaTic**, v.9, p.9-15, 2003. [ [Links](#) ].

SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, J.; SICK, E.B.; PIPPER, C.B.; MARTINUSSEN, T.; SLIERENDRECHT, W.J.; GRAM, L. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. **Environmental Microbiology**, v.3, n.12, p.755-65, 2001. [ [Links](#) ].

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SOGRECOOS P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.655-671, 2000. [ [Links](#) ].

Data de recebimento: 25/06/2009

Data de aprovação: 29/03/2010