

CAROLINA NOTARO DE BARROS

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS EM BELJUPIRÁ
CULTIVADO**

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

CAROLINA NOTARO DE BARROS

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS EM BELJUPIRÁ
CULTIVADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes

RECIFE

2016

Ficha catalográfica

B277p Barros, Carolina Notaro de
Prospecção de bactérias intestinais em beijupirá cultivado /
Carolina Notaro de Barros. – Recife, 2016.
100 f. : il.

Orientador: Emiko Shinozaki Mendes.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2016.

Inclui anexo(s), apêndice(s) e referências.

1. *Rachycentron canadum* 2. Cobia 3. Bacterioses
4. Antibiograma 5. Probiótico 6. rRNA 16S I. Mendes, Emiko
Shinozaki, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS EM BELJUPIRÁ
CULTIVADO

Tese de Doutorado elaborada por
CAROLINA NOTARO DE BARROS

Aprovada em 29 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Orientadora – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia da UFRPE

Dra. Andréa Christianne Gomes Barretto
Inspetora Sanitária da Prefeitura do Recife e Coordenadora de Curso do IFPE

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Dr. João Menezes Guimarães
Médico Veterinário

Dedico este trabalho à pessoa mais importante da minha vida, a quem devo todas as minhas conquistas, Vera Lúcia Notaro Wanderley, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento do projeto de pesquisa.

À minha orientadora Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes, pela orientação, confiança, cuidado, preocupação, paciência, conselhos e pela oportunidade dada para realizar o doutorado.

Ao professor Dr. Ronaldo Olivera Cavalli e sua equipe, pela parceria e concessão dos animais requeridos para realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, pela fundamental ajuda no âmbito da biologia molecular.

Ao professor Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes pela ajuda no delineamento experimental e ao Me. Gualberto Segundo Agamez Montalvo pelas análises estatísticas dos dados.

Aos professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco que contribuíram para minha formação.

À equipe do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ) e Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) da UFRPE, pessoas que ajudaram direta e indiretamente para a realização dessa pesquisa.

A Fernanda Meirelles e Renata Valença, pelos exemplos de disciplina, dedicação e companheirismo no ambiente de trabalho, que levarei sempre para minha vida.

À família e amigos pelo suporte emocional durante os anos de doutorado, em especial para minha mãe, Vera Lúcia, meu irmão, Lucas Notaro, avó Josilda Notaro, pai Carlos Janduy, tio Orlando Wanderley, amigos Rejane Luna, Fabíola Carneiro, Juliana Carvalho, Juliana Vidal, Virgínia Pedrosa, João Guimarães e à família Moraes pelo apoio no momento da escrita e finalização da tese.

À banca examinadora que se propôs a avaliar, sugerir e contribuir para melhoria do trabalho de tese.

“Que ninguém se engane, só consigo a simplicidade através de muito trabalho. Enquanto eu tiver perguntas e não houver resposta continuarei a escrever.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

A ocorrência de doenças bacterianas representa restrição à expansão do cultivo intensivo de beijupirá (*Rachycentron candum*) em tanques-rede e são tratadas normalmente com administração de antibióticos, que usados inadequadamente podem provocar o desenvolvimento de bactérias resistentes, chegar aos peixes selvagens, outros animais e afetar piscicultores e consumidores do produto. Objetivou-se identificar a diversidade bacteriana Gram-negativa, potencialmente patogênica multirresistentes a antibióticos e Gram-positiva, potencialmente probiótica frente a *Vibrio* spp., isoladas do intestino de beijupirá cultivado *offshore* sob influência de distintos períodos do ano. Foram coletados dez alevinos e 30 juvenis, dos quais 82,5% exibiram indícios de infecção bacteriana e 47,5% de nefrocalcinose. Das 72 linhagens Gram-negativas identificadas por bioquímicos, 86,11% apresentaram concordância com a classificação molecular. Foram descritas 18 espécies, 12 gêneros e cinco famílias, Aeromonaceae, Neisseriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae e Enterobacteriaceae, sendo a última mais representativa (63,88%). As espécies mais frequentes foram *Enterobacter cloacae* (27,78%) e *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (25%), maior patógeno do beijupirá. 95,83% dos isolados foram resistentes à penicilina (6,25 µg), 62,50% a ampicilina (10µg) e 15,28% a enrofloxacin (5 µg). 69,44% foram multirresistentes aos antibióticos e a linhagem com maior índice de resistência múltipla a antimicrobianos (MAR) foi da espécie *E. cloacae* (0,8571). Com relação às bactérias Gram-positivas, foram isoladas 53 linhagens classificadas em 13 espécies, pertencentes às famílias Enterococcaceae, Paenibacillaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae e Bacillaceae, sendo a última mais representativa na qual inclui *Bacillus cereus*, a espécie mais frequente (39,62%). 16,98% dos isolados apresentaram atividade antibacteriana, produzindo halos de inibição que variaram de 9,33 ± 0,58 a 28,77 ± 0,25 mm, frente ao *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*. As espécies com atividade antibacteriana foram *Staphylococcus piscifermentans*, *S. lugdunensis*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *E. faecium* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *E. faecium* (33,33%) foi a espécie mais representativa, incluída no gênero *Enterococcus* spp. responsável pelos maiores halos de inibição especialmente frente ao *V. vulnificus*. O período do ano não influenciou significativamente ($P \geq 0,05$) na diversidade bacteriana intestinal do beijupirá, na multirresistência das Gram-negativas, nem no número de Gram-positivas com propriedades antimicrobianas. O intestino do *R. canadum* inclui bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas para animais aquáticos e humanos, com elevadas taxas de multirresistência aos antimicrobianos testados, Gram-positivas patogênicas oportunistas para humanos e linhagens com atividade antimicrobiana frente à víbrios. As espécies Gram-positivas identificadas são consideradas probióticas para outras espécies de peixes e após os resultados encontrados nesse estudo, potenciais probióticas para beijupirá como alternativa profilática e/ou terapêutica frente às vibrioses.

Palavras-chave: *Rachycentron canadum*, cobia, bacterioses, antibiograma, probiótico, rRNA 16S

ABSTRACT

Bacterial diseases restrict the expansion of intensive sea cage coibia (*Rachycentron canadum*) farming. They are usually treated with antibiotics, which in excess may lead to bacterial drug-resistance. Antibiotic residue can also reach the wild fish or other animals, fish farmers and fish consumers. In this study it was aimed to identify, by biochemical and molecular tests, potentially pathogenic Gram-negative bacteria multi-resistant to antibiotics and potentially probiotic Gram-positive bacteria isolated from farmed coibia intestine in different periods of the year. Ten fingerlings and 30 juveniles were collected, of which 82.5% showed evidence of bacterial infection and 47.5% of nephrocalcinosis. Biochemical and molecular identification results agreed in 86.11% of the 72 Gram-negative strains isolated. There were identified 18 species, 12 genera and five families, Aeromonaceae, Neisseriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae and Enterobacteriaceae, the last one being more significant (63.88 %). The most frequent species were *Enterobacter cloacae* (27.78%) and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (25%), greater pathogen to coibia. Antibiogram showed that 95.83% of the strains were penicillin resistant (6,25 µg), 62.50% ampicillin resistant (10 ug) and 15.28% enrofloxacin resistant (5 ug). Antibiotic multi-resistance was detected in 69.44% of the strains tested and *E. cloacae* achieved the highest MAR rate (0.8571). Regarding Gram-positive bacteria, 53 strains were obtained and classified in 13 species of the families Enterococcaceae, Paenibacillaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae e Bacillaceae. *Bacillus cereus* was the most frequent species (39.62%) and Bacillaceae the most representative family. Antibacterial activity was observed in 16.98% of the strains, which produced inhibition zones ranged from 9.33 ± 0.58 to 28.77 ± 0.25 mm against *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. Species presenting antibacterial activity were *Staphylococcus piscifermentans*, *S. lugdunensis*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Of these, *E. faecium* was the most significant species (33.33%) producing the largest inhibition zones especially against *V. vulnificus*. Period of year was not significant ($P \geq 0.05$) for coibia's intestinal bacterial diversity, multidrug resistance of Gram-negative, or to the quantity of Gram-positive with antimicrobial properties. Intestine from *R. canadum* contains Gram-negative bacteria multi-drug resistant and potentially pathogenic to aquatic animals and humans, and Gram-positive bacteria with antimicrobial activity against vibrios, which must be considered as a prophylactic and/or therapeutic alternative against vibriosis in coibia farming.

Keywords: *Rachycentron canadum*, coibia, bacteriosis, antybiogram, probiotic, 16S rRNA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial do beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). 15
- Figura 2.** Alevinos de beijupirás coletados de berçários instalados em Ipojuca/PE. 16
- Figura 3.** Maiores produtores mundiais do beijupirá, *Rachycentron canadum*. 17
- Figura 4.** Produção de pesca extrativa do beijupirá, *Rachycentron canadum*, no Brasil 18
- Figura 5.** Tanques-rede flutuantes de fazendas marinhas no litoral de Pernambuco, Empresa Aqualider Maricultura Ltda **(a)** e **(b)**, Projeto Cação de Escama – UFRPE **(c)**. 19

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Principais doenças bacterianas do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , cultivado. | 23 |
| Tabela 2. | Quimioterápicos registrados no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em aquicultura no Brasil. | 28 |
| Tabela 3. | Bactérias probióticas testadas <i>in vivo</i> para uso na piscicultura. | 34 |
| | | |
| Artigo I | Bactérias patogênicas multirresistentes a antimicrobianos isoladas do intestino de beijupirá cultivado. | |
| Tabela 1. | Frequências de bactérias Gram-negativas isoladas do intestino de beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , cultivado em Pernambuco, Brasil | 55 |
| Tabela 2. | Lesões externas e internas observadas em beijupirás cultivados em Pernambuco, Brasil. | 56 |
| Tabela 3. | Antibiograma de bactérias isoladas do intestino de beijupirá cultivado em Pernambuco, Brasil. | 59 |
| Tabela 4. | Multirresistência de bactérias isoladas do intestino de beijupirá cultivado em Pernambuco, Brasil. | 60 |
| | | |
| Artigo II | Identificação genotípica e atividade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de beijupirá. | |
| Tabela 1. | Condições de cultivo <i>offshore</i> de beijupirá em Pernambuco, Brasil. | 70 |
| Tabela 2. | Frequências de bactérias Gram-positivas isoladas do intestino de 40 beijupirás, <i>Rachycentron canadum</i> , cultivados em Pernambuco, Brasil . | 74 |
| Tabela 3. | Atividade antibacteriana de bactérias isoladas do intestino de beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , frente a <i>Vibrio</i> spp. | 76 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| µg | Micrograma |
| µl | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| Amp | Ampicilina |
| ANOVA | Análise de variância |
| BJM | Brazilian Journal of Microbiology |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Pares de base |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| Clo | Cloranfeicol |
| CLSI | Clinical & Laboratory Standards Institute |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| DP | Desvio Padrão |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| Eno | Enrofloxacina |
| Fa | Frequência Absoluta |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FDA | Food and Drug Administration |
| Flf | Florfenicol |
| Fr (%) | Frequência relativa |
| FTR | Fator de transferência de resistência |
| g | Gramma |
| Gen | Gentamicina |
| h | Hora |
| kg | Quilograma |
| Km | Quilômetro |
| LASAg | Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos |
| m | Metro |

| | |
|----------------|---|
| m ³ | Metro cúbico |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MAR | Índice de Multiresistência a Antimicrobianos |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| MPA | Ministério da Pesca e Aquicultura |
| MRS | Man Rogosa and Sharpe Agar |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ng | Nanograma |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| p/v | Peso por volume |
| Pen | Penicilina |
| REPIMAR | Rede de Pesquisas em Piscicultura Marinha |
| s | Segundo |
| SEAP | Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca |
| SINDAN | Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal |
| t | Tonelada |
| TCBS | Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar |
| Tet | Tetraciclina |
| TSB | Tryptic Soy Broth |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| DEDICATÓRIA | iii |
| AGRADECIMENTOS | iv |
| EPÍGRAFE | v |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1. Beijupirá: biologia e aquicultura | 15 |
| 2.2. Bacterioses em beijupirá cultivado | 20 |
| 2.3. Quimioterapia e a resistência bacteriana | 24 |
| 2.4. Alternativas ao uso de antibióticos na piscicultura | 29 |
| 3. REFERÊNCIAS | 36 |
| 4. ARTIGO CIENTÍFICO I - Bactérias patogênicas multirresistentes a antimicrobianos isoladas do intestino de beijupirá cultivado. | 49 |
| 5. ARTIGO CIENTÍFICO II - Identificação genotípica e atividade antimicrobiana de bactérias isoladas do intestino de beijupirá. | 67 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 87 |
| 7. APÊNDICES | 88 |
| Apêndice A - Lesões externas e internas em beijupirá | 88 |
| Apêndice B - Sequenciamento do gene rRNA 16S | 89 |
| 8. ANEXO - Normas para publicação no <i>Brazilian Journal Microbiology</i> | 93 |

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura marinha apresenta taxas de crescimento superiores a 17% ao ano em todo o mundo (FAO, 2015b) e o beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) é um candidato promissor que pode alcançar de 4 a 6 kg no primeiro ano de cultivo, tem carne de excelente qualidade, alta fecundidade, facilidade de desova e boa adaptação ao ambiente de cultivo (BENETTI et al., 2010). No Brasil, está presente em todo o litoral e há iniciativa de pesquisadores de instituições públicas em São Paulo, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará e Rio Grande do Sul, e esforços de empresas privadas para estabelecer a técnica de cultivo no país (HAMILTON et al., 2013).

Dentre as dificuldades encontradas para cultivar o beijupirá no Brasil, é possível citar escassez de laboratórios de diagnóstico, prevenção, controle das enfermidades e pesquisas sobre doenças desse peixe (CAVALLI et al., 2011). A ocorrência de doenças bacterianas determina grandes prejuízos econômicos, restrição à expansão do cultivo intensivo em gaiolas e as vibrioses, fotobacterioses, micobacterioses, pseudomonoses, furunculoses e estreptococoses já acometem o beijupirá, sendo controladas rotineiramente com administração de antibióticos (MCLEAN et al., 2008; FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

A via de administração antimicrobiana mais comum na aquicultura é adicionada a ração, porém grande parte das drogas não metabolizadas pelos animais vai para água nas fezes. Estima-se que 75% dos antibióticos administrados para peixes são excretados (BURRIDGE et al., 2010), o que pode favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes, reduzir a efetividade do tratamento, causar efeitos colaterais nos peixes cultivados, chegar a outros organismos aquáticos, afetar piscicultores e consumidores finais (FORTT et al., 2007; ROMERO et al., 2012). As consequências do antibiótico residual podem ser atenuadas se terapias alternativas sustentáveis como vacinas, extratos de plantas e/ou probióticos forem utilizadas na prevenção das bacterioses (VERSCHUERE et al., 2000; ROMERO et al., 2012).

Compreender as relações bactéria-hospedeiro, bactéria-ambiente e hospedeiro-ambiente é importante para controlar agentes e prevenir doenças na piscicultura. A microbiota do trato gastrointestinal dos peixes revela importantes informações acerca da digestão, nutrição e controle de doenças (NAVARRETE et al., 2008). Dentre as abordagens moleculares utilizadas para estudar a diversidade bacteriana associada ao peixe está a análise da sequência de nucleotídeos do gene rRNA 16S, um método simples, habitualmente usado,

que fornece assinaturas únicas e se baseia na identificação do genoma, tornando possível a classificação e identificação de bactérias desconhecidas (TORTORA et al., 2012).

Objetivou-se reunir informações acerca da diversidade bacteriana potencialmente patogênica multirresistentes a antibióticos e potencialmente probiótica frente a *Vibrio* spp., isolada do intestino de beijupirá cultivado em sistema *offshore* sob influência de distintos períodos do ano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Beijupirá: biologia e aquicultura

Rachycentron canadum (Linnaeus, 1766), conhecido no Brasil como beijupirá, bijupirá, pirambijú, cação de escamas ou peixe rei (FREIRE e CARVALHO-FILHO, 2009) e internacionalmente como cobia, é um peixe teleósteo marinho pertencente à ordem Perciformes da família Rachycentridae. Pelágico e migratório pode ser encontrado tanto em ambientes costeiros como em alto mar de oceanos tropicais, subtropicais e sazonalmente em águas temperadas (SHAFFER e NAKAMURA, 1989). Sua distribuição (Figura 1) abrange uma área que favorece a aquicultura da espécie (FAO, 2015a).



Figura 1. Distribuição mundial do beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766).

O peixe (Figura 2) tem o corpo alongado, subcilíndrico, com pequenas escamas embutidas na pele grossa. Possui duas faixas prateadas ao longo do corpo, ligeiramente onduladas anteriormente. A parte dorsal tem coloração marrom escuro, a lateral marrom pálido ou amarelado e o ventre branco. Possui cabeça larga e achatada, boca grande terminal com projeção maxilar inferior, dentes viliformes e pequenos olhos (FAO, 2015a; SHAFFER e NAKAMURA, 1989).

Carnívoros, os beijupirás alimentam-se de invertebrados bentônicos, crustáceos e pequenos peixes ósseos. São solitários, mas na época de desova podem formar grupos ou associarem-se a peixes maiores, tubarões, raias e tartarugas marinhas (ARENDRT et al., 2001;

KAISER e HOLT, 2005). A maturação é relatada nos machos de 1-2 anos e nas fêmeas de 2-3 anos. A desova ocorre *nearshore* e *offshore* onde as fêmeas liberam ovos de 1,4 mm de diâmetro, que fecundados e viáveis são fortemente pigmentados, flutuantes, desenvolvem e eclodem em aproximadamente 24 horas (FAO, 2015a).



Figura 2. Alevinos de beijupirás coletados de berçários instalados em Ipojuca/PE.

Os peixes adultos selvagens atingem até 2 m de comprimento, 68 kg, toleram variações térmicas de 16 a 32°C, com preferência a águas acima de 20°C (KAISER e HOLT, 2005) e vivem em faixas de salinidade entre 22 e 44 (RESLEY et al., 2006). Não apresentam dimorfismo sexual externo, e a fêmea costuma ficar maior que o macho. As faixas laterais são mais acentuadas nos juvenis e obscurecem nos adultos. A média de vida é de 12 anos, mas há registro de beijupirá com 15 (SHAFFER e NAKAMURA, 1989; FAO, 2015a).

De origem Tupi-Guarani, “beijú” significa fécula de mandioca torrada (tapioca) e “pirá” de peixe. O Peixe beijú, de carne tão boa quanto o beijú, possui carne branca de excelente qualidade, textura firme e macia, rica em proteínas, altos níveis de ácidos graxos insaturados, vitamina E e aminoácidos (CHANG, 2003). A textura é pouco afetada pelo congelamento (GONÇALVES et al., 2014) e o segredo do sabor está no teor de gordura, o qual é maior em peixes cultivados que em selvagens (CHUANG et al., 2010). Essa característica da carne explica a procura dos restaurantes e a apreciação de consumidores quando o peixe é servido como sushis e sashimis (MIAO et al., 2009).

Acrescentada a qualidade da carne, o beijupirá apresenta outras características que o diferencia e o torna um candidato para aquicultura, entre elas, sua elevada taxa de crescimento (alcança de 4-6 kg no primeiro ano de cultivo) (CORIOLANO e COELHO, 2012), alta

fecundidade, facilidade de desova em cativeiro (ARNOLD et al., 2002), boa adaptação a tanques e gaiolas (HOLT et al., 2007) e conversão alimentar relativamente baixa (BENETTI et al., 2010) de aproximadamente 1,5:1 em Taiwan (FAO, 2015a).

Beijupirá foi cultivado primeiramente na Ásia em Taiwan no ano de 1993 em sistema de gaiolas em alto mar (LIAO et al., 2004). Atualmente a província produz 1.993 toneladas do peixe e há registro de produção na Colômbia (150 t), Vietnã (645 t), Panamá (980 t) e China (39.627 t), maior produtor da espécie (FAO, 2015b). O cultivo em escala comercial é mais intenso nos países Asiáticos, mas há iniciativas na Austrália, Ilhas Marshall, Estados Unidos, Porto Rico, Bahamas, Belize, República Dominicana, México e Brasil (BENETTI et al., 2010; CAVALLI et al., 2011; NUNES et al., 2014a). Após duas décadas a produção mundial chegou a quase 44 mil toneladas (Figura 3) (FAO, 2015b).

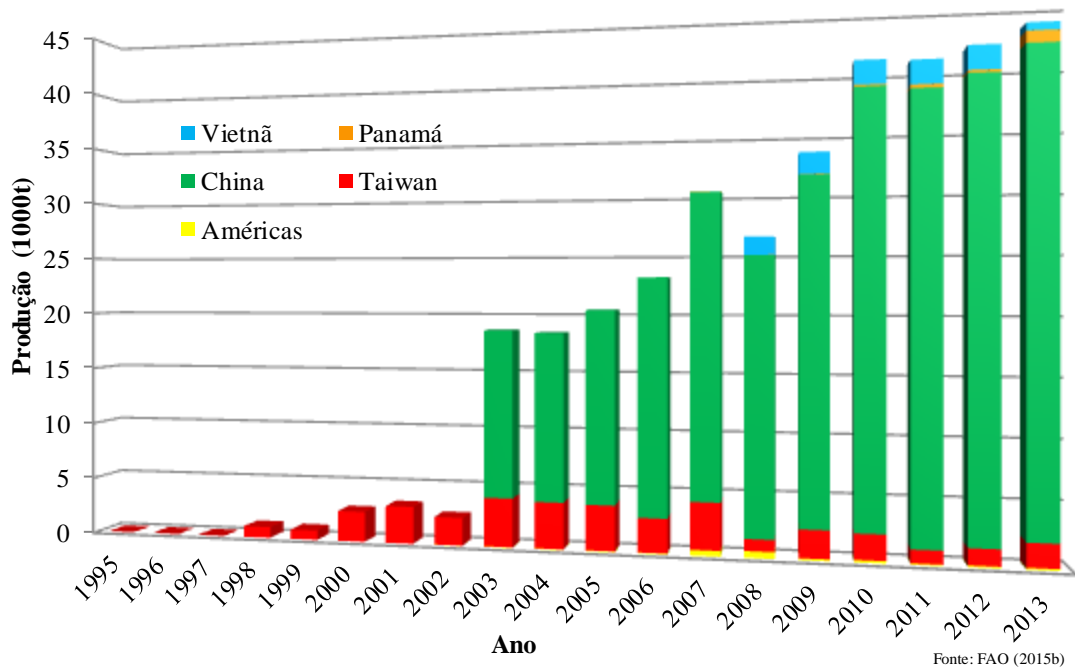


Figura 3. Maiores produtores mundiais do beijupirá, *Rachycentron canadum*.

Os principais sistemas de cultivo de beijupirá utilizam gaiolas e tanques-rede de diferentes formas e tamanhos instaladas em mar aberto, baías ou enseadas. São construídos para suportar condições adversas do mar para criação e manejo da espécie e é uma tendência mundial para o desenvolvimento da maricultura (NHU et al., 2011). A expansão da atividade de maricultura no Brasil geraria empregos e renda, elevaria a produtividade das áreas costeiras, e estimularia a cadeia produtiva do pescado, diminuindo a pressão extrativista sobre os recursos explorados (BENETTI et al., 2010; CORIOLANO e COELHO, 2012).

O Brasil pode se beneficiar da tecnologia de cultivo utilizada no exterior para cultivar beijupirá. O peixe está presente em todo o litoral do país, e há iniciativas de pesquisadores de instituições públicas e empresas privadas para estabelecer a técnica de cultivo no país (SAMPAIO et al., 2010; CAVALLI et al., 2011; HAMILTON et al., 2013). Projetos são desenvolvidos em São Paulo, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro (CAVALLI e HAMILTON, 2009), Maranhão, Ceará (NUNES, 2014) e Rio grande do Sul (SAMPAIO et al., 2011).

A piscicultura marinha ainda é rudimentar no Brasil. O beijupirá além de ser uma espécie pouco encontrada no comércio, devido à sua baixa captura pela pesca (Figura 4) e pouca popularidade, há grandes dificuldades em todas as áreas do ciclo produtivo, por se tratar de uma atividade relativamente recente. A pesca extrativa no país não alcançou 1500 t nos últimos anos, e apesar de projetos de engorda no país, a produção não superou 49 t em 2009 (CAVALLI et al., 2011; HAMILTON et al., 2013).

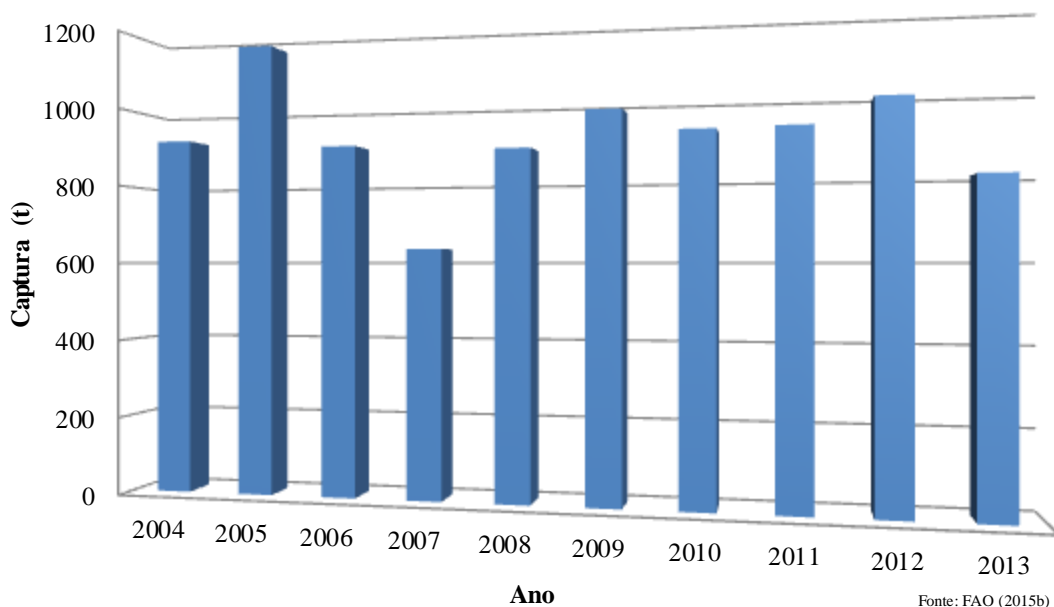


Figura 4. Produção de pesca extrativa do beijupirá, *Rachycentron canadum*, no Brasil.

Dentre as dificuldades encontradas para cultivar o beijupirá no Brasil é possível citar ausência de laboratórios altamente qualificados na produção de juvenis e dietas específicas, falta de seguro contra incidentes em alto mar, insuficiência de marketing na promoção do peixe e carência de mão de obra especializada na área, sobretudo na de sanidade. Há escassez de laboratórios de diagnóstico, prevenção, controle das enfermidades e pesquisas que

envolvam doenças do peixe (CAVALLI e HAMILTON 2009; CAVALLI et al., 2011; HAMILTON et al., 2013).

Em Pernambuco, o setor privado cessou investimentos para cultivar beijupirá, após execução de projeto piloto pioneiro em 2009 (Figura 5a), entre outros motivos, pelo aparecimento das enfermidades pouco ou quase desconhecidas causadas por patógenos específicos que suscetibilizam o peixe, notadamente nas primeiras fases de desenvolvimento (CAVALLI et al., 2011; ANDRADE et al., 2014). As doenças, especialmente as bacterianas, representam grandes perdas econômicas para aquicultura e restrição à expansão do cultivo intensivo em gaiolas (MCLEAN et al., 2008; CORIOLANO e COELHO, 2012).

Em 2009, a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) instalou quatro tanques-rede de 1.200 m³ em alto mar a 10 km da costa (Figura 5b), pelo “Projeto Cação de Escama: cultivo de beijupirá pelos pescadores artesanais do litoral de Pernambuco”, com objetivo principal de capacitar pescadores e adaptar a tecnologia de cultivo às condições brasileiras de forma sustentável. A equipe enfrentou dificuldades no que se refere às áreas de nutrição e sanidade, todavia, o projeto foi importante como base para diversos estudos científicos e envolveu pesquisadores de diferentes universidades ligadas a Rede de Piscicultura Marinha (REPIMAR) (CAVALLI et al., 2011; HAMILTON et al., 2013).



Figura 5. Tanques-rede flutuantes de fazendas marinhas no litoral de Pernambuco, Empresa Aqualider Maricultura Ltda (a) e (b), Projeto Cação de Escama – UFRPE (c).

Superados os obstáculos iniciais, o beijupirá dispõe de atributos promissores para aquicultura e pontos em comum com espécies aquáticas cultivadas comercialmente no Brasil (NUNES et al., 2014a). O peixe pode ser cultivado durante o ano todo na costa brasileira, com exceção da região sul, que no inverno alcança temperaturas abaixo de 19°C, entretanto, mesmo nessas condições pode alcançar 4 kg em um ano de cultivo (SAMPAIO et al., 2011). No processo de êxito da atividade aquícola marinha no Brasil é importante pesquisar informações que viabilizem a adaptação da tecnologia estrangeira às condições brasileiras e obter experiência em todas as áreas do cultivo, sobretudo na de sanidade (HAMILTON et al., 2013; ANDRADE, 2014).

2.2. Bacterioses em beijupirá cultivado

O beijupirá, assim como outras espécies recentes da piscicultura marinha, tem sido acometido por doenças infecciosas virais, parasitárias, fúngicas e bacterianas responsáveis por grandes prejuízos econômicos em todas as fases de cultivo (MCLEAN *et al.*, 2008; CORIOLANO e COELHO, 2012 ; FAO, 2015a). Em Taiwan, segundo maior produtor da espécie, controlar a incidência de organismos patogênicos é o maior desafio dessa atividade aquícola (FAO, 2015a). No Brasil, pouco se sabe sobre as doenças do beijupirá cultivado, eficácia das drogas, mecanismo de ação e consequências nas funções fisiológicas e bioquímicas do peixe (FIGUEIREDO e LEAL, 2008; CORIOLANO e COELHO, 2012).

As doenças de maior significância em cultivo intensivo de peixes são causadas por bactérias. O muco e pele de peixes marinhos contém um número aproximado de bactérias que varia de 10^2 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) a vários milhões/cm² e o fluido intestinal pode conter de 10^3 a 10^8 UFC/mL (GONÇALVES, 2011). A maioria dessas bactérias compõe a microbiota normal do animal e não causa nenhum mal, no entanto, em condições estressantes, que geralmente ocorre nas instalações de cultivo, os peixes podem ter seu sistema imunológico comprometido e haver um desequilíbrio entre as defesas naturais do animal e as características do micro-organismo de produzir doença (TORTORA et al., 2012).

A doença será expressa pela anormalidade no comportamento e/ou na integridade corpórea do peixe como resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e meio ambiente (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Para manter um cultivo aquítico bem-sucedido é necessário monitorar o ambiente, animal e manter o equilíbrio da diversidade microbiana (SCHULZE et al., 2006). A microbiota associada ao peixe reflete o ambiente onde o animal foi capturado, e

quanto mais poluído o local mais diversa será a microbiota bacteriana (GONÇALVES, 2011). O monitoramento da microbiota é importante para aplicação acertada de medidas profiláticas e corretivas no combate de doenças.

Toda a superfície externa do peixe está exposta às bactérias, que podem utilizar a pele, linha lateral, guelras e o trato gastrointestinal como via de infecção (BIRKBECK e RINGO, 2005; AUSTIN, 2006). Infecção é a invasão ou colonização do corpo por micro-organismos patogênicos, e pode estar presente na ausência de doença detectável. A colonização e distribuição dos micro-organismos no corpo do hospedeiro vão depender da disponibilização de nutrientes como fonte de energia de cada local. Os nutrientes podem ser derivados de produtos celulares secretados e excretados, substâncias em fluidos corpóreos, células mortas e alimentos do trato gastrointestinal (TORTORA et al., 2012).

A microbiota intestinal normal de peixes é bastante diversificada, e a redução dessa diversidade com uso de antibióticos, por exemplo, pode facilitar a proliferação ou a invasão de micro-organismos oportunistas (BATES et al., 2006; NAVARRETE et al., 2010; ROMERO et al., 2012). Isso acontece porque a microbiota normal do hospedeiro impede o crescimento de micro-organismos potencialmente perigosos, fenômeno conhecido como antagonismo microbiano ou exclusão competitiva (TORTORA et al., 2012).

A compreensão da relação entre bactérias e o trato gastrointestinal é importante para entender a influência das bactérias na saúde do hospedeiro (BATES et al., 2006). Ao chegar à mucosa do trato intestinal, as bactérias oportunistas e patogênicas podem causar danos ao intestino (AUSTIN, 2006; SCHULZE et al., 2006), alterações comportamentais, reduzir a ingestão de alimentos, modificar a microbiota natural e afetar a relação benéfica hospedeiro-microbiota (BATES et al., 2006; MCLEAN et al., 2008; ROMERO et al., 2012). Essas alterações prejudicam processos importantes como a proliferação epitelial, promoção do metabolismo dos nutrientes e a resposta imune inata do peixe (BATES et al., 2006).

As doenças bacterianas que mais ameaçam o beijupirá são as vibrioses, fotobacterioses, micobacterioses, furunculoses, estreptococoses e citrobacterioses (Tabela 1) (MCLEAN et al., 2008; ANDRADE et al., 2014; FAO, 2015a). As características e os sintomas das doenças infecciosas e não infecciosas no beijupirá são semelhantes, sendo necessário mais de um método para obter o diagnóstico definitivo (ANDRADE et al., 2014). As doenças sistêmicas têm altas taxas de mortalidade e causam grandes prejuízos econômicos na aquicultura (MCLEAN et al., 2008).

Os micro-organismos patogênicos mais estudados em beijupirá fazem parte da Família Vibrionaeae e são os causadores das vibrioses e fotobacterioses. O gênero *Vibrio* é um grupo

de bactérias Gram negativas, em forma bastonete curvo, anaeróbias facultativas (MACHEN, 2008) e têm na sua maioria uma exigência de cloreto de sódio (AUSTIN, 2010). No beijupirá, há relatos de isolamento de vibrios de rim, líquido amarelo de intestinos, lesões sistêmica hemorrágica e de úlceras no estômago de peixes moribundos e mortos (LIU et al., 2004; RAMESHKUMAR et al., 2014).

Todas as fases do ciclo de produção podem sucumbir a vibriose (MCLEAN, 2008), apesar dos peixes com menos de 4 meses de idade (<500 g) parecerem mais susceptíveis com mortalidade mais elevadas (LIN et al., 2006; MACHEN, 2008). Várias espécies foram isoladas de beijupirás, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* e *V. ordalii* (Tabela 1) e podem ser responsáveis por septicemia e mortalidade aguda (MACHEN 2008; MCLEAN, 2008; RAMESHKUMAR et al., 2014).

Além do beijupirá, os vibrios afetam outras espécies de peixes marinhos, camarões, moluscos (LIU et al., 2004) e são parte significativa das infecções de origem alimentar em humanos por ingestão desses produtos crus ou mal cozidos (AUSTIN, 2010). 70% dos relatos de surtos de gastroenterites no oriente foram associados ao *V. parahaemolyticus*. A dose infectante (10^6 a 10^9 micro-organismos) pode ser alcançada de uma população original de apenas 10 micro-organismos em 3 a 4 horas (SINDERMANN, 2006). O número de casos de vibriose em humano é pequeno, embora esse número seja mascarado pela falta de notificações nas estatísticas oficiais. A transmissão é via ferida ou ingestão de alimento e água contaminada (AUSTIN, 2010).

O agente causador da fotobacteriose é *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (antigo *Pasteurella piscicida* e *Vibrio damsela*), uma bactéria halofílica em forma de haste que pode induzir granulomas esbranquiçados nos órgãos internos de peixes cronicamente infectados (Tabela 1) (XING et al 2013; ANDREONI e MAGNANI, 2014). É agente patogênico de uma variedade de animais marinhos, além de peixes, crustáceos, moluscos e cetáceos. Nos seres humanos pode causar infecções oportunistas que se não tratadas, evoluem para a fasciíte necrosante (bactérias devoradoras de carne) com resultado fatal (RIVAS et al., 2013).

O controle da fotobacteriose na piscicultura é realizado com antibióticos, no entanto, cepas resistentes aos medicamentos foram isoladas de beijupirás moribundos em Taiwan. As vacinas disponíveis no mercado não são viáveis no campo, e os probióticos podem ser considerados para o controle da doença. Os métodos moleculares são utilizados na identificação de *P. damsela* subsp. *piscicida* e diagnóstico da doença (KU et al 2009; ANDREONI e MAGNANI, 2014).

Tabela 1. Principais doenças bacterianas do beijupirá, *Rachycentron canadum*, cultivado.

| Doença | Agente | Sinais clínicos | Referências |
|---|---|--|--|
| Vibriose | <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. ordalii</i> | Abdômen estendido, exoftalmia, letargia, ascite na cavidade peritoneal, gastroenterite, inapetência, guelras pálidas, escurecimento e úlceras na pele, hemorragia nas barbatanas, rins e fígados pálidos, baço com tubérculos brancos. | Liu et al. (2004); Lin et al. (2006); McLean et al. (2008); Machen, (2008); Geng et al. (2011); Andrade et al. (2014); Rameshkumar et al. (2014); FAO, (2015a) |
| Fotobacteriose/ Pasteurelose/ Pseudotuberculose | <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ou <i>Pasteurella piscicida</i> | Inchaço e depósitos granulomatoso esbranquiçado nos rins, fígado e baço, ulceração da pele, infecção sistêmica bacteriana aguda, necrose multifocal e/ou inflamação granulomatosa no tecido. | Chang et al. (2006); Lin et al. (2006); Ku et al. (2008); McLean et al. (2008); Ku et al. (2009); Xing et al. (2013); Hsu et al. (2014); Ho et al. (2013); FAO (2015a); Guo et al. (2015a) |
| Estreptococose | <i>Streptococcus</i> spp., <i>S. iniae</i> | Exoftalmia, cegueira, escurecimento e úlceras na pele, dano nervoso central, exoftalmia supurativa e meningoencefalite. | Chang et al. (2006); McLean et al. (2008); Andrade et al. (2014); FAO, (2015a); Guo et al. (2015a) |
| Aeromonose/ Furunculose | <i>Aeromonas hydrophila</i> | Emagrecimento, apatia, lesões dérmicas ulcerativas, exoftalmia, granulomas no baço, fígado, rins anterior e posterior, coração, pâncreas e tecidos mesentéricos, hemorragia e septicemia. | Lowry e Smith (2006); McLean et al. (2008); Andrade et al. (2014) |
| Citrobacteriose | <i>Citrobacter</i> spp. | | Lowry e Smith (2006); McLean et al. (2008); Andrade et al. (2014) |
| Micobacteriose | <i>Mycobacterium marinum</i> | Encistamento do agente no cérebro, natação errática, granulomas nos órgãos. | Lowry e Smith (2006); McLean et al. (2008); Andrade et al. (2014) |

Pesquisas a respeito de alternativas para controle de doenças do beijupirá, quimioterapia, uso de probiótico e funcionamento da resposta imunológica do peixe ainda estão em fase inicial (LIN et al., 2006; KU et al., 2008; GENG et al. 2011; SU et al., 2012; GUO et al 2015a; FAO 2015a).

Para o sucesso na produção de qualquer espécie a ser cultivada são requisitos primordiais a elaboração de programas de biossegurança, profilaxia, diagnósticos e tratamento das doenças que atingem o animal. Boas práticas de criação e alimentação adequada são essenciais ao bem estar dos peixes e podem prevenir o desenvolvimento das enfermidades em piscicultura marinha (SCHULZE et al., 2006; RAMESHKUMAR et al., 2014).

2.3. Quimioterapia e resistência bacteriana

Quimioterapia é o tratamento de doenças que utiliza substâncias químicas, fabricadas em laboratório (drogas sintéticas) ou produzidas naturalmente por bactérias e fungos (antibióticos). A primeira droga sintética foi descoberta em 1910 pelo médico alemão Paul Ehrlich, e foi chamada *salvarsan* como salvação da sífilis. Dezoito anos depois, o médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming observou a ação antibacteriana do fungo *Penicillium chrysogenum* e chamou de *penicilina* o primeiro antibiótico, que só foi testado clinicamente e produzido em grande escala em 1940 (NIKAIDO, 2009; TORTORA et al., 2012).

As substâncias antimicrobianas podem ser bactericidas ou bacteriostáticas e o seu uso, terapêutico, profilático ou metafilático. Terapêutico é o tratamento de infecções estabelecidas, profilático, uso preventivo de antimicrobianos em indivíduo ou grupo, e metafilático, tratamento de animais doentes e medicação de outros do grupo para evitar a doença (ROMERO et al., 2012; GASTALHO et al. 2014). Dentre os diferentes modos de ação, os antibacterianos podem inibir a síntese da parede celular bacteriana, síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos, podem causar danos na membrana plasmática, interferir na atividade das enzimas e inibir a síntese de metabólitos essenciais das bactérias (NIKAIDO, 2009; ROMERO et al., 2012).

Os quimioterápicos podem apresentar um espectro restrito ou amplo espectro. Uma droga de amplo espectro pode atingir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e ser vantajosa no tratamento de uma doença causada por patógeno desconhecido, porém, se afetar parte da microbiota normal do hospedeiro, pode favorecer os patógenos oportunistas

(TORTORA et al., 2012). O uso contínuo e excessivo de antibióticos pode promover a seleção de bactérias resistentes que estão distribuídas amplamente em populações humanas e outros animais (MADIGAN et al., 2010).

Em 1950, descobriu-se no Japão que a resistência a uma ou várias drogas podia ser transferida de uma bactéria para outra, entre espécies e gêneros distintos (AZEVEDO, 2008). As bactérias resistentes a múltiplas drogas estão presentes em todo mundo, com frequências altas na China, Índia, Rússia, New York e Sibéria. Antibióticos usados nos EUA como aditivo em alimentação animal, os “promotores de crescimento”, podem chegar aos seres humanos e causar um problema de saúde pública (SNUSTAD e SIMMONS, 2008).

A resistência antimicrobiana é resultado da mutação bacteriana e aquisição de genes codificantes de enzimas inativadoras da droga ou de alteração da proteína alvo do antimicrobiano (NIKAIDO, 2009). Os genes de resistência estão em pequenas moléculas de DNA chamadas plasmídeos R que são independentes do cromossomo e auto-transmissíveis (SNUSTAD e SIMMONS, 2008). Esses plasmídeos possuem dois grupos de genes, o fator de transferência de resistência (FTR) que confere sua replicação e conjugação, e o determinante-r que possui os genes de resistência que codificam as enzimas inativadoras de drogas ou substâncias tóxicas (TORTORA et al., 2012).

Conjugação é uma transferência gênica horizontal mediada pelo plasmídeo, em que uma bactéria doadora constrói tubos proteicos (pili ou fímbrias) para passagem de DNA para bactéria receptora, no contato célula a célula. Ao incorporar o DNA, a receptora se torna recombinante. Os genes também são transferidos verticalmente, aos descendentes, ou em transferência horizontal por transformação ou transdução. Na transformação, a bactéria receptora altera a parede celular para receber grandes moléculas de DNA. Na transdução, o DNA bacteriano é transferido dentro de vírus bacteriófagos ou fagos (TORTORA et al., 2012). A propriedade conjugativa dos plasmídeos associada aos elementos transponíveis é uma ameaça séria à terapia antimicrobiana tradicional (MADIGAN et al., 2010).

Na piscicultura, quimioterápicos são utilizados de forma indiscriminada para resolver os problemas com doenças bacterianas (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). A via mais comum é misturados à ração, no entanto, os peixes não metabolizam a droga efetivamente e grande parte vai para o meio ambiente nas fezes. Estima-se que 75% dos antibióticos administrados para peixes são excretados na água (BURRIDGE et al., 2010). Além de provocar o desenvolvimento de bactérias resistentes na aquicultura, reduzindo a efetividade do tratamento, os quimioterápicos podem causar efeitos colaterais nos peixes cultivados (FORTT et al., 2007; ROMERO et al., 2012).

Na Grã-Bretanha é proibido o uso de antibióticos, principalmente em rações, já que bactérias com plasmídeo R são frequentemente isoladas em peixes (AZEVEDO, 2008). Em criatórios aquícolas chineses foram observadas bactérias multirresistentes, transferência de resistência entre bactérias intestinais e ambientais, e aquisição de genes de resistência por patógenos oportunistas (GAO et al., 2012). Os genes de resistência são encontrados em agentes patogênicos de peixe como *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia ruckeri*, *Photobacterium damsela* e *Vibrio anguillarum* (DEFOIRDT et al., 2011; ROMERO et al., 2012).

A ação nociva dos antibióticos à saúde dos peixes é pouco estudada. Há relatos de insuficiência renal aguda causada pelo antibiótico nefrotóxico gentamicina em peixe zebra (HENTSCHEL et al., 2005), alterações no sistema imunológico ocasionada por oxitetraciclina, florfenicol, ácido oxolínico e a combinação de trimetoprim com sulfadiazina em truta arco-íris (ROMERO et al., 2012), perturbações bioquímicas induzidas pelo macrolídeo roxitromicina em *Carassius auratus* (LIU et al., 2013), e estresse oxidativo com danos no fígado de carpa comum causados pelo antibiótico metronidazol (HAN et al., 2013).

O antibiótico utilizado de forma indevida pode chegar também aos animais selvagens em torno das áreas aquícolas, contaminar o ambiente e afetar trabalhadores e consumidores desses animais (FORTT et al., 2007; ROMERO et al., 2012). Em ambientes de cultivo no Vietnã, a poluição causada pelos resíduos de antibióticos foi quantificada e detectaram sulfonamidas, além de altas frequências de bactérias resistentes a sulfametoxazol nos gêneros *Acinetobacter* spp. e *Aeromonas* spp. As bactérias resistentes foram encontradas em ambientes poluídos e não poluídos, relacionadas com a condição chuvosa e transferência gênica horizontal dentro de uma diversa comunidade microbiana (HOA et al., 2011).

A saúde de piscicultores desprotegidos pode ser afetada pelas grandes quantidades de antibióticos utilizados no processo de medicação e alimentação dos peixes. O antibiótico pode entrar em contato com pele, sistema digestivo, vias aéreas e causar alergia, toxicidade, câncer e resistência da microbiota natural do indivíduo (CABELLO, 2006). Shin e Cho (2013) quantificaram e compararam *Escherichia coli* resistentes a antibióticos isoladas de amostras fecais de aquicultores com um grupo controle de trabalhadores de restaurantes. Observaram que *E. coli* de piscicultores foram mais resistentes que as do grupo controle, especialmente à cefalotina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima.

A seleção de um antibiótico para piscicultura deve ser realizada com bastante cautela e levar em consideração a espécie de peixe, a resistência do patógeno aos antimicrobianos, as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga, distribuição tecidual e órgãos

alvo do patógeno. Diferentes antibióticos são utilizados nos diversos países e as drogas são aprovadas pelo órgão governamental responsável na área de medicina veterinária. Nos EUA, por exemplo, o responsável é o FDA (Food Drug Administration) (BURRIDGE et al., 2010; ROMERO et al., 2012; GASTALHO et al. 2014) e na Europa, o CVMP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use) (FIGUEIREDO et al., 2008).

No Brasil, a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP) do Governo Federal criou, em 2007, um comitê consultivo para apoiar o processo de regulamentação de antibióticos e estimulantes na aquicultura. Atualmente, os antibióticos registrados no Compêndio de Produtos Veterinários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são à base de florfenicol e oxitetraciclina para tratamentos terapêuticos em casos de doenças bacterianas em aquicultura (Tabela 2) (SINDAN, 2015).

O florfenicol é um bacteriostático sintético derivado de aminoácidos, de amplo espectro, pertencente ao grupo dos Anfenicóis. A droga liga-se à subunidade ribossomal 50S da célula bacteriana e impede a ação da enzima peptidil-transferase presente no ribossomo, responsável pelas ligações peptídicas entre os aminoácidos na síntese proteica. Sua farmacocinética já foi bem estudada em truta arco-íris e salmão do Atlântico. Apresenta boa estabilidade na água, rápida absorção pelo intestino dos peixes, excelente distribuição tecidual e resistência térmica. Pode ser incluído na ração e submetido aos processos térmicos de extrusão e secagem, sem degradação significativa da molécula (FIGUEIREDO et al., 2007; AQUAFLO, 2010; TAVARES et al., 2014; SINDAN, 2015).

A oxitetraciclina também é bacteriostática e de amplo espectro, porém é produzida pelo actinomiceto *Streptomyces rimosus*, e pertence ao grupo das tetraciclina. Sua ação é ligar-se à subunidade 30S, impedindo a ligação da enzima aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo e consequentemente a síntese proteica. Um grande número de isolados de peixes marinhos possui gene de resistência a essa droga, principalmente as do grupo aeromonas. O antibiótico possui capacidade reduzida de transpor a barreira hematoencefálica, não sendo tão eficaz contra *Streptococcus iniae*. Não apresenta boa solubilidade em solução fisiológica, sendo diluído em soluções levemente ácidas, e não há informações seguras de resistência a processos térmicos (FIGUEIREDO et al., 2008; FARIA et al., 2014; TAVARES et al., 2014; SINDAN, 2015).

A eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina foi testada em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, infectado por *Aeromonas hydrophila*. O florfenicol foi eficaz na concentração de 10,0 mg.kg⁻¹ com 100% de sobrevivência dos peixes tratados e a oxitetraciclina não foi eficaz em concentrações de até 170,0 mg.kg⁻¹ de ração. Os autores atri-

Tabela 2. Quimioterápicos registrados no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso em aquicultura no Brasil.

| Produto/ Empresa | Princípio ativo | Indicação | Dosagem/ Administração | Precauções | Carência |
|---|--------------------|---|--|--|---|
| Aquaflor* 50% Premix / Merck Sharp & Dohme Saúde Animal Ltda | Florfenicol | Para espécies de tilápias e seus híbridos com septicemias hemorrágicas causadas por aeromonas móveis e/ou estreptococose (<i>S. agalactiae</i>), e truta arco-íris com doença da boca vermelha (<i>Yersinia ruckeri</i>) | 10 mg de florfenicol por kg de peixe incorporado por recobrimento superficial ou como ingrediente da ração antes dos processos de extrusão e peletização administrada durante 10 dias consecutivos | Não utilizar para peixes em reprodução. Após incorporá-lo à ração administrar em no máximo 4 semanas | 14 dias após o último tratamento para espécies de tilápias e seus híbridos. Truta arco-íris - período de carência segue a fórmula: $135 \div T \text{ } ^\circ\text{C}$ da água |
| Ff-50 (Florfenicol 50% Pó Oral) Farmacologia Em Aquicultura Veterinária Ltda | Florfenicol | Doenças causadas por bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas em truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) e Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) | Truta: 20 mg de FF-50@ por kg de peixe por dia; Tilápia: 40 mg de FF-50@ por Kg de peixe por dia; Incorporado na ração durante 10 dias consecutivos | Após incorporá-lo à ração, utilizar dentro de 6 meses | Carência de 10 dias no organismo do peixe e de 05 dias na água |
| Tm-700 Phibro Saúde Animal Internacional Ltda | Oxitetraciclina | Crustáceos, Lagostas: Infecções por <i>Aerococcus viridans</i> ; Salmonídeos: Doença ulcerosa (<i>Haemophilus piscium</i>), furunculose (<i>Aeromonas salmonicida</i>), septicemia hemorrágica (<i>A. liquefaciens</i>) e doença por pseudomonas. | Crustáceos, Lagostas: 3,220 kg de TM-700/t de alimento via ração durante 7 a 14 dias. Salmonídeos e Bagre: 11,85 g de TM-700 / kg de peso vivo/dia Via ração durante 10 dias | A ração com TM-700 deverá ser administrada como único alimento durante o período de tratamento | Crustáceos, lagostas: Abate - 30 dias. Salmonídeos: Abate - 21 dias. Bagres: Abate - 21 dias |

Fonte: (SINDAN, 2015)

buíram a ineficácia dessa última droga nas concentrações 100, 140 e 170 mg.kg⁻¹ ao baixo consumo e sobra de ração medicada, causado pela baixa palatabilidade da droga e conseqüentemente permanência dos sinais clínicos característicos ocasionados pela aeromonas (CARRASCHIET et al., 2011).

Em beijupirá, a oxitetraciclina (0,01 mg.kg⁻¹ de peso vivo) via intramuscular foi utilizada na aclimatação de exemplares selvagens capturados no litoral Pernambucano, para análise de desempenho reprodutivo (PEREGRINO, et al., 2014) e o Aquaflor 50 Premix (20 mg por kg de peixe ao dia), incorporado a ração, foi utilizado como profilaxia no período de aclimatação de alevinos no Ceará, porém foi relatado que o antibiótico não interferiu na sanidade dos animais (NUNES et al. 2014b).

É relevante mencionar que uma indústria de criação de animais que utiliza antibióticos em excesso e outros produtos químicos para controlar doenças bacterianas é uma indústria em crise permanente. Essa necessidade, em geral, é resultado das deficiências nos métodos de criação e condições de higiene que favorecem o estresse dos animais, infecções oportunistas e a sua disseminação. O bem-estar dos peixes cultivados deve ser levado em consideração e o correto seria eliminar ou limitar o uso não terapêutico de antibióticos (BURRIDGE et al., 2010; DEFOIRDT et al., 2011; ROMERO et al., 2012; GASTALHO et al. 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que abordagens preventivas para controlar doenças seja preferência no lugar de dispendiosos tratamentos pós-infecções. Há uma crescente pressão política e ambiental para diminuir o uso de antibióticos e outros produtos químicos na aquicultura, estimulando alternativas sustentáveis. A utilização de vacinas e bactérias antagonistas que controlam agentes patogênicos por exclusão competitiva tem sido bem sucedida na prevenção de surtos de doenças na aquicultura (SCHULZE et al., 2006).

2.4. Alternativas ao uso de antibióticos na piscicultura

Alternativas aos antibióticos que previnam infecções bacterianas e/ou as tratem em peixes são urgentemente necessárias e alvo cada vez mais rotineiro de pesquisadores. Os estudos abordam de forma integrada o patógeno, hospedeiro e ambiente na busca de métodos eficazes, sustentáveis e de longo prazo (PRIDGEON e KLESIUS, 2012).

Durante cerca de 30 anos, vacinas para peixes são utilizadas no controle eficaz de doenças bacterianas e provocam uma queda significativa no uso de antibióticos na

piscicultura, sobretudo na indústria de salmão. Vacina comercial para pelo menos 18 infecções bacterianas foram desenvolvidas e utilizá-las beneficia principalmente o consumidor final que não é atingido por resíduos químicos e bactérias resistentes. No entanto, esses profiláticos são geralmente licenciados para espécies específicas de peixes e, portanto não podem ser usados para proteger outras espécies, mesmo que o patógeno seja o mesmo (PRIDGEON e KLESIUS, 2012).

Na fabricação de uma vacina geralmente utiliza-se bacterinas, que são bactérias mortas ou atenuadas administradas para aumentar a imunidade do indivíduo às mesmas espécies bacterianas (PRIDGEON e KLESIUS, 2012). Os peixes podem ser imunizados via injeção, intraperitoneal, por imersão ou pela administração oral. Apesar das vacinas injetáveis provocarem respostas rápidas e duradouras, na prática, os métodos não injetáveis são mais viáveis na aquicultura. Por imersão, a imunização atinge milhares de peixes num curto período de tempo e as vacinas orais pela fácil administração, também se tornaram alternativa usual (FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

Estudos de formulação de vacinas para beijupirá são essencialmente voltados na prevenção de vibrioses e fotobacterioses. A combinação de três bacterinas de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *P. damsela* subsp. *piscicida* inativados foi utilizada para o peixe e induziu anticorpos específicos, aumentou a sobrevivência, e preveniu doença após desafio em laboratório e fazenda de cultivo (LIN et al., 2006). Em outro experimento, o efeito da bacterina viva atenuada de *P. damsela* subsp. *piscicida* foi avaliada no mesmo peixe e produziu menor mortalidade em laboratório e apesar de não apresentar efeitos conclusivos em campo, os beijupirás se mantiveram resistentes a fotobacteriose durante cultivo em gaiolas (KU et al., 2008).

A vacina comercial contra *V. anguillarum* e *V. ordalii* foi utilizada para avaliar a resposta imunológica de beijupirá e provocou aumento nos níveis de anticorpos do peixe ao longo do experimento (MACHEN, 2008). Guo et al. (2011) combinaram bactérias inativadas de *P. damsela* subsp. *piscicida* com produtos extracelulares e adjuvantes e obteve êxito na resposta de anticorpos e prevenção do patógeno. Guo et al. (2015b) administraram células de *P. damsela* subsp. *piscicida* inativadas via intraperitoneal em beijupirá, e observou atraso no desenvolvimento da fotobacteriose, menor mortalidade e comprovação de proteção de longa duração contra a doença.

A vacinologia em peixes no Brasil ainda é uma área recente, tanto no campo científico como para a indústria aquícola (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Em 2011, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em

parceria com Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) autorizaram o registro da primeira vacina em peixes para uso comercial no Brasil. A vacina contra infecção por *Streptococcus agalactiae* é destinada à Tilápia do Nilo. Segundo o Departamento de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura do MPA, a vacina representou um avanço na sanidade aquícola no controle da importante ameaça à tilapicultura (MPA, 2015).

Plantas medicinais com potentes propriedades antimicrobianas podem ser usadas com segurança na aquicultura no tratamento de doenças bacterianas. Além de eficazes, atenuam efeitos colaterais associados aos antimicrobianos sintéticos. Algumas espécies de plantas como *Anchusa strigosa*, *Hammada scoparia*, *Achillea fragrantissima*, *Pulicaria crispa*, *Loranthus acaciae*, *Ochradenus baccatus*, *Reseda stenostachya* (ABUTBUL et al., 2005), *Azadirachta indica*, *Nuphar lutea*, *Nymphaea alba*, *Stachys annua*, *Genista lydia*, *Vinca minor*, *Fragaria vesca*, *Filipendula ulmaria*, *Helichrysum plicatum*, *Datura metel*, *Lanata câmara*, *Solanum torvum*, *Curcuma longa*, *Cinnmommum verum*, *Eupatorium odoratum* (PANDEY et al., 2012), *Eclipta alba*, *Lonicera japonica* (SHANKAR MURTHY e KIRAN, 2013) *Aloe barbadensis*, *Withania somnifera* e *Momordica charanti* já foram testadas contra patógenos de peixes com resultados satisfatórios (PANNU et al., 2014).

Os extratos das plantas *A. indica*, *A. barbadensis*, *W. somnifera* e *M. charantia* foram testados *in vitro*, individualmente ou em combinação com *Lactobacillus sporogenes*, contra *A. hydrophila*, *Cellobiococcus* spp., *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Streptobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *P. fluorescens* e *S. aureus*. Os patógenos eram resistentes aos antibióticos nitrofurantoína, amoxicilina, bacitracina, cefalotina, eritromicina, novobiocina, vancomicina, ampicilina, oxacilina e colistina, mas foram inibidos pelos extratos, com destaque para *W. somnifera* com os melhores resultados frente a *E. aerogenes* (PANNU et al., 2014).

Plantas ou extrato de ervas são facilmente biodegradáveis, baratos, de fácil preparação e os metabólitos como taninos, alcalóides e flavonóides são os responsáveis por inibirem os patógenos (PANNU et al., 2014). O uso de alho em aquicultura pode promover o crescimento, estimular o apetite, melhorar o sistema imunitário, atuar como antiestresse, e agir como agente profilático e terapêutico no controle de doenças bacterianas. Guo et al. (2015a) analisaram a atividade antibacteriana *in vitro* do *Allium sativum* e seu efeito adicionado à ração na resistência de doenças causadas por *P. damsela* subsp. *piscicida* e *S. iniae* em beijupirá e observaram maior ganho de peso e menor mortalidade dos peixes frente aos dois patógenos.

Partindo do pressuposto que a maioria dos micro-organismos associados ao peixe não é patogênica, em alguns casos benéfica e outros casos essencial (MADIGAN et al., 2010), o uso de micro-organismos inócuos também aparece como alternativa sustentável na substituição do antibiótico na aquicultura (ROMERO et al., 2012). Os probióticos, do termo latino “pro” (para) e do grego “bios” (vida) são organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (REID et al., 2003).

Para aquicultura a definição modificada por Verschuere et al. (2000) permite uma aplicação mais adequada do termo probiótico, pois leva em consideração características específicas dos organismos aquáticos. Segundo esse autor “Probiótico é um complemento microbiano vivo que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, alterando a comunidade microbiana associada ao intestino do animal e ao ambiente, que garante uma melhor utilização do alimento e do seu valor nutricional, além de melhorar a resposta do hospedeiro a doenças e a qualidade do ambiente em que ele vive”.

É importante ressaltar que os probióticos não podem ser patogênicos para o hospedeiro, outros organismos aquáticos ou consumidores humanos, e devem estar livres de genes de resistência a antibióticos, sendo necessária garantia de segurança alimentar e ambiental. A maior parte dos estudos sobre probióticos é composto de relatórios da aplicação de uma única espécie bacteriana. É preciso levar em consideração que as condições do meio estão em constante mudança e influenciam as linhagens (VERSCHUERE et al., 2000; CHAPMAN et al., 2011).

Os mecanismos de ação dos probióticos na aquicultura foram extensivamente revisados (BALCÁZAR et al., 2006; GÓMEZ et al., 2007; KESARCODI-WATSON et al., 2008; NAYAK, 2010; PRADO et al., 2010). A ação antagonista das bactérias probióticas frente aos patógenos pode ser pela produção de compostos antimicrobianos; pela competição por nutrientes ou pelos mesmos sítios de adesão; por alteração do metabolismo do patógeno, influenciando a atividade enzimática; ou pela modulação da resposta imune do hospedeiro, aumentando níveis de anticorpos e atividade de macrófago (CALLAWAY et al., 2008; NAYAK, 2010).

Os compostos inibitórios produzidos pelas bactérias benéficas são proteínas chamadas bacteriocinas que inibem ou matam outras espécies de bactérias estreitamente relacionadas ou não. Seu espectro de ação é mais restrito do que antibióticos e os genes que as codificam são encontrados em um plasmídeo ou transposon. A colicina é um exemplo de bacteriocina capaz de formar canais na membrana celular para extravasamento de íons potássio e prótons, vitais a célula afetada. Outro grupo de colicinas são as E2 (endonuclease) e E3 (ribonuclease), essa

última inativa os ribossomos ao clivar sítios específicos no rRNA 16S. A nisina A é uma bacteriocina produzida por bactérias lácticas com valor comercial, utilizada para preservar alimentos (MADIGAN et al., 2010).

O probiótico é favorável ao hospedeiro principalmente quando o ambiente aquícola é afetado por algum estresse, como temperatura, teor de oxigênio dissolvido, pH inadequado, níveis elevados de íon-amônia ou elevada turbidez (FERREIRA et al., 2012). As bactérias probióticas são administradas adicionadas à ração e podem reduzir ou eliminar a incidência de micro-organismos patogênicos no intestino, o que é extremamente importante para o sistema imunológico da mucosa intestinal, para o aumento da absorção dos nutrientes, e desta forma, para melhoria do desempenho do animal (BALCÁZAR et al., 2006).

O número crescente de pesquisas (Tabela 3) a respeito de probióticos na piscicultura mostra o interesse em compreender sua função, eficácia e os riscos do seu uso como alternativa profilática na aquicultura. Algumas espécies probióticas já são utilizadas com sucesso para controlar infecções bacterianas em instalações de aquicultura, porém, estudos devem ser realizados para avaliar os mecanismos de ação e interações probiótico-hospedeiro, probiótico-patógeno, além do impacto sobre o meio ambiente e a microbiota natural (DEFOIRDT et al., 2011; ROMERO et al., 2012).

Além das alternativas aos antibióticos supracitadas, há muito que se aprofundar em relação ao uso de compostos antimicrobianos de alta especificidade aos agentes na piscicultura. A fagoterapia (uso de bacteriófagos), os ácidos graxos de cadeia curta, polihidroxialcanoatos inibidores de crescimento, e compostos inibitórios da expressão de genes de virulência ou das vias de transdução de sinal dos patógenos (quorum sensing) podem ser considerados no controle de doenças em peixe (DEFOIRDT et al., 2007; PRIDGEON e KLESIOUS, 2012; NGUYEN, 2014).

É importante ressaltar que os técnicos e piscicultores devem sempre centrar as ações sanitárias no sentido de prevenir doenças na piscicultura. Em um sistema aquícola que apresente um bom manejo nutricional e sanitário não será necessária utilização de qualquer tipo de terapia (FERREIRA et al., 2012). Na busca de prevenir os principais patógenos são necessários estudos envolvendo as suas características, a biologia dos hospedeiros, os fatores ambientais que afetam o cultivo e o conhecimento da microbiota associada.

Tabela 3. Bactérias probióticas testadas *in vivo* para uso na piscicultura.

| Probiótico | Efeito | Espécie | Referência |
|---|--|--------------------------------|---|
| <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> | Eficiência alimentar e crescimento | <i>Salmo caspius</i> | Krimzadeh et al. (2014) |
| <i>B. licheniformis</i> e <i>B. pumilus</i> | Resposta imunológica e proteção à <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Labeo rohita</i> | Ramesh et al. (2015) |
| <i>B. pumilus</i> e <i>B. clausii</i> | Crescimento e resposta imunológica | <i>Epinephelus coioides</i> | Sun et al. (2010) |
| <i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Arthrobacter</i> spp. | Crescimento e sobrevivência de peixes infectados por <i>A. hydrophila</i> | <i>Labeo rohita</i> | Saini et al. (2014) |
| <i>B. subtilis</i> | Crescimento, imunidade inespecífica e proteção contra <i>Vibrio harveyi</i> | <i>Rachycentron canadum</i> | Geng et al. (2011) |
| | Aliviou lesões de peixes infectados por <i>Flavobacterium columnare</i> | <i>Oreochromis niloticus</i> | Mohamed e Refat (2011) |
| | Ganho de peso, eficiência alimentar, sobrevivência, imunidade e resistência à <i>Streptococcus</i> sp. | <i>Epinephelus coioides</i> | Liu et al. (2012) |
| | Melhores parâmetros da imunidade inata | <i>Sparus aurata</i> | Cerezuela et al. (2012) |
| | Crescimento, resposta imune e resistência à <i>S. iniae</i> | <i>Paralichthys olivaceus</i> | Cha et al. (2013) |
| | Ganho de peso, eficiência alimentar, resposta imune inata e proliferação de bactérias benéficas | <i>Epinephelus coioides</i> | Purwandari e Chen (2013) |
| <i>B. subtilis</i> | Ação imunoestimulante | <i>Centropomus undecimalis</i> | Noffs et al. (2015) |
| | Resposta imunológica e saúde do peixe | <i>Catla catla</i> | Sangma e Kamilya (2015) |
| <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> e <i>B. licheniformis</i> | Impacto imunoestimulante e maior resistência ao estresse salino | <i>Rachycentron canadum</i> | Garrido-Pereira et al. (2014) |
| <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> e <i>Lactobacillus reuteri</i> | Promoção do crescimento e atividade de proteção antioxidante | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Giannenas et al. (2015) |
| <i>B. subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> | Resposta imune e proteção contra <i>A. hydrophila</i> | <i>Labeo rohita</i> | Giri et al. (2015) |
| <i>Enterobacter</i> spp. e <i>E. amnigenus</i> | Sobrevivência de peixes infectados por <i>F. psychrophilum</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Burbank et al. (2011) |
| <i>Kocuria</i> spp. | Resposta imune e sobrevivência à <i>V. anguillarum</i> e <i>V. ordalii</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Sharifuzzaman e Austin (2010a); (2010b) |
| <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>lactis</i> e <i>B. subtilis</i> | Estimuladores locais e sistêmicos sobre o sistema imunológico | <i>Sparus aurata</i> | Salinas et al. (2008) |

Cont. tab. 3.

| Probiótico | Efeito | Espécie | Referência |
|--|--|-------------------------------|----------------------------------|
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | Crescimento, resposta imunológica e resistência à <i>Edwardsiella tarda</i> | <i>Anguilla japonica</i> | Lee et al. (2013) |
| | Crescimento, imunidade e resistência à <i>A. hydrophila</i> | <i>Labeo rohita</i> | Giri et al. (2013) |
| | Crescimento, resposta imune e resistência à <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Oreochromis niloticus</i> | Abumourad et al. (2013) |
| <i>L. plantarum</i> | Imunoestimulante e biocontrole natural contra <i>A. hydrophila</i> | Híbrido <i>Clarias sp.</i> | Butprom et al. (2013) |
| | Crescimento, eficiência alimentar, imunestimulante e proteção contra <i>Aeromonas</i> spp. | <i>Cyprinus carpio</i> | Dhotre e Shembekar (2015) |
| | Crescimento e resposta imune inata | <i>Acipenser baerii</i> | Pourgholam et al. (2015) |
| <i>L. plantarum</i> e <i>B. megaterium</i> | Crescimento e resistência à <i>A. hydrophila</i> | <i>Catla catla</i> | Parthasarathy e Ravi (2011) |
| <i>L. plantarum</i> e <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulguricus</i> | Parâmetros imunológicos e sobrevivência à <i>A. hydrophila</i> | <i>Barbus grypus</i> | Mohammadian et al. (2015) |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Melhor estrutura intestinal e imunidade da mucosa | <i>Oreochromis niloticus</i> | Pirarat et al. (2011) |
| <i>Lactobacillus sakei</i> | Sobrevivência, parâmetros hematológicos e imunidade frente à <i>E. tarda</i> | <i>Oplegnathus fasciatus</i> | Harikrishnan et al. (2011) |
| | Peso e resposta imunológica frente à <i>A. veronii</i> | <i>Lutjanus peru</i> | Reyes-Becerril et al. (2012) |
| <i>Lactococcus lactis</i> e <i>L. plantarum</i> | Útil aditivo imunoestimulantes contra <i>S. iniae</i> | <i>Paralichthys olivaceus</i> | Beck et al. (2015) |
| <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> | Crescimento e resposta imune | <i>Acipenser baerii</i> | Geraylou et al. (2013) |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | Crescimento, eficiência alimentar, resposta imune e proteção contra <i>A. hydrophila</i> e <i>V. harveyi</i> | <i>Cyprinus carpio</i> | Gupta et al. (2014) |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | Crescimento, sobrevivência e proteção contra <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> | <i>Rachycentron canadum</i> | Xing et al. (2013) |
| | Crescimento e condições de saúde | <i>Pagrus major</i> | Dawood et al. (2015) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Resposta imune inata e resistência à <i>A. hydrophila</i> | <i>Labeo rohita</i> | Giri et al. (2012) |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | Efeito imunoestimulante, menor mortalidade e resistência contra <i>Flavobacterium psychrophilum</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Korkea-aho et al. (2011); (2012) |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | Crescimento e proteção contra <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> | <i>Solea senegalensis</i> | De la Banda et al. (2012) |
| | Melhor taxa de crescimento e estado nutricional | | Lobo et al. (2014) |
| <i>Vagococcus fluvialis</i> | Sobrevivência de peixes infectados por <i>V. anguillarum</i> | <i>Dicentrarchus labrax</i> | Sorroza et al. (2012) |
| <i>Virgibacillus proomii</i> e <i>Bacillus mojavenis</i> | Melhor taxa de crescimento, sobrevivência e saúde do microambiente intestinal do hospedeiro | <i>Dicentrarchus labrax</i> | Hamza et al. (2015) |
| <i>Zooshikella</i> ssp. | Melhor resposta imune inata e resistência à <i>S. iniae</i> | <i>Paralichthys olivaceus</i> | Kim et al. (2010) |

3. REFERÊNCIAS

- ABUMOURAD, I. M. K.; ABBAS, W. T.; AWAAD, E. S.; AUTHMAN, M. M. N.; EL-SHAFAI, K.; SHARAF, O. M.; IBRAHIM, G. A.; SADEK, Z. I.; EL-SAYED, H. S. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: Emphasis on growth performance and innate immunity. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 1, p. 572-582, 2013.
- ABUTBUL, S.; GOLAN, G. A.; BARAZANI, O.; OFIR, R.; ZILBERG, D. Screening of desert plants for use against bacterial pathogens in fish. **The Israeli journal of aquaculture Bamidgeh**, v. 57, n. 2, p. 71-80, 2005.
- ANDRADE, T. P.; ARAÚJO, P. F. R.; HOLANDA, M. B. C.; COELHO, M. G. L.; RIBEIRO, F. A. S.; NUNES, A. J. P. Estabelecimento de procedimentos de diagnóstico padrão e principais enfermidades em juvenis do beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). In: NUNES, A. J. P. (Org.) **Ensaio com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*: Nutrição, Sanidade e Valor do Beijupirá, *Rachycentron canadum*, Cultivado no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: MPA/CNPq/UFC, v. 1, p. 135-154, 2014.
- ANDREONI, F.; MAGNANI, M. Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 6p. 2004.
- AQUAFLO. Florfenicol. **Technical Monograph for catfish health professionals**. Schering-Plough Animal Health, 2010, 32p. Disponível em: <http://www.aquaflor-usa.com/pdfs/Catfish_Brochure.pdf>. Acessado em: dez. 2015.
- ARENDE, M. D.; OLNEY, J. E.; LUCY, J. A. Stomach content analysis of cobia, *Rachycentron canadum*, from lower Chesapeake Bay. **Fishery Bulletin**, v. 99, n. 4, p.665-670, 2001.
- ARNOLD, C. R.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Spawning of cobia *Rachycentron canadum* in captivity. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 2, p. 205–208, 2002.
- AUSTIN, B. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. **The Scientific World Journal**, v. 6, p. 931–945, 2006.
- AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.310–317, 2010.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. 2 ed. Goiana. Goiás. Brasil: Editora UFG, 2008, 536p.
- AZEVEDO, T. A. **Colonização da Ictiofauna nos arredores de gaiolas de cultivo de beijupirá (*Rachycentron canadum*) no litoral de Pernambuco**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 14, p. 173–186, 2006.

- BARROS, C. N. **Bactérias com potencial probiótico isoladas do intestino do beijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766)**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- BATES, J. M.; MITTGE, E.; KUHLMAN, J.; BADEN, K. N.; CHEESMAN, S. E.; GUILLEMIN, K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. **Developmental Biology**, v.297, p. 374–386, 2006.
- BECK, B. R.; KIM, D.; JEON, J.; LEE, S. M.; KIM, H. K.; KIM, O. J.; LEE, J. I.; SUH, B. S.; DO, H. K.; LEE, K. H.; HOLZAPFEL, W. H.; HWANG, J. Y.; KWON, M. G.; SONG, S. K. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, p. 177-183, 2015.
- BENETTI, D. D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J. A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUN, M. R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**, v. 302, p. 195–201, 2010.
- BIRKBECK, T. H.; RINGO, E. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.), **Microbial Ecology in Growing Animals**. Elsevier, Edinburgh, p. 208–234, 2005.
- BURBANK, D. R.; SHAH, D. H.; LAPATRA, S. E.; FORNSHELL, G.; CAIN, K. D. Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 321, p. 185–190, 2011.
- BURRIDGE, L.; WEIS, S. W.; CABELLO, F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, p. 7-23 4, 2010.
- BUTPROM, S.; PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. Effect of *Lactobacillus plantarum* C014 on Innate Immune Response and Disease Resistance against *Aeromonas hydrophila* in Hybrid Catfish. **The ScientificWorld Journal**, v. 2013, 6 p., 2013.
- 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.
- CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; HARVEY, R. B.; GENOVESE, K. J.; KENNEDY, C. N.; VENN, D. W.; NISBET, D. J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217–225, 2008.
- CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G.; CASTRO, M. P.; BORTOLUZZI, N. L.; GÍRIO, A. C. F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 3, p. 579-583, 2011.

CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 151-164, 2011.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do bijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 64-69, 2009.

CEREZUELA, R.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. Effects of dietary inulin and heat-inactivated *Bacillus subtilis* on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. **Beneficial Microbe**, v. 3, n. 1, p.77-81, 2012.

CHA, J. H; RAHIMNEJAD, S.; YANG, S. Y.; KIM, K. W.; LEE K. J. Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture*, v. 402–403, p. 50–57, 2013.

CHANG, C. F.; YANG, J. H.; CHANG, S. L. Application of dietary β -1, 3-1, 6-glucan in enhancing resistance of cobia (*Rachycentron canadum*) against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* infections. **Journal of Taiwan Fisheries Research**, v. 14, p. 75–87, 2006.

CHANG, D. O cultivo do bijupirá em Taiwan: a escolha de um peixe de carne branca para consumidores exigentes. **Panorama da Aquicultura**, v. 13, n. 79, p. 43- 49, 2003.

CHAPMAN, C. M. C.; GIBSON, G. R.; ROWLAND, I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? **European journal of nutrition**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2011. (Abstract)

CHUANG, J. L; LIN, R. T.; SHIAU, C. Y. Comparison of meat quality related chemical compositions of wild-captured and cage-cultured cobia. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 580-586, 2010.

CORIOLOANO, M. C.; COELHO, L. C. B. B. Cobia (*Rachycentron Canadum*): A Marine Fish Native to Brazil with Biological Characteristics to Captive Environment. In: Daniels, J.A. (Org.). **Advances in Environmental Research**. New York: Nova Publishers, v. 26, p. 1-15, 2012.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S. Effects of dietary inactivated *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, feed utilization and blood characteristics of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. **Aquaculture Nutrition**, 2015. doi: 10.1111/anu.12314.

DE LA BANDA, I. G.; LOBO, C.; CHABRILLÓN, M.; LEÓN-RUBIO, J. M.; ARIJO, S.; PAZOS, G.; LUCAS, L. M.; MORIÑIGO, M. Á. Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 5, p. 662–669, 2012.

DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 251-258, 2011.

DHOTRE, M.A.; SHEMBEKAR, V.S. Investigation of Probiotic Bacterium Pb2 (*Lactobacillus plantarum*) in the Formulated Diet on Growth Performance, Nutrition Quality and Disease Resistant in Common Carp *Cyprinus Carpio*. **Bionano Frontier**, v. 8, n. 2, 2015.

FAO. **Cultured Aquatic Species Information Programme – *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766)**. Disponível em: <www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rachycentroncanadum/en> Acesso em: dez. 2015a.

FAO. **FISHSTAT PLUS: Universal software for fishery statistical time series**. Version 2.12.4, Fisheries Department Fishery Information, Data and Statistics Unit, FAO, Rome, Italy. 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>. Acesso em: dez. 2015b.

FARIA, F. C.; LEAL, C. A. G.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**. v. 37, n. 9, p. 853–857, 2014.

FERREIRA, A. H. C.; ARARIPE, M. N. B. A.; MONTEIRO, C. A. B.; LOPES, J. B.; ARARIPE, H. G. A. Uso de Probióticos na Aquicultura – Revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**, art. 176, v. 9, n. 5, p. 1965–1980, 2012.

FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G. Antibióticos na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, n. 105, p. 42-49, 2008.

FIGUEIREDO, H. C. P.; GODOY, D. T.; MIAN, G. F.; LEAL, C. A. G. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 2. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 104, p. 42-45, 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 08-14, 2008.

FORTT, Z. A.; CABELLO, F. C.; BUSCHMANN, R. A. Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 24, n. 1, p. 14-18, 2007.

FREIRE, K. M.; CARVALHO-FILHO, A. Richness of common names of Brazilian reef fishes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 96–145, 2009.

GAO, P.; MAO, D; LUO, Y.; WANG, L.; XU, B.; XU, L. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. **Water research**, v. 46, p. 2355-2364, 2012.

GARRIDO-PEREIRA, M. A.; SCHWARZ, M.; DELBOS, B.; RODRIGUES, R. V.; ROMANO, L.; SAMPAIO, L. Probiotic effects on cobia *Rachycentron canadum* larvae reared in a recirculating aquaculture system. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 5, p. 1169-1174, 2014.

- GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública, **Acta Farmacêutica Portuguesa**, vol. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.
- GENG, X.; DONG, X. H.; TAN, B. P.; YANG, Q. H.; CHI, S. Y.; LIU, H. Y.; LIU, X. Q. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 400-406, 2011.
- GERAYLOU, Z.; SOUFFREAU, C.; RURANGWA, E.; MEESTER, L. D.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A.; BUYSE, J.; OLLEVIER, F. Effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and endogenous probiotics on the growth performance, non-specific immunity and gut microbiota of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, p. 766-775, 2013.
- GIANNENAS, I.; KARAMALIGAS, I.; MARGARONI, M.; PAPPAS I.; MAYER, E.; ENCARNAÇÃO, P.; KARAGOUNI, E. Effect of dietary incorporation of a multistrain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 119-128, 2015.
- GIRI, S. S.; SEN, S. S.; CHI, C.; KIM, H. J.; YUN, S.; PARK, S. C.; SUKUMARAN, V. Effect of cellular products of potential probiotic bacteria on the immune response of *Labeo rohita* and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shell fish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 716-722, 2015.
- GIRI, S. S.; SEN, S. S.; SUKUMARAN, V. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1135-1140, 2012.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; OVIYA, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 660-666, 2013.
- GÓMEZ, G.; BALCÁZAR, J. L.; SHEN, M. A. Probiotics as Control Agents in Aquaculture. **Journal of Ocean University of China**, v. 6, n. 1, p. 76-79, 2007.
- GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. 1. ed.. São Paulo: Editora Atheneu, 2011, 607p.
- GONÇALVES, A. A.; DANTAS NETO, A. B.; GUILHERME, D. D.; Marques, M. K.; SALES, T. M. O.; LIMA, J. T. A. X.; RIBEIRO, F. A. S.; DIÓGENES, A. F. Rendimento de cortes e qualidade da carne do beijupirá, *Rachycentron canadum*, sujeito a diferentes gradientes de salinidade da água de cultivo. In: NUNES, A. J. P. (Org.) **Ensaio com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*** : Nutrição, Sanidade e Valor do Beijupirá, *Rachycentron canadum*, Cultivado no Nordeste do Brasil. Fortaleza: MPA/CNPq/UFC, 2014, p. 155-165.

- GUO, J. J.; CHEN, C. H.; YEH, C. H.; KUO, C. M.; CHEN, T. I. Preparation Method of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Vaccine for Cobia (*Rachycentron canadum*). **Journal of Taiwan Fisheries Research**, v. 19, n. 1, p. 37-44, 2011.
- GUO, J. J.; HUANG, M. Y.; HONG, J. W.; CHUANG, Y. C.; CHOU, R. L.; LEE, Y. H.; CHEN, T. I. The Efficacy of Inactivated *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* Combined with Levan/Alum as Vaccine against Photobacteriosis in Cobia, *Rachycentron canadum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 46, n. 5, p. 549–556, 2015b.
- GUO, J. J.; KUO, C. M.; HONG, J. W. ; CHOU, R. L.; LEE, Y. H.; CHEN, T. I. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in Cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 435, p. 111–115, 2015a.
- GUPTA, A.; GUPTA, P.; DHAWAN, A. Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, p. 113-119, 2014.
- HAMILTON, S.; SEVERI, W.; CAVALLI, R. O. Biologia e Aquicultura do Beijupirá: Uma Revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, n. 4, p. 461-477, 2013.
- HAMZA, A.; FDHILA, K.; ZOUTEN, D.; MASMOUDI, A. *S. Virgibacillus proomii* and *Bacillus mojavensis* as probiotics in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-13, 2015.
- HAN, J.; CAI, H.; WANG, J.; LIU, G. Detrimental effects of metronidazole on the liver of freshwater common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 444-449, 2013.
- HARIKRISHNAN, R.; KIM, M. C.; KIM, J. S.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) against *Edwardsiella tarda*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 886-893, 2011.
- HENTSCHEL, D. M.; PARK, K. M.; CILENTI, L.; ZERVOS, A. S.; DRUMMOND, I.; BONVENTRE, J. V. Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. **American journal of physiology**, v. 288, n. 5, p. 923-929, 2005.
- HO, L. P.; CHANG, C. J.; LIU, H. C.; YANG, H. L.; LIN, J. H. Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* infections in cobia, *Rachycentron canadum* L. **Journal of Fish Diseases** , 2014.
- HOA, P. T. P.; MANAGAKI, S.; NAKADA, N.; TAKADA, H.; SHIMIZU, A.; ANH, D. H.; VIET, P. H.; SUZUKI, S. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 2894–2901, 2011.

HOLT, G. J.; FAULK, C. K.; SCHWARZ, M. H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. **Aquaculture**, v. 268, p. 181–187, 2007.

HSU, P. Y.; LEE, K. K.; HU, C. C.; LIU, P. C. Purification and characterization of a phospholipase by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from cobia *Rachycentron canadum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 969-975, 2014.

KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Species Profile Cobia. **Southern Regional Aquaculture Center**, SRAC Publication, USA, n. 7202, 6 p., 2005.

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

KIM, Y. T.; CHO, M.; JEONG, J. Y.; LEE, H. B.; KIM, S. B. Application of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis to Monitor Effect of Biocontrol Agents on Rhizosphere Microbial Community of Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 566-572, 2010.

KORKEA-AHO, T. L.; HEIKKINEN, J.; THOMPSON, K. D.; von WRIGHT, A.; AUSTIN, B. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 266–277, 2011.

KORKEA-AHO, T. L.; PAPADOPOULOU, A.; HEIKKINEN, J.; von WRIGHT, A.; ADAMS, A.; AUSTIN, B.; THOMPSON, K. D. *Pseudomonas* M162 confers protection against rainbow trout fry syndrome by stimulating immunity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 24–35, 2012.

KRIMZADEH, S.; KERAMAT AMIRKOLAIE, A.; MIANDEHY, S. P. The effects of different levels of Beta Plus on growth performance, microbial flora and blood parameters of Caspian trout, *Salmo caspius* (Kessler, 1877). **International Journal of Aquatic Biology**, v. 2, n. 6, p. 292-298, 2014.

KU, C. C.; WANG, C. S.; LU, C.H. A vaccination trial using attenuated *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* in Cobia. **Journal of The Fisheries Society of Taiwan**, v. 35 p. 127-131, 2008.

KU, C. C.; WANG, C. S.; NAN, F. H., LU, C. H. In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* from Cobia (*Rachycentron canadum*) at Penghu (Pescadores) Islands, Taiwan during 1999 and 2008. **Journal of The Fisheries Society of Taiwan**, v. 36, p. 151-160, 2009.

LEE, J. S.; CHENG, H.; DAMTE, D.; LEE, S. J.; KIM, J. C.; RHEE, M. H.; SUH, J. W.; PARK, S. C. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 3, p. 756-761, 2013.

- LIAO, I. C.; HUANG, T. S.; TSAI, W. S.; HSUEH, C. M.; CHANG, S. L.; LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155-165, 2004.
- LIN, J. H. Y.; CHEN, T. Y.; CHEN, M. S.; CHEN, H. E.; CHOU, R. L.; CHEN, T. I.; SU, M. S.; YANG, H. L. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. **Aquaculture**, v. 255, p. 125–132, 2006.
- LIU, C. H.; CHIU, C. H.; WANG, S. W.; CHENG, W. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 699-706, 2012.
- LIU, J.; LU, G.; WANG, Y.; YAN, Z.; YANG, X.; DING, J.; JIANG, Z. Bioconcentration, metabolism, and biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to roxithromycin. **Chemosphere**, v. 99, p. 102-108, 2013.
- LIU, P. C.; LIN, J. Y.; CHUANG, W. H.; LEE, K. K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 495–499, 2004.
- LOBO, C.; MORENO-VENTAS, X.; TAPIA-PANIAGUA, S.; RODRÍGUEZ, C.; MORIÑIGO, M. Á.; DE LA BANDA, I. G. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in *Senegalese sole* larviculture. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 295-309, 2014.
- LOWERY, T.; SMITH, S. A. *Mycobacterium* sp. Infection in Cultured Cobia (*Rachycentron canadum*). **Bulletin European Association of Fish Pathology**, v. 26, p. 87-92, 2006.
- MACHEN, J. W. **Vibrio spp. disinfection and immunization of cobia (*Rachycentron canadum*) for the prevention of disease in aquaculture facilities**. 2008. 98p. Thesis (Master) - faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, United States.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed. 12. ed, 2010, 1160 p.
- MCLEAN, E.; SALZE, G.; CRAIG, S. R. Parasites, diseases and deformities of cobia. Ribarstvo: **Croatian Journal of Fisheries**, v. 66, n. 1, p.1-16, 2008.
- MIAO, S.; JEN, C. C.; HUANG, C. T.; HU, S.H. Ecological and economic analysis for cobia *Rachycentron canadum* commercial cage culture in Taiwan. **Aquaculture International**, v. 17, n. 2, p. 125-141, 2009.
- MOHAMED, M. H.; REFAT, N. A. G. A. Pathological Evaluation of Probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in Tilapia Nilotica (*Oreochromis Niloticus*) Fish in Sharkia Governorate, Egypt. **Journal of American Science**, v. 7, n. 2, 2011.
- MOHAMMADIAN, T.; ALISHAHI, M.; TABANDEH, M. R.; GHORBANPOOR, M.; GHARIBI, D.; TOLLABI, M.; ROHANIZADE, S. Probiotic effects of *Lactobacillus*

plantarum and *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. **Aquaculture International**, p. 1-18, 2015.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Governo autoriza registro da primeira vacina para uso comercial em peixes.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/08/governo-autoriza-registro-da-primeira-vacina-para-uso-comercial-em-peixes>>. Acesso em: jan. 2015.

NAVARRETE, P.; TOLEDO, I.; MARDONES, P.; OPAZO, R.; ESPEJO, R.; ROMERO, J. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 10, p. 667-678, 2010.

NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n. 1, p. 2-14, 2010.

NGUYEN, V. D. Development of pharmabiotics as antibiotic alternatives for seafood security and marine aquaculture health: two cases of study in Vietnam. **Khon Kaen Agriculture Journal**, v. 42, n. 4, 2014.

NHU, V. C.; NGUYEN, Q. H.; LE, T. L.; TRAN, M. T.; SORGELOOS, P.; DIERCKENS, K.; REINERTSEN, H.; KJORSVIK, E.; SVENNEVIG, N. Cobia *Rachycentron canadum* aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. **Aquaculture**, v. 315, p. 20-25, 2011.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.

NOFFS, A. P.; TACHIBANA, L.; SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Common snook fed in alternate and continuous regimens with diet supplemented with *Bacillus subtilis* probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 4, p. 267-272, 2015.

NUNES, A. J. P. **Ensaio com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*** : Nutrição, Sanidade e Valor do Beijupirá, *Rachycentron canadum*, Cultivado no Nordeste do Brasil. Fortaleza: MPA/CNPq/UFC, v. 1, 2014, 352p.

NUNES, A. J. P.; MADRID, R. M.; PINTO, R. C. C. O cultivo de peixes marinhos tropicais, com ênfase no beijupirá, *Rachycentron canadum*. In: NUNES, A. J. P. (Org.) **Ensaio com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*** : Nutrição, Sanidade e Valor do Beijupirá, *Rachycentron canadum*, Cultivado no Nordeste do Brasil. Fortaleza: MPA/CNPq/UFC, v. 1, p. 1-20, 2014a.

NUNES, A. J. P.; PINTO, R. C. C.; VIEIRA, C. C. F.; CASTRO, L.F.; SABRY NETO, H.; MARQUES, D. F.; AZEVEDO, A. A. G.; SOARES, D. C. E. ; COSME, M.; AZEVEDO, C. M. S. B.; SILVA, F. A. Transporte e aclimação em laboratório de alevinos de beijupirá, *Rachycentron canadum*. . In: NUNES, A. J. P. (Org.) **Ensaio com o Beijupirá: *Rachycentron canadum*** : Nutrição, Sanidade e Valor do Beijupirá, *Rachycentron canadum*, Cultivado no Nordeste do Brasil. Fortaleza: MPA/CNPq/UFC, v. 1, p. 49-62, 2014b.

- PANDEY, G.; SHARMA, M.; MANDLOI, A. K.; SHANI, Y. P. Antimicrobial activity of some medicinal plants against fish pathogens. **International Research Journal of pharmacy**. v. 3, n. 4, p.28-30, 2012.
- PANNU, R.; DAHIYA, S.; SABHLOK, V. P.; KUMAR, D.; SANSAR, V.; GAHLAWAT, S.K. Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 13-20, 2014.
- PARTHASARATHY, R.; RAVI, D. Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Indian Journal of Fishery**, v.58, n.3, p.87-93, 2011.
- PEREGRINO JR., R. B.; HAMILTON, S.; DOMINGUES, E. C.; MANZELLA JR., J. C.; HAZIN, F. H. V.; CAVALLI, R.O. Desempenho reprodutivo do beijupirá (*Rachycentron canadum*) capturado no litoral de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 681-687, 2014.
- PIRARAT N.; PINPIMAI, K.; ENDO, M; KATAGIRI, T.; PONPORNPIKIT, A.; CHANSUE, N.; MAITA, M. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 92–97, 2011.
- POURGHOLAM, M. A.; KHARA, H.; SAFARI, R.; SADATI, M. A. Y.; ARAMLI, M. S. Dietary Administration of *Lactobacillus plantarum* Enhanced Growth Performance and Innate Immune Response of Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 7, p. 31–37, 2015.
- PRADO, S.; ROMALDE, J. L.; BARJA, J. L. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. **Veterinary microbiology**. v. 145, p. 187-97, 2010.
- PRIDGEON, J. W.; KLESZIUS, P. H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 7, n. 48, p.1-16, 2012.
- PURWANDARI, A. R.; CHEN H. Y. Effects of Probiotic *Bacillus subtilis* on Intestinal Microbial Diversity and Immunity of Orange Spotted Grouper *Epinephelus coioides*. **Journal of Applied Biotechnology**. v. 1, n. 1, 2013.
- RAMESH, D.; VINOTHKANNA, A; RAI, A. K.; VIGNESH, V. S. Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 268-276, 2015.
- RAMESHKUMAR, P.; KALIDAS, C.; TAMILMANI, G.; SAKTHIVEL, M.; NAZAR, A.K.A.; MAHARSHI, V.A.; RAO, S.K.S.; GOPAKUMAR, G. Microbiological and histopathological investigations of *Vibrio alginolyticus* infection in cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) cultured in sea cage. **Indian Journal of Fisheries**, v. 61, n. 1, p. 124-127, 2014.

REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M. T; MCCORMICK, J. K. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 658–672, 2003.

RESLEY, M. J.; WEBB JR., K. A.; HOLT, G. J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, v. 253, p. 398–407, 2006.

REYES-BECERRIL, M.; ASCENCIO-VALLE, F.; MACIAS, M. E.; MALDONADO, M.; ROJAS, M.; ESTEBAN, M. Á. Effects of marine silages enriched with *Lactobacillus sakei* 5-4 on haemato-immunological and growth response in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Aeromonas veronii*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 984–992, 2012.

RIVAS, A. J.; LEMOS, M. L.; OSORIO, C. R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 283, 2013.

ROMERO, J.; FEIJOÓ, C. G. NAVARRETE, P. **Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives**. In: Carvalho, E.D.; David, G.S.; Silva, R. (Ed.) Health and Environment in Aquaculture. InTech, 2012, p.159-198.

SAINI, V. P.; OJHA, M. L.; GUPTA, M. C.; NAIR, P.; SHARMA, A.; LUHAR, V. Effect of Dietary Probiotic on Growth Performance and Disease Resistance in *Labeo rohita* (Ham.) Fingerlings. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 1, n. 6, p. 07-11, 2014.

SALINAS, I.; ABELLI, L.; BERTONI, F.; PICCHIETTI, S.; ROQUE, A.; FURONES, D.; CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1, p.114-123, 2008.

SAMPAIO, L. A.; MOREIRA, C. B.; MIRANDA-FILHO, K. C.; ROMBENSO, A. N. Culture of cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the Brazilian coast. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 832-834, 2011.

SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B.; WASIELESKY JÚNIOR, W. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 102-111, 2010.

SANGMA, T.; KAMILYA, D. Dietary *Bacillus subtilis* FPTB13 and chitin, single or combined, modulate systemic and cutaneous mucosal immunity and resistance of catla, *Catla catla* (Hamilton) against edwardsiellosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 8–15, 2015.

SCHULZE, A. D.; ALABI, A. O., TATTERSALL-SHELDRAKE, A.R.; MILLER, K.M. Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. **Aquaculture**, v. 256, p. 50–73, 2006.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)**. Washington D.C.: FAO Fisheries

Synopsis 153, U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service 82, 1989.

SHANKAR MURTHY, K.; KIRAN, B. R. Review On Usage Of Medicinal Plants In Fish Diseases. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 3, p. 975-986, 2013.

SHARIFUZZAMAN, S. M.; AUSTIN, B. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 2, p. 212-216, 2010a.

SHARIFUZZAMAN, S. M.; AUSTIN, B. *Kocuria* SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 2162-2170, 2010b.

SHIN, H. H.; CHO, S. H. Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Fishery Workers. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 4, n. 2, p.72-75, 2013.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal. **Compênio de Produtos Veterinários**. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>>. Acesso em: dez. 2015.

SINDERMANN, C. J. **Coastal pollution: effects on living resources and humans**. CRC Marine Science Series. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. (USA), 2006, 280p.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SORROZA, L.; PADILLA, D.; ACOSTA, F.; ROMÁN, L.; GRASSO, V.; VEGA, J.; REAL, F. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. **Veterinary Microbiology**, v.155, n. 2, p. 369-373, 2012.

SU, Y.; FENG, J.; SUN, X.; GUO, Z.; XU, L.; JIANG, J. Characterization and transcriptional analysis of a new CC chemokine associated with innate immune response in cobia (*Rachycentron canadum*). **Molecular Biology (Mosk)**, v. 47, n. 3, p.441-52, 2013.

SUN, Y. Z.; YANG, H. L.; MA, R. L.; LIN, W. Y. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n.5, p. 803-809, 2010.

TAVARES, G. C. ; LEAL, C. A. G. ; FIGUEIREDO, H. C. P. Antibioticoterapia em peixes. **Cadernos Técnicos de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 73, p. 66-78, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 934 p.

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

XING, C. F.; HU, H. H.; HUANG, J. B.; FANG, H. C.; KAI, Y. H.; WU, Y. C., CHI, S. C. Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1122-1128, 2013.

1 **4. ARTIGO CIENTÍFICO I**

2 Manuscrito para submissão ao *Brazilian Journal of Microbiology*

3

4 **Bactérias patogênicas multirresistentes a antimicrobianos isoladas do intestino de** 5 **beijupirá cultivado**

6

7 Carolina Notaro de Barros¹, Virgínia Fonseca Pedrosa², João Menezes Guimarães¹,

8 Juliana Nunes Carvalho¹, Emiko Shinozaki Mendes³

9

10 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de
11 Pernambuco, UFRPE, Recife-PE, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Aquicultura
12 da Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande-RS, Brasil; ³Professora do
13 Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, Recife-PE, Brasil.

14

15

Resumo

16 Bacterioses representam prejuízos econômicos e restrição à expansão da piscicultura
17 marinha. Objetivou-se identificar bactérias potencialmente patogênicas isoladas do
18 intestino de beijupirás cultivados, *Rachycentron canadum*, durante dois períodos do
19 ano, por testes bioquímicos e moleculares, avaliando-se o perfil de resistência frente a
20 sete antimicrobianos. Foram coletados dez alevinos e 30 juvenis, dos quais 82,5%
21 exibiram indícios de infecção bacteriana e 47,5% de nefrocalcinose. Dos 72 isolados
22 bacterianos identificados por testes bioquímicos 86,11% apresentaram concordância
23 com a classificação molecular. Foram 18 espécies, 12 gêneros e cinco famílias, sendo
24 Enterobacteriaceae a mais representativa (63,88%). As espécies mais frequentes foram a

25 *Enterobacter cloacae* (27,78%) e *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (25%),
26 maior patógeno do beijupirá. 95,83% dos isolados foram resistentes à penicilina
27 (6,25µg), 62,50% a ampicilina (10µg) e 15,28% a enrofloxacin (5 µg). 69,44% dos
28 isolados foram multirresistentes aos antibióticos e a linhagem com maior índice MAR
29 (0,8571) foi da espécie *E. cloacae*. Os resultados representam desafio à sanidade do
30 peixe cultivado, preocupação com a disseminação de resistência no meio ambiente e
31 risco à saúde dos piscicultores e população humana consumidora. O intestino do
32 beijupirá inclui bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas para animais
33 aquáticos e humanos, com elevadas taxas de multirresistência aos antimicrobianos
34 testados, e sua ocorrência independe de mudanças climáticas.

35

36 **Palavras-chave:** *Rachycentron canadum*, bijupirá, antibiograma, multirresistência
37 antimicrobiana, rRNA 16S

38

39 **Introdução**

40 O beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) é candidato em potencial
41 para piscicultura marinha. Ele pode alcançar de 4 a 6 kg no primeiro ano de cultivo,
42 possui excelente qualidade da carne, alta fecundidade, facilidade de desova e boa
43 adaptação ao ambiente de cultivo (Benetti et al., 2010). No Brasil, está presente em todo
44 o litoral e há iniciativa de instituições públicas em São Paulo, Bahia, Pernambuco, Rio
45 Grande do Norte, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará e Rio Grande do Sul, e de empresas
46 privadas para estabelecer a tecnologia de criação do peixe no país (Cavalli et al., 2011).

47 Dentre as dificuldades relatadas para cultivar o beijupirá no Brasil, encontra-se a
48 escassez de laboratórios de diagnóstico, prevenção e controle das enfermidades e

49 pesquisas sobre doenças desse peixe (Cavalli et al., 2011). Doenças bacterianas como
50 vibrioses, fotobacterioses, micobacterioses, pseudomonoses, furunculoses,
51 estreptococoses e citrobacterioses representam prejuízos econômicos e restrição à
52 expansão do cultivo de beijupirá em tanques-rede *offshore* (Mclean et al., 2008).

53 De modo geral, infecções bacterianas são controladas com administração de
54 antibióticos, no entanto grande parte das drogas vai para o meio ambiente nas fezes.
55 Estima-se que 75% dos antibióticos administrados aos peixes são excretados
56 contaminando a água (Burrige et al., 2010). Os resíduos de antibióticos liberados no
57 ambiente de cultivo podem provocar o desenvolvimento de bactérias resistentes, causar
58 efeitos colaterais nos peixes, chegar a outros organismos aquáticos, afetar piscicultores
59 e consumidores finais (Romero et al., 2012).

60 O estudo foi realizado com o objetivo de identificar bactérias Gram-negativas,
61 potencialmente patogênicas, do intestino de beijupirás cultivado coletados durante duas
62 estações do ano, avaliando-se a resistência e multirresistência a antimicrobianos.

63

64 **Material e métodos**

65 Os procedimentos experimentais, discriminados no projeto de protocolo
66 23082.008952/2010, foram conduzidos de acordo com a Resolução n.876 de 2008 do
67 Conselho Federal de Medicina Veterinária, e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de
68 Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

69

70 **Coletas e amostras**

71 Foram realizadas coletas mensais durante oito meses de cultivo, consistindo de
72 duas coletas de peixes na fase de alevinos no laboratório, antes do povoamento em

73 tanques-rede (1200 m³) *offshore* (08°09'18,48''S e 034°48'41,52''W) e seis de juvenis
74 na fase de engorda. O estudo foi realizado em período de estio (novembro a fevereiro) e
75 chuvoso (março a julho), a densidade de estocagem dos animais foi de 3 peixes/m³,
76 alimentados duas vezes ao dia com ração comercial nacional (40% proteína e 8%
77 lipídios) experimental para a espécie.

78 Foram capturados cinco peixes por coleta, totalizando 40 animais, os quais
79 foram transportados vivos, com aeração constante até o momento do exame clínico,
80 procedimentos de anestesia, pesagem, medida do comprimento, eutanásia, necropsia e
81 retirada do intestino. Para anestesia utilizou-se benzocaína (100 mg/L) e a eutanásia foi
82 por secção medular (Neiffer e Stamper, 2009).

83

84 Isolamento e estocagem das bactérias

85 As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Sanidade de
86 Animais Aquáticos (LASAq) da UFRPE. Cada intestino foi dissecado, macerado,
87 inoculado em Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubado a 36°C por 24 h. As culturas em
88 TSB foram estriadas em ágar MacConkey e em Tiosulfato-Citrato de Sais Biliares
89 (TCBS) e as placas foram incubadas a 36°C por 24 h (Balcázar et al., 2008). As
90 colônias bacterianas foram descritas, purificadas, estocadas em caldo TSB glicerinado
91 (25%) e armazenadas em ultrafreezer à -80°C para posteriores procedimentos.

92

93 Identificação bioquímica e antibiograma

94 A triagem e agrupamento das bactérias foi realizada pela coloração de Gram e a
95 identificação bioquímica utilizando-se o sistema API (BioMérieux, França), API 20E e
96 o API 20NE. O antibiograma foi pelo método de difusão em discos de antibióticos em

97 ágar Mueller Hinton, conforme o protocolo do Clinical and Laboratory Standards
98 Institute (CLSI, 2012). Foram testados sete antibióticos, gentamicina (10µg),
99 tetraciclina (30µg), enrofloxacina (30µg), florfenicol (15µg), penicilina (6,25µg) e
100 ampicilina (10 µg) e cloranfenicol (30µg).

101

102 Extração, purificação e quantificação do DNA bacteriano

103 A extração e purificação do DNA bacteriano foi realizada segundo protocolo
104 fornecido pelo kit PureLink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen). O DNA genômico foi
105 quantificado por método de fluorometria, utilizando equipamento fluorômetro Qubit
106 (Fluorometer/Invitrogen) e o kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (2 - 1000ng).

107

108 Amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S

109 O gene rRNA 16S foi amplificado utilizando os *primers* P1 (8-27f: 5`-
110 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`) e P2 (1520-1541r: 5`-
111 AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3`) (Mmanda et al., 2014), preparados em um
112 volume final de 30µl contendo 0,3µM de cada primer, 15 ul de 2x GoTaq Master Mix
113 PCR SyberGreen (Promega), ~ 10 ng de DNA bacteriano e água ultrapura. A reação em
114 termociclador (Techne) foi iniciada a 95°C durante 120 s, seguida de 35 ciclos de 95°C
115 durante 40 s, 55°C por 40 s, 72°C por 90 s, terminando a 72°C por 600 s.

116 O produto da PCR (1400-1500 bp) foi corado com Blue green loading dye (LGC
117 Bio) e submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) e tampão 1xTAE (40 mM
118 de Tris-acetato; 1 mM de EDTA). Os *amplicons* foram purificados (kit PureLink PCR
119 Purification Kit - invitrogen), quantificados, ajustados nas concentrações entre 10 e 40

120 ng/ul e sequenciados (ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser) no Laboratório Central –
121 LABCEN/UFPE.

122

123 Análise de dados

124 Os resultados dos kits API foram analisados pelo programa apiweb
125 (<https://apiweb.biomerieux.com>). A multirresistência antimicrobiana (MAR) foi
126 caracterizada pelo índice (MAR > 0,2) (Krumperman, 1983). Para análise dos
127 cromatogramas utilizou-se as ferramentas Pregap4 e Gap4 do software STADEN 1.6 e o
128 software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para alinhar sequências de
129 nucleotídeos homólogas no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para julgamento da
130 influência dos períodos do ano (estio e chuvoso) na diversidade bacteriana (número de
131 espécies) e na multirresistência (MAR>0,2), empregou-se dois testes de proporção
132 ($P<0,05$), função *prop.test* do software R Core Team versão 2015.

133

134 **Resultados e discussão**

135 Na análise microbiológica, 72 linhagens bacterianas foram isoladas (41 do
136 TCBS e 31 do MacConkey), das quais 86,11% foram identificadas igualmente pelos
137 kits do sistema API e por sequenciamento. Algumas espécies discordantes foram
138 classificadas no bioquímico como *Aeromonas* spp. e geneticamente eram *Vibrio* spp.

139 Por possuírem comportamento fenotípico semelhante, há estudos em que foram
140 ressaltadas as diferenças entre *Aeromonas* spp. e *Vibrio* para auxiliar no diagnóstico de
141 doenças causadas por espécies patogênicas desses gêneros (Park et al., 2011), além de
142 testes moleculares que foram desenvolvidos para distinguir os gêneros de forma rápida e
143 precisa, especialmente na área de clínica humana (Mendes-Marques et al., 2013).

144 As 72 linhagens Gram-negativas constituíram 18 espécies inseridas em 12
 145 gêneros e cinco famílias (Tabela 1), sendo Enterobacteriaceae a família mais
 146 representativa com 63,88% dos isolados. Em relação às espécies mais frequentes,
 147 *Enterobacter cloacae* e *P. damsela* subsp. *damsela* juntas somaram 52,78% dos
 148 isolados.

149

150 Tabela 1. Frequências de bactérias Gram-negativas isoladas do intestino de beijupirá,
 151 *Rachycentron canadum*, cultivado em Pernambuco, Brasil.

| Família | Blast NCBI | Frequência | | Período do ano | Fase do peixe |
|--------------------|---|------------|--------|----------------|------------------|
| | | Fa | Fr (%) | | |
| Aeromonaceae | <i>Aeromonas hydrophila</i> | 2 | 2,78 | Estio | Engorda |
| | <i>Enterobacter cloacae</i> | 20 | 27,78 | Estio/chuvoso | Berçário/engorda |
| | <i>Enterobacter</i> spp. | 5 | 6,94 | Estio/chuvoso | Engorda |
| | <i>Enterobacter ludwigii</i> | 1 | 1,39 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Escherichia coli</i> | 2 | 2,78 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1,39 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 8 | 11,11 | Estio/chuvoso | Berçário/engorda |
| Enterobacteriaceae | <i>spp. pneumoniae</i> | | | | |
| | <i>Klebsiella</i> spp. | 1 | 1,39 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Morganella morganii</i> | 2 | 2,78 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Providencia stuartii</i> | 2 | 2,78 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1,39 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Proteus penneri</i> | 2 | 2,78 | Chuvoso | Engorda |
| | <i>Plesiomonas shigelloides</i> | 1 | 1,39 | Chuvoso | Engorda |
| Neisseriaceae | <i>Chromobacterium violaceum</i> | 1 | 1,39 | Estio | Engorda |
| Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> spp. | 1 | 1,39 | Estio | Engorda |
| | <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> | 18 | 25 | Estio/chuvoso | Berçário/engorda |
| Vibrionaceae | <i>Vibrio alginolyticus</i> | 2 | 2,78 | Estio | Berçário |
| | <i>Vibrio</i> spp. | 2 | 2,78 | Estio/chuvoso | Berçário/engorda |

152 Blast: Basic Local Alignment Search Tool; NCBI: National Center for Biotechnology Information; Fa:
 153 Frequência absoluta; Fr (%): Frequência relativa
 154

155 As espécies relatadas neste trabalho, com exceção de *E. coli*, *Klebsiella* spp.,
 156 *Providencia* spp. e *Chromobacterium* spp. foram isoladas por Duarte et al. (2014) em
 157 peixes de água doce cascudo (*Hypostomus auroguttatus*) e em bagre-pintado
 158 (*Pimelodus maculatus*). Os autores também relataram a Enterobacteriaceae como família

159 mais representativa. A semelhança entre as microbiotas dos peixes de diferentes
 160 ambientes sugere que a colonização de algumas espécies de bactérias no intestino desses
 161 animais é pouco afetada pela salinidade.

162 Todas as espécies identificadas nesse estudo são patógenos oportunistas para
 163 organismos aquáticos e/ou para humanos, e podem estar relacionados com as alterações
 164 e lesões observadas no exame clínico e na necropsia dos 10 alevinos ($139,30 \pm 31,52$ g;
 165 $27,13 \pm 1,46$ cm) e 30 juvenis ($456,77 \pm 264,46$ g; $37,29 \pm 6,05$ cm). Apesar de não
 166 possuírem anormalidades na pele, nas nadadeiras e nos opérculos, 47,5% dos peixes
 167 apresentaram opacidade de córnea e 30% anemia das brânquias. No exame interno
 168 foram observados com maior frequência, focos esbranquiçados nos rins, fígado anêmico
 169 e sinéquias no saco pericárdico (Tabela 2).

170

171 Tabela 2. Lesões externas e internas observadas em
 172 beijupirás cultivados em Pernambuco, Brasil.

| Exame | Órgãos | Lesões | Fr (%) |
|-----------|----------------|----------------------|--------|
| Externo | Olhos | Opacidade ocular | 47,5 |
| | Brânquias | Anêmicas | 30 |
| | Mandíbula | Deformidade | 2,5 |
| | Baço | Esplenomegalia | 5 |
| Aderência | | 5 | |
| Interno | Fígado | Anêmico | 30 |
| | | Congesto | 10 |
| | | Hemorragico | 12,5 |
| | | Pontos brancos | 10 |
| | Rim | Friável | 5 |
| | | Aderência | 10 |
| | | Friável | 2,5 |
| | | Pontos brancos | 5 |
| | | Focos esbranquiçados | 47,5 |
| | | Aderência | 5 |
| Coração | Pontos brancos | 12,5 | |
| | Ectópico | 2,5 | |
| | Aderência | 15 | |
| Intestino | Aumentado | 2,5 | |
| | Aderência | 5 | |

173

Fr (%): Frequência relativa de animais com a lesão

174

175 Com exceção dos focos esbranquiçados nos rins, as lesões descritas são
176 semelhantes aos achados de necropsia relatados em beijupirás doentes ou mortos por
177 infecção bacteriana (McLean et al., 2008; Rameshkumar et al., 2014; Shimada et al
178 2014). Os órgãos anêmicos com pontos brancos e aderência dos órgãos podem ser
179 consequências, por exemplo, de vibrioses, fotobacterioses e/ou furunculoses (McLean et
180 al., 2008; Rameshkumar et al., 2014; Shimada et al 2014), enquanto que a opacidade
181 ocular pode estar associada a estreptococose, que segundo Guo et al. (2015a) é lesão
182 característica desta enfermidade.

183 Em ordem de incidência, as espécies *P. damsela* subsp. *damsela*, agente da
184 fotobacteriose, *V. alginolyticus* causador de vibriose e *A. hydrophila* responsável pela
185 furunculose em peixes, estão entre os patógenos mais isolados de beijupirás doentes,
186 moribundos ou mortos (McLean et al., 2008; Rameshkumar et al., 2014; Shimada et al
187 2014).

188 *P. damsela* subsp. *damsela*, maior patógeno do beijupirá, foi a segunda
189 espécie mais frequente (25%), isolada nas duas fases do peixe, durante todo período do
190 experimento. É possível que esse agente tenha uma relação estreita com o intestino do
191 beijupirá e esteja presente em altas frequências mesmo em peixes assintomáticos.
192 Segundo Tortora et al. (2012), os peixes podem conviver com patógenos sem que eles
193 causem doença, porém em condições estressantes, o que geralmente ocorre nas
194 instalações de cultivo, o sistema imunológico do peixe pode ser comprometido e haver
195 um desequilíbrio entre as defesas naturais do animal e as características do micro-
196 organismo de produzir doença.

197 A presença de *Vibrio* spp. (5,56%) e *Aeromonas* spp. (2,78%) no intestino
198 sugere que também colonizaram outros órgãos do peixe com frequências provavelmente

199 maiores, já que os órgãos de eleição dos dois grupos bacterianos são principalmente rins
200 e fígado. Esses órgãos de eleição foram analisados por Nascimento et al. (2014) que
201 observaram vibrios em 27,03% e aeromonas em 40,54% dos mesmos peixes utilizados
202 no presente estudo.

203 A aderência do coração observada em 15% dos animais é sugestiva de
204 pericardite e segundo Geng et al. (2011) e Rameshkumar et al. (2014) pode estar
205 associada à infecção por *Vibrio* spp. A presença de pontos brancos no baço, fígado, rins,
206 coração e pâncreas podem ser consequência de infecção por *A. hydrophila* em beijupirás
207 de acordo com os relatos de McLean et al. (2008).

208 47,5% dos animais apresentaram focos esbranquiçados de consistência firme e
209 aspecto pétreo ou arenoso nos rins, descrições que são compatíveis com as de cálculos
210 renais ou nefrocalcinose. Os focos apareceram a partir da quarta coleta, quando os
211 animais já estavam no período de engorda em alto mar e coincidiram com a mudança da
212 ração administrada, o que pode explicar a possível origem dos cálculos.

213 Segundo Benetti et al. (2010) e Klosterhoff et al. (2015), a nefrocalcinose é uma
214 doença multifatorial comumente relatada em beijupirás, que pode ser associada ao
215 desequilíbrio de cálcio e magnésio na dieta, a fatores genéticos e ambientais e a
216 exposição prolongada ao dióxido de carbono. Os mesmos autores sugeriram que
217 nefrocalcinose foi a causa da morte de beijupirás na fase de engorda, ao observarem
218 cálculos nos rins e obstrução da uretra em peixes mortos.

219 O período do ano (estio ou chuvoso) não influenciou significativamente ($P \geq$
220 0,05) na diversidade bacteriana associada ao intestino do beijupirá. É possível que uma
221 vez que os tanques de estocagem deste estudo estavam situados distantes da costa, em
222 torno de 10 km, tenha reduzido a possibilidade de interferência climática, e/ou a

223 composição microbiana do intestino de peixes seja resultado de pressões seletivas
 224 específicas no hospedeiro, como afirmou Duarte et al. (2014).

225 Em relação à resistência antimicrobiana, as linhagens bacterianas foram testadas
 226 frente a sete drogas e classificadas, quanto à susceptibilidade, como sensível,
 227 intermediária ou resistente ao antibiótico utilizado (Tabela 3). 95,83% dos isolados
 228 foram resistentes à penicilina (6,25µg) e 45 (62,50%) à ampicilina (10µg).

229

230 Tabela 3. Antibiógrama de bactérias isoladas do intestino de beijupirá cultivado e
 231 Pernambuco, Brasil.

| Família | n | Antibióticos | | | | | | |
|--------------------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | | Amp 10 µg | Clo 30 µg | Gen 30 µg | Flf 30 µg | Eno 5 µg | Tet 30 µg | Pen 10UI |
| Aeromonaceae | 2 | 1R | S | S | S | S | S | R |
| Enterobacteriaceae | 46 | 31R 5I | 1R 5I | 1R 1I | 3R | 11R | 3R 2I | 43R |
| Neisseriaceae | 1 | R | S | S | S | S | R | R |
| Pseudomonadaceae | 1 | S | S | S | S | S | S | R |
| Vibrionaceae | 22 | 12R | S | 1R 1I | S | S | 1R | R |

232 n: número de isolados, Amp: ampicilina, Clo: cloranfenicol, Gen: gentamicina, Flf: florfenicol,
 233 Eno: enrofloxacina, Tet: tetraciclina, Pen: penicilina, S: sensível, I: intermediária e R: resistente.
 234

235 A resistência aos dois antibióticos β-lactâmicos pode ser devido às
 236 características intrínsecas das bactérias Gram-negativas. Esse grupo de bactérias possui
 237 uma membrana externa que impermeabiliza muitas moléculas de diferentes classes de
 238 antibióticos eficazes para Gram-positivas. Espécies isoladas no presente estudo como
 239 *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e *Morganella* spp. foram descritas
 240 como resistentes naturais a grupos específicos de antibióticos por Cox e Wright (2013) e
 241 Olaitan et al. (2014).

242 A resistência das espécies *E. cloacae* (63, 63%), *K. pneumoniae*, *M. morganii*,
 243 *P. stuartii* e *P. penneri* à enrofloxacina (5 µg), antibiótico de uso exclusivo veterinário,

244 também foi relativamente alta (15,28%) se considerar que no Brasil apenas
 245 antimicrobianos à base de florfenicol e oxitetraciclina são registrados para tratamentos
 246 terapêuticos em casos de doenças bacterianas em aquicultura.

247 69,44% das linhagens apresentaram índice de multirresistência antimicrobiana
 248 (MAR) maior que 0,2 (Tabela 4). Os vibriónáceos, que inclui os maiores patógenos do
 249 beijupirá, apresentaram índice MAR (0,2857), com resistência principalmente à
 250 ampicilina e penicilina, diferentemente dos resultados de Ku et al. (2009) que
 251 detectaram multirresistência de *P. damsela* subsp. *damsela* à amoxicilina,
 252 cloranfenicol e oxitetraciclina em estudos com beijupirá realizados em Taiwan.

253

254 Tabela 4. Multirresistência de bactérias isoladas do intestino de beijupirá
 255 cultivado em Pernambuco, Brasil.

| Família | n | Índice MAR | | | | | |
|--------------------|----|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 0,1428 | 0,2857 | 0,4285 | 0,5714 | 0,8571 |
| Aeromonaceae | 2 | - | 50% | 50% | - | - | - |
| Enterobacteriaceae | 46 | 4,35% | 21,74% | 52,17% | 15,22% | 4,35% | 2,17% |
| Neisseriaceae | 1 | - | - | - | 100% | - | - |
| Pseudomonadaceae | 1 | - | 100% | - | - | - | - |
| Vibrionaceae | 22 | - | 36,36% | 63,64% | - | - | - |

256 n: número de isolados, MAR: índice de multirresistência a antimicrobianos, MAR>0,2:
 257 bactérias multirresistentes

258

259 A espécie com maior índice MAR (0,8571) foi *E. cloacae*, uma linhagem
 260 resistente a todos os antibióticos com exceção do cloranfenicol (30 µg). É importante
 261 ressaltar que *E. cloacae* foi a espécie mais frequentemente isolada (27,78%) dos
 262 beijupirás na fase de engorda no período de estiagem, e representa um risco no que se
 263 refere à disseminação de multirresistência antimicrobiana, pois segundo Gao et al.
 264 (2012), a transferência de resistência pode ocorrer entre bactérias intestinais, ambientais
 265 e patógenos oportunistas no ambiente de cultivo.

266 Nesse experimento, os períodos do ano não influenciaram significativamente (P
267 $\geq 0,05$) no número de bactérias multirresistentes. Esse resultado é discordante dos
268 relatos por Hoa et al. (2011), que encontraram frequências altas de *Aeromonas* spp. e
269 *Acinetobacter* spp. resistentes relacionadas a condição chuvosa em ambientes de cultivo
270 no Vietnã. É possível que a variação dos parâmetros ambientais e físico-químicos do
271 cultivo não tenha sido suficiente para influenciar a microbiota multirresistente associada
272 ao peixe.

273 A multirresistência a antimicrobianos e transferência de resistência no ambiente
274 de cultivo é um problema que pode inviabilizar tratamentos de bacterioses, afetar a
275 saúde de piscicultores e consumidores finais do produto, principalmente os apreciadores
276 de comida crua ou levemente cozida. Shin e Cho (2013) compararam *E. coli* isoladas de
277 fezes de piscicultores com as de um grupo controle de funcionários de restaurantes, e
278 relataram que as *E. coli* dos piscicultores foram mais resistentes à antibióticos que as do
279 grupo controle, especialmente à cefalotina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima.

280 Para evitar o aumento de bactérias resistente nos animais e ambientes de cultivo
281 é necessário que ações preventivas sustentáveis sejam prioridade no controle de doenças
282 e haja a diminuição do uso de antibióticos na piscicultura. Alternativas aos antibióticos
283 estão sendo estudadas para beijupirá (Ku et al., 2008; Machen, 2008; Guo et al., 2011,;
284 Geng et al., 2011; Xing et al., 2013; Garrido-Pereira et al., 2014; 2015a, 2015b), e
285 podem representar uma evolução no que se refere à sanidade do animal.

286 O intestino do beijupirá inclui bactérias Gram-negativas potencialmente
287 patogênicas para animais aquáticos e humanos, com elevadas taxas de multirresistência
288 aos antimicrobianos testados, independentes de fatores climáticos que representam um
289 desafio à sanidade do peixe cultivado.

290

291 **Agradecimentos**

292 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao
293 Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
294 Científico e Tecnológico (CNPq) e à Rede de Pesquisa e Desenvolvimento em Piscicultura
295 Marinha (REPIMAR).

296

297 **Referências**

- 298 1. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Calvo AC, Gironés O, Muzquiz JL
299 (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from
300 intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278:188-191.
- 301 2. Benetti DD, O'hanlon B, Rivera JA, Welch AW, Maxey C, Orhun MR (2010)
302 Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged
303 cages in the Caribbean. *Aquaculture* 302:195-201.
- 304 3. Burridge L, Weis SW, Cabello F, Pizarro J, Bostick K (2010) Chemical use in
305 salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental
306 effects. *Aquaculture* 306:7-23.
- 307 4. Cavalli RO, Domingues EC, Hamilton S (2011) Desenvolvimento da produção de
308 peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. *R. Bras. Zootec.*
309 40:151-164.
- 310 5. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for
311 Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement.
312 Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI. 32(3):184p.
- 313 6. Cox G, Wright GD (2013) Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins,
314 challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303:287-292.

- 315 7. Duarte S, Silva FCP, Zauli DAG, Nicoli JR, Araújo FG (2014) Gram-negative
316 intestinal indigenous microbiota from two Siluriform fishes in a tropical reservoir.
317 Braz. J. Microbiol. 45(3):1283-1292.
- 318 8. Gao P, Mao D, Luo Y, Wanga L, Xu B, Xu L (2012) Occurrence of sulfonamide
319 and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment.
320 Water Res. 46(7):2355-2364.
- 321 9. Garrido-Pereira MA, Schwarz M, Delbos B, Rodrigues RV, Romano L, Sampaio L
322 (2014) Probiotic effects on cobia *Rachycentron canadum* larvae reared in a
323 recirculating aquaculture system. LAJAR 42(5):1169-1174.
- 324 10. Geng X, Dong XH, Tan BP, Yang QH, Chi SY, Liu HY, Liu XQ (2011) Effects of
325 dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific
326 immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish Shellfish
327 Immun. 31(3):400-406.
- 328 11. Guo JJ, Chen CH, Yeh CH, Kuo CM, Chen TI (2011) Preparation Method of
329 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Vaccine for Cobia (*Rachycentron*
330 *canadum*). J. Taiwan Fish. Res. 19(1):37-44.
- 331 12. Guo JJ, Huang MY, Hong JW, Chuang YC, Chou RL, Lee YH, Chen TI (2015b)
332 The Efficacy of Inactivated *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* Combined
333 with Levan/Alum as Vaccine against Photobacteriosis in Cobia, *Rachycentron*
334 *canadum*. J. World Aquacult. Soc. 46(5):549–556.
- 335 13. Guo JJ, Kuo CM, Hong JW, Chou RL, Lee YH, Chen, TI (2015a) The effects of
336 garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium*
337 *damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in Cobia,
338 *Rachycentron canadum*. Aquaculture 435:111–115.

- 339 14. Hoa PTP, Managaki S, Nakada N, Takada H, Shimizu A, Anh DH, Viet PH Suzuki,
340 S. (2011) Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in
341 aquatic environments of northern Vietnam. *Sci. Total Environ.* 409(15):2894–2901.
- 342 15. Klosterhoff M, Pedrosa V, Sampaio LA, Ramos L, Tesser MB, Romano LA (2015)
343 Nephrocalcinosis and kidney stones in *Rachycentron canadum*. *B. Eur. Assoc. Fish*
344 *Pat.* 35(4) 138-147.
- 345 16. Krumperman PH (1983) Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli*
346 to identify. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1):165-170.
- 347 17. Ku CC, Wang CS, Lu CH (2008) A vaccination trial using attenuated
348 *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* in Cobia. *J. Fish. Soc. Taiwan* 35(3):127-
349 131.
- 350 18. Ku CC, Wang CS, Nan FH, Lu CH (2009) In vitro antimicrobial susceptibility of
351 *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* from Cobia (*Rachycentron canadum*) at
352 Penghu (Pescadores) Islands, Taiwan during 1999 and 2008. *J. Fish. Soc. Taiwan*
353 36(2):151-160.
- 354 19. Machen JW (2008) *Vibrio* spp. disinfection and immunization of cobia
355 (*Rachycentron canadum*) for the prevention of disease in aquaculture facilities.
356 United States, 98p. (Thesis. Master. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and
357 State University).
- 358 20. Mclean E, Salze G, Craig SR (2008) Parasites, diseases and deformities of cobia.
359 *Ribarstvo: CJF* 66(1):1-16.
- 360 21. Mendes-Marques CL, Hofer E, Leal NC (2013) Development of duplex-PCR for
361 identification of *Aeromonas* species. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46(3):355-357.

- 362 22. Mmanda FP, Zhou S, Zhang J, Zheng X, An S, Wang G (2014) Massive mortality
363 associated with *Streptococcus iniae* infection in cage-cultured red drum (*Sciaenops*
364 *ocellatus*) in Eastern China. Afr. J. Microbiol. Res. 8(16):1722-729.
- 365 23. Nascimento DL, Barros CN, Silva ADR, Guimarães JM, Pedrosa VF, Mendes ES
366 (2014) Bactérias potencialmente patogênicas isoladas de beijupirá (*Rachycentron*
367 *canadum*) cultivadas em sistema offshore. Rev.Cient.Elet.Med.Vet.8(2):12-21.
- 368 24. Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and
369 euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. ILAR J. 50(4):343-360.
- 370 25. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM (2014) Mechanisms of polymyxin resistance:
371 acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front. Microbiol. 5(643):1-18.
- 372 26. Park SY, Nam HM, Park K, Park SD (2011) *Aeromonas hydrophila* Sepsis
373 Mimicking *Vibrio vulnificus* Infection. Ann. Dermatol. 23(1):25-29.
- 374 27. Rameshkumar P, Kalidas C, Tamilmani G, Sakthivel M, Nazar AKA, Maharshi VA,
375 Rao SKS, Gopakumar G (2014) Microbiological and histopathological
376 investigations of *Vibrio alginolyticus* infection in cobia, *Rachycentron canadum*
377 (Linnaeus, 1766) cultured in sea cage. Indian J. Fish. 61(1):124-127.
- 378 28. Romero J, Feijóó CG, Navarrete P (2012) Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse
379 and Alternatives. In: Carvalho, E.D.; David, G.S.; Silva, R. (Ed.) Health and
380 Environment in Aquaculture. InTech, 159-198.
- 381 29. Savay-da-Silva LK (2015) Produção de beijupirá (*Rachycentron canadum*) visando
382 a rastreabilidade - parâmetros de qualidade ambiental; físico-químicos e
383 microbiológicos da espécie. São Paulo, Brasil, 174p (Tese. Doutorado. Centro de
384 Energia Nuclear na Agricultura. USP).

- 385 30. Shimada MT, ClaudianoGS, Engracia Filho Jr, Yunis J, Moraes FR, Moreira RG,
386 Moraes JRE (2014) Hepatic Steatosis in Cage-Reared Young Cobia, *Rachycentron*
387 *Canadum* (Linnaeus, 1766), in Brazil. J. Vet. Sci. Med. Diagn. 3(2):1-5.
- 388 31. Shin HH, Cho SH (2013) Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia*
389 *coli* Strains Isolated from Fishery Workers. Osong Public Health Res. Perspect.
390 4(2):72-75.
- 391 32. Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre:
392 Artmed, 2012, 934 p.
- 393 33. Xing CF, Hu HH, Huang JB, Fang HC, Kai YH, Wu YC, Chi, SC (2013) Diet
394 supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*)
395 enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. Fish
396 Shellfish Immunol. 35(4):1122-1128.

1 5. ARTIGO CIENTÍFICO II

2 Manuscrito para submissão ao *Brazilian Journal of Microbiology*

3

4 **Identificação genotípica e atividade antimicrobiana de bactérias isoladas do** 5 **intestino de beijupirá.**

6

7 Carolina Notaro de Barros¹, Virgínia Fonseca Pedrosa², João Menezes Guimarães¹,
8 Alexandre Duarte Rodrigues da Silva³, Emiko Shinozaki Mendes⁴

9

10 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de
11 Pernambuco, UFRPE, Recife-PE, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Aquicultura
12 da Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande-RS, Brasil; ³Professor do
13 Instituto Federal de Pernambuco, IFPE, Vitória de Santo Antão, Brasil; ⁴Professora do
14 Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, Recife-PE, Brasil.

15

16

Resumo

17 Dada importância de se estudar alternativas sustentáveis no controle de patógenos na
18 piscicultura em substituição aos antibióticos, objetivou-se identificar bactérias com
19 propriedades antimicrobianas frente à *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V.*
20 *alginolyticus*, isoladas do intestino de 40 beijupirás (10 alevinos e 30 juvenis) cultivados
21 em sistema *offshore*. Foram isoladas 53 linhagens, classificadas em 13 espécies,
22 pertencentes às famílias Enterococcaceae, Paenibacillaceae, Staphylococcaceae,
23 Streptococcaceae e Bacillaceae, sendo essa última a mais representativa. A espécie mais
24 frequente foi *Bacillus cereus* (39,62%). Das 53 linhagens 16,98% apresentaram

25 atividade antibacteriana, produzindo halos de inibição que variaram de $9,33 \pm 0,58$ a
26 $28,77 \pm 0,25$ mm. As espécies com atividade antibacteriana foram *Staphylococcus*
27 *piscifermentans*, *S. lugdunensis*, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *E. faecium* e
28 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. A espécie mais frequente foi *E. faecium* (33,33%)
29 incluída no gênero responsável pelos maiores halos, especialmente contra *V. vulnificus*.
30 O período do ano não influenciou significativamente ($P \geq 0,05$) na diversidade das
31 espécies encontradas, nem no número de bactérias com propriedades antimicrobianas. O
32 intestino do beijupirá, *Rachycentron canadum*, compõe bactérias Gram-positivas
33 patogênicas oportunistas para humanos e espécies com atividade antimicrobiana frente à
34 vibrios que podem ser consideradas potenciais probióticas para beijupirá no controle de
35 vibrioses.

36
37 **Palavras-chave:** *Rachycentron canadum*, probiótico, bacteriose, antagonismo, rRNA
38 16S

40 **Introdução**

41 O beijupirá, *Rachycentron canadum*, reúne características comuns às espécies
42 aquáticas cultivadas comercialmente no Brasil e representa uma promessa para a
43 piscicultura marinha no país. O peixe pode ser cultivado durante o ano todo na costa
44 brasileira, e sazonalmente na região sul, podendo alcançar de 4 a 6 kg em um ano de
45 cultivo (Sampaio et al., 2011). Como recente candidato à piscicultura, há dificuldades
46 para cultivá-lo relatadas nas áreas de diagnóstico de doenças, prevenção, controle de
47 patógenos e pesquisas sobre sanidade do peixe (Cavalli et al., 2011).

48 As infecções bacterianas representam restrição à expansão da maricultura, e os
49 patógenos comumente relatados em beijupirás são da Família Vibrionaeae, responsáveis
50 por doenças graves como vibrioses e fotobacterioses (Machen, 2008). Todas as fases do
51 ciclo de produção podem sucumbir a vibriose, e espécies como *V. alginolyticus*, *V.*
52 *harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* e *V. ordalii* já foram
53 isoladas de rins, intestinos, lesões sistêmica hemorrágica e úlceras no estômago de
54 beijupirás moribundos e de mortos (Liu et al., 2004; Mclean, 2008; Rameshkumar et al.,
55 2014).

56 O tratamento das bacterioses na piscicultura é normalmente realizado pela
57 administração de antibióticos, que utilizados de forma inadequada podem contaminar os
58 ambientes aquáticos e outros animais, persistir no produto final e chegar ao consumidor
59 humano, além de contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes. Por esse
60 motivo, há o interesse técnico e científico de buscar alternativas para prevenir e
61 controlar patógenos, e a utilização de produtos a base de micro-organismos vivos, os
62 probióticos, pode ser considerada (Figueiredo e Leal, 2008, Romero et al., 2012).

63 Sabendo que entre os mecanismos de ação dos probióticos está a ação
64 antagonista frente aos patógenos pela produção de compostos antimicrobianos
65 (Callaway et al., 2008; Nayak , 2010), o estudo foi realizado com o objetivo de
66 identificar bactérias isoladas do intestino de beijupirá cultivado com atividade
67 antibacteriana frente a espécies patogênicas de *Vibrio* spp..

68

69 **Material e métodos**

70 Coletas e amostras

71 Foram oito meses de coletas, dos quais dois foram de beijupirás na fase de
 72 alevinos em laboratório e seis de juvenis na fase de engorda depois do povoamento em
 73 tanques-rede *offshore* (08°09'18,48''S e 034°48'41,52''W). O estudo foi realizado em
 74 período de estio (novembro a fevereiro) e chuvoso (março a julho) e os animais estavam
 75 submetidos às condições descritas na Tabela 1 (Savay-da-Silva, 2015).

76

77 Tabela 1. Condições de cultivo *offshore* de beijupirá em Pernambuco, Brasil.

| Parâmetros | Período seco | Período chuvoso |
|---|----------------------------|------------------------|
| Índice pluviométrico (mm) | 201,80 ± 116,84 | 562,85 ± 192,99 |
| Temperatura do ar (°C) | 26,83 ± 4,40 | 25,18 ± 3,75 |
| Temperatura da água (°C) | 29,34 ± 0,52 | 26,68 ± 0,51 |
| Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹) | 6,23 ± 1,72 | 7,24 ± 0,07 |
| pH | 6,55 ± 0,22 | 8,65 ± 0,10 |
| Salinidade | 36,41 ± 1,05 | 36,28 ± 0,88 |
| Volume útil dos tanques | 1200m ³ | |
| Densidade de estocagem | 3 peixes /m ³ | |
| Composição da ração | 40% proteína e 8% lipídios | |
| Arraçoamento | Duas vezes ao dia | |

78

79 Foram capturados cinco peixes por coleta, totalizando 40 animais, os quais
 80 foram transportados vivos, com aeração constante até o momento do exame clínico,
 81 procedimentos de anestesia, pesagem, medida do comprimento, eutanásia, necropsia e
 82 retirada do intestino. Para anestesia utilizou-se benzocaína (100 mg/L) e a eutanásia foi
 83 por secção medular (Neiffer e Stamper, 2009).

84 Os procedimentos experimentais, discriminados no projeto de protocolo
 85 23082.008952/2010, foram conduzidos de acordo com a Resolução n.876 de 2008 do
 86 Conselho Federal de Medicina Veterinária, e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de
 87 Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

88

89 Isolamento das bactérias do intestino

90 O intestino de cada animal foi macerado, inoculado em Caldo Trypticase de Soja
91 (TSB) e incubado a 36°C por 24 h. Posteriormente, inóculos do caldo foram estriados
92 em placas contendo Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRS), que foram incubadas a 36°C por
93 24-48h (Balcázar et al., 2008). Após o desenvolvimento das bactérias, as diferentes
94 colônias foram purificadas, submetidas à coloração de Gram, estocadas em caldo TSB
95 glicerinado (25%) e armazenadas em ultrafreezer à -80°C. As análises microbiológicas
96 foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos (LASAQ) da
97 Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

98

99 Testes de antagonismo frente a *Vibrio* spp.

100 As bactérias isoladas foram confrontadas *in vitro* frente a três espécies de vibrios
101 patogênicos para peixes, *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Vibrio vulnificus*
102 (ATCC 27562) e *Vibrio alginolyticus* (IAL 1957). O teste de antagonismo foi realizado
103 pelo método “bloco de gelose” descrito por Stern et al. (2006), em que cada isolado foi
104 suspenso em solução salina 0,85%, referente à escala de MacFarland 0.5, semeado na
105 superfície do ágar MRS e incubado por 24 h a 36°C. Após desenvolvimento, discos do
106 ágar MRS (~ 6 mm de diâmetro) foram assepticamente cortados e colocados invertidos,
107 com a parte impregnada pela bactéria testada, na superfície de ágar Mueller-Hinton
108 recém semeado com o patógeno, para incubação por 24 h a 36°C.

109 A atividade antibacteriana foi indicada pelas zonas claras ao redor dos discos de
110 ágar, que foram mensuradas (mm) com o auxílio de paquímetro. Todos os testes foram
111 realizados em triplicata com controle negativo do meio MRS.

112

113 Amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S

114 Para extração e purificação do DNA bacteriano utilizou-se kit PureLink™
115 Genomic DNA Kits (Invitrogen), e a quantificação do DNA foi realizada utilizando
116 equipamento fluorômetro Qubit (Fluorometer/Invitrogen) e o kit Quant-iT™ dsDNA
117 BR Assay Kit (2 - 1000ng).

118 O gene rRNA 16S foi amplificado utilizando os *primers* P1 (8-27f: 5`-
119 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`) e P2 (1520-1541r: 5`-
120 AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3`) (Mmanda et al., 2014), preparados em um
121 volume final de 30µl contendo 0,3µM de cada primer, 15 ul de 2x GoTaq Master Mix
122 PCR SyberGreen (Promega), ~ 10 ng de DNA bacteriano e água ultrapura. A reação em
123 termociclador (Techne) foi iniciada a 95°C durante 120 s, seguida de 35 ciclos de 95°C
124 durante 40 s, 55°C por 40 s, 72°C por 90 s, terminando a 72°C por 600 s.

125 O produto da PCR (1400-1500 bp) foi corado com Blue green loading dye (LGC
126 Bio) e submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) e tampão 1xTAE (40 mM
127 de Tris-acetato; 1 mM de EDTA). Os *amplicons* foram purificados (kit PureLink PCR
128 Purification Kit - invitrogen), quantificados, ajustados nas concentrações entre 10 e 40
129 ng/ul e sequenciados (ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser) no Laboratório Central –
130 LABCEN/UFPE.

131

132 Análise de dados

133 Para analisar os cromatogramas provenientes do sequenciamento utilizaram-se
134 as ferramentas Pregap4 e Gap4 do software STADEN 1.6 e o software BLAST (Basic
135 Local Alignment Search Tool) para alinhamento dos nucleotídeos com sequências
136 homólogas no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A influência dos períodos do ano
137 (estio e chuvoso) na diversidade bacteriana (número de espécies) e no número de

138 bactérias com atividade antibacteriana foi avaliada por dois testes de proporção
139 ($P < 0,05$) utilizando o software R Core Team versão 2015. Para avaliar a atividade
140 antibacteriana (diferenças entre os halos de inibição) foi empregada a análise de
141 variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o mesmo software
142 R.

143

144 Resultados e discussão

145 Cinquenta e três linhagens bacterianas Gram-positivas foram isoladas do
146 intestino de beijupirá em meio Man Rogosa Sharpe (MRS), com desenvolvimento de 13
147 espécies, de acordo com a identificação molecular baseada no sequenciamento de
148 nucleotídeos do gene rRNA 16S e suas regiões hipervariáveis. As 13 espécies foram
149 classificadas em cinco gêneros e cinco famílias distintas (Tabela 2). 77,36% dos
150 isolados foram da família Bacillaceae, a qual pertence o *Bacillus cereus*, espécie mais
151 frequente nessa pesquisa (39,62%), seguida do *Bacillus* spp. (18%).

152 Espécies do gênero *Bacillus* spp. também dominaram a microbiota intestinal do
153 peixe marinho garoupa (*Epinephelus coioides*), em estudo realizado por Sun et al.
154 (2009) na China. No entanto, os autores não isolaram a espécie *B. cereus* e relataram a
155 abundância do *Bacillus pumilus*, que no presente estudo foi a espécie com menor
156 frequência (1,89%) entre os *Bacillus*. Com exceção do *Brevibacillus* spp., quatro dos
157 cinco gêneros isolados dos beijupirás foram comuns aos das garoupas analisadas por
158 Sun et al. (2009), que identificaram espécies homólogas como *Lactococcus lactis* e
159 *Enterococcus faecium*.

160

161 Tabela 2. Frequências de bactérias Gram-positivas isoladas do intestino de 40
 162 beijupirás, *Rachycentron canadum*, cultivados em Pernambuco, Brasil.

| Família | Blast NCBI | Frequência | | Período do ano |
|-------------------|---|------------|--------|----------------|
| | | Fa(%) | Fr (%) | |
| Bacillaceae | <i>Bacillus cereus</i> | 21 | 39,62 | Estio/chuvoso |
| | <i>Bacillus licheniformis</i> | 2 | 3,77 | Estio |
| | <i>Bacillus pumilus</i> | 1 | 1,89 | Chuvoso |
| | <i>Bacillus safensis</i> | 3 | 5,66 | Estio |
| | <i>Bacillus</i> spp. | 10 | 18,87 | Estio/chuvoso |
| | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 4 | 7,55 | Estio/chuvoso |
| Enterococcaceae | <i>Enterococcus faecium</i> | 3 | 5,66 | Estio/chuvoso |
| | <i>Enterococcus gallinarum</i> | 1 | 1,89 | Chuvoso |
| | <i>Enterococcus</i> spp. | 1 | 1,89 | Chuvoso |
| Paenibacillaceae | <i>Brevibacillus borstelensis</i> | 3 | 5,66 | Estio/chuvoso |
| Staphylococcaceae | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 1 | 1,89 | Chuvoso |
| | <i>Staphylococcus piscifermentans</i> | 1 | 1,89 | Estio |
| Streptococcaceae | <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> | 2 | 3,77 | Chuvoso |

163 Blast: Basic Local Alignment Search Tool; NCBI: National Center for Biotechnology Information; Fa:
 164 Frequência absoluta; Fr (%): Frequência relativa.
 165

166 Espécies do gênero *Bacillus* spp. também dominaram a microbiota intestinal do
 167 peixe marinho garoupa (*Epinephelus coioides*), em estudo realizado por Sun et al.
 168 (2009) na China. No entanto, os autores não isolaram a espécie *B. cereus* e relataram a
 169 abundância do *Bacillus pumilus*, que no presente estudo foi a espécie com menor
 170 frequência (1,89%) entre os *Bacillus*. Com exceção do *Brevibacillus* spp., quatro dos
 171 cinco gêneros isolados dos beijupirás foram comuns aos das garoupas analisadas por
 172 Sun et al. (2009), que identificaram espécies homólogas como *Lactococcus lactis* e
 173 *Enterococcus faecium*.

174 As espécies isoladas nesse estudo são bactérias benéficas ou comensais, inócuas
 175 para os peixes, outros animais aquáticos e/ou humanos, com exceção de algumas
 176 linhagens patogênicas oportunistas para humanos como *B. cereus*, responsável por
 177 doenças veiculadas a alimentos, infecções locais e sistêmicas (Schoeni e Wong, 2005;
 178 Bottone, 2010), *Enterococcus faecium*, agente de infecções graves em indivíduos

179 imunocomprometidos (Schaik et al., 2010) e *Staphylococcus lugdunensis*, causador de
180 endocardites e infecções cutâneas superficiais (Bocher et al. 2009).

181 Linhagens não patogênicas de *B. cereus* (Li et al., 2015; Subharanjani et al.,
182 2015) e *E. faecium* (Sarra et al., 2013; Abumourad et al., 2014) são reconhecidos na
183 literatura por possuírem características probióticas. As espécies identificadas como *B.*
184 *pumilus* (Sun et al., 2009; Yang et al., 2014), *B. licheniformis* (Kumari et al., 2014,
185 Azarin et al., 2015), *B. thuringiensis* (Bagde et al., 2009; Reneshwary et al., 2011), *E.*
186 *gallinarum* (Sorroza et al., 2013; Román et al., 2015), *S. piscifermentans* (Hajar e
187 Hamid, 2013) e *Lc. lactis subsp. lactis* (Heo et al., 2012) foram isoladas anteriormente
188 de outras espécies de peixes e possuem efeitos probióticos para peixe e camarão.

189 O período do ano não influenciou estatisticamente ($P \geq 0,05$) na diversidade das
190 espécies encontradas, nem no número de bactérias com propriedades antimicrobianas.
191 De acordo com Savay-da-Silva (2015), apesar de variarem, os parâmetros ambientais e
192 físico-químicos do sistema *offshore* encontraram-se em conformidade com os limites
193 sugeridos na literatura para criação do beijupirá, e possivelmente, não interferiram na
194 criação dos animais. Infere-se que a variação desses parâmetros no período do
195 experimento, também não tenha sido suficiente para modificar a microbiota associada
196 ao peixe e/ou a composição microbiana do intestino desses animais seja resultado de
197 pressões seletivas específicas no hospedeiro, como afirmado por Duarte et al. (2014).

198 Com relação aos testes de antagonismo, as bactérias se comportaram de formas
199 diferentes e produziram distintos halos de inibição, que variaram de $9,33 \pm 0,58$ a $28,77$
200 $\pm 0,25$ mm (Tabela 3). Dos 53 isolados, 16,98 % provocaram efeito antagônico frente
201 aos vîrios testados, dos quais oito inibiram todos os vîrios. O grupo mais frequente

202 foi *Enterococcus* spp. (44,44%), responsável pelos maiores halos, especialmente contra
203 *V. vulnificus*.

204 As bactérias com atividade antimicrobianas desse estudo devem ser consideradas
205 para testes *in vivo*, individualmente ou associadas, com possível êxito, uma vez que são
206 autóctones e se enquadram no perfil de probiótico descrito por Ferreira et al. (2012), que
207 consideraram um produto de boa qualidade, bactérias que essencialmente sobrevivem às
208 condições adversas do trato gastrointestinal, colonizam o intestino, não são patogênicas
209 ao animal nem ao ser humano, têm atividade antagônica às bactérias indesejáveis e
210 promovem benefícios comprovados ao hospedeiro.

211

212 Tabela 3. Atividade antibacteriana de bactérias isoladas do intestino de beijupirá,
213 *Rachycentron canadum*, frente a *Vibrio* spp.

| Espécie | Diâmetro médio dos halos de inibição (mm) ± DP | | |
|---|---|-----------------|-------------------|
| | Vp | Vv | Va |
| <i>Staphylococcus piscifermentans</i> | 10 ± 0 bCD | 14,17 ± 0,29 aF | 13,9 ± 1,21 aABC |
| <i>Bacillus</i> spp. | 0 cE | 12,37 ± 0,32 aG | 11,13 ± 0,12 bC |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 11,87 ± 1,03 bBC | 24,4 ± 0,36 aD | 12,60 ± 0,27 bABC |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 9,33 ± 0,58 cD | 24 ± 0 aD | 12,83 ± 0,29 bABC |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 10,17 ± 0,29 cCD | 26,13 ± 0,15 aB | 12,17 ± 0,29 bABC |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 15,33 ± 1,44 bA | 28,77 ± 0,25 aA | 15,17 ± 0,58 bA |
| <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> | 10,50 ± 0,50 cCD | 25,13 ± 0,23 aC | 11,67 ± 0,29 bBC |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | 13,67 ± 1,15 bAB | 20,57 ± 0,12 aE | 14,17 ± 1,76 bAB |
| <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> | 9,83 ± 0,29 cCD | 25,13 ± 0,06 aC | 14 ± 1,73 bAB |

214 DP: Desvio padrão; Vp: *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802); Vv: *Vibrio vulnificus* (ATCC
215 27562); Va: *Vibrio alginolyticus* (IAL 1957); Letras minúsculas diferentes na mesma linha
216 diferem significativamente (P<0,05) os diâmetros dos halos entre as bactérias patogênicas; letras
217 maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P<0,05) os diâmetros dos
218 halos entre potenciais probióticos.

219

220 Os *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp. que juntos representaram 66,66% das
221 linhagens com atividade antimicrobiana, na sua maioria são bactérias inofensivas e
222 algumas são capazes de estimular o sistema imunológico de peixes, segundo Gatesoupe
223 (2008) e Vijayabaskar e Somasundaram (2008). Esses gêneros fazem parte do grupo de
224 bactérias ácidas lácticas que compõem a microbiota natural de peixes e já são
225 conhecidas por produzirem metabólitos inibitórios, como por exemplo, as bacteriocinas.

226 As linhagens de *Lc. lactis* ssp. *lactis* conferiram atividade antimicrobiana frente
227 aos três vibrios testados, com maior atividade frente a *V. vulnificus*. Sua ação
228 antagonista *in vitro* também foi observada por Balcázar et al. (2007a), quando relataram
229 halos maiores que os descritos nesse estudo (≥ 15 mm) contra *V. anguillarum*. O *Lc.*
230 *lactis* ssp. *lactis* com melhores halos no teste de antagonismo no presente estudo foi
231 utilizado por Silva (2014), em teste *in vivo*, adicionado à ração e fornecido a beijupirás
232 cultivados em sistema de recirculação experimental. O autor observou influência
233 benéfica sobre a sobrevivência, crescimento, peso, fator de conversão alimentar e
234 parâmetros hematológicos desses peixes quando desafiados com *V. parahaemolyticus*.

235 Os resultados observados por Silva (2014) no teste *in vivo*, além de confirmarem a
236 atividade antimicrobiana do *Lc. lactis* subsp. *lactis* observada *in vitro* no presente
237 estudo, demonstraram outros efeitos benéficos ao hospedeiro que o diferencia como
238 potencial probiótico para beijupirá. Para Balcázar et al. (2007b), *Lc. lactis* subsp. *lactis*
239 também é um potencial probiótico para truta marron (*Salmo trutta*), ao observarem
240 modificação da microbiota intestinal do peixe com estímulo da resposta imunológica.

241 Em relação às espécies que representam risco aos humanos, quando consideradas
242 para probiótico é apropriada a investigação da virulência, patogenicidade e resistência
243 antimicrobiana das linhagens em questão, e se necessário, uso da engenharia genética

244 para garantir linhagens seguras à manipulação humana. *E. faecium* já vem sendo testado
245 como probiótico por Abumourad et al. (2014), que comprovaram os efeitos
246 imunoestimulantes e promoção do crescimento em tilápia (*Oreochromis niloticus*)
247 desafiadas com *Aeromonas hydrophila*.

248 Embora 76,92% das espécies identificadas no estudo serem reconhecidas na
249 literatura como probióticos, nem todas apresentaram compostos antibacterianos nos
250 testes de antagonismo, isso porque os probióticos possuem outros mecanismos de ação,
251 não testados neste estudo, que conferem benefícios aos hospedeiros, como a modulação
252 da resposta imune e competição por nutrientes ou pelos mesmos sítios de adesão do
253 patógeno, que independem da produção de substâncias inibitórias (Callaway et al.,
254 2008; Nayak, 2010).

255 Segundo Lallo et al. (2007), apesar do *B. cereus* não apresentar atividade
256 antibacterina frente aos patógenos, foi capaz de atenuar o crescimento de *Aeromonas*
257 *hydrophila* por exclusão competitiva, de acordo com pesquisa *in vitro* e *in vivo* com
258 peixe ornamental, enquanto que o *B. pumilus*, em estudo realizado por Sun et al. (2009),
259 embora não tenha inibido *V. parahaemolyticus*, produziram halos de inibição de
260 $11,1 \pm 0,8$ mm contra *V. alginolyticus*.

261 Estudo da composição microbiana intestinal com atividade antagonista frente a
262 patógenos de peixes também foi estudada no peixe de água doce curimatá
263 (*Prochilodus argenteus*) por Silva et al. (2005). Mesmo em salinidades diferentes do
264 presente estudo, os autores encontraram resultados semelhantes quando detectaram
265 propriedades antibacterianas *in vitro* de *Lc. lactis* frente a *V. alginolyticus* e *V.*
266 *vulnificus*, e de *E. faecium* frente a *V. vulnificus*. As frequências das espécies também
267 foram semelhantes, no entanto o *E. faecium* de curimatá não inibiu *V. alginolyticus*,

268 diferente das linhagens de *E. faecium* isoladas de beijupirá que produziram halos acima
269 de 20 mm.

270 Os estudos relacionados ao uso do probiótico no cultivo de beijupirá são
271 crescentes e traduzem o interesse em compreender a função, eficácia e os riscos do uso
272 dessa alternativa profilática na aquicultura (Xing et al., 2013; Garrido-Pereira et al.,
273 2014). Assim como nesse estudo, autores avaliaram a ação de bactérias com
274 propriedades antimicrobiana frente a *Vibrios* em beijupirá, porém utilizando probióticos
275 comerciais ou bactérias isoladas de outras espécies de peixes ou de camarão (Geng et
276 al., 2011).

277 O intestino do beijupirá compõe bactérias Gram-positivas patogênicas
278 oportunistas para humanos e espécies com atividade antimicrobiana frente à *Vibrios*, que
279 ocorrem independente da influência climática e são potenciais probióticas para beijupirá
280 como alternativa profilática e/ou terapêutica contra vibrioses.

281

282 **Agradecimentos**

283 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao
284 Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
285 Científico e Tecnológico (CNPq) e à Rede de Pesquisa e Desenvolvimento em Piscicultura
286 Marinha (REPIMAR).

287

288 **Referências**

- 289 1. Abumourad IMK, Kenwy AM, Ibrahim TB, Hanna MI, Soliman WS (2014)
290 *Enterococcus faecium* probiotic as a growth promoter and its impact on the
291 expression of the host innate immune in cultured *Oreochromis niloticus*. Res. J.
292 Pharm. Biol. Chem. Sci. 5(2):1747-1761.

- 293 2. Azarin H, Aramli MS, Imanpour MR, Rajabpour M (2015) Effect of a Probiotic
294 Containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* and Ferroin Solution on
295 Growth Performance, Body Composition and Haematological Parameters in Kutum
296 (*Rutilus frisii kutum*) Fry. Probiotics Antimicrob. Proteins. 7(1):31-37.
- 297 3. Bagde US, Bilolikar BV, Pandit RS (2009) Antagonistic Effect of *Bacillus*
298 *Thuringiensis* Sub-Species (H12) on Pathogens of Tilapia Species. Asian J.
299 Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci. 11(4):917-922.
- 300 4. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Calvo AC, Gironés O, Muzquiz JL
301 (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from
302 intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278:188-191.
- 303 5. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Calvo AC, Márquez I, Gironés O,
304 Muzquiz JL (2007b) Changes in intestinal microbiota and humoral immune
305 response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). Br. J.
306 Nutr. 97:522–527.
- 307 6. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Márquez I, Gironés O, Muzquiz
308 JL (2007a) In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds
309 by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet. Microbiol. 122:373–380.
- 310 7. Bocher S, Tønning B, Skov RL, Prag J (2009) *Staphylococcus lugdunensis*, a
311 Common Cause of Skin and Soft Tissue Infections in the Community. J. Clin.
312 Microbiol. 47(4):946–950.
- 313 8. Bottone EJ (2010) *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. J. Clin. Microbiol.
314 23(2):382–398.

- 315 9. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Harvey RB, Genovese KJ, Kennedy
316 CN, Venn DW, Nisbet DJ (2008) Probiotics, prebiotics and competitive exclusion
317 for prophylaxis against bacterial disease. *Anim. Health Res. Rev.* 9(2):217–225.
- 318 10. Cavalli RO, Domingues EC, Hamilton S (2011) Desenvolvimento da produção de
319 peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. *R. Bras. Zootec.*
320 40:151-164.
- 321 11. Duarte S, Silva FCP, Zauli DAG, Nicoli JR, Araújo FG (2014) Gram-negative
322 intestinal indigenous microbiota from two Siluriform fishes in a tropical reservoir.
323 *Braz. J. Microbiol.* 45(3):1283-1292.
- 324 12. Ferreira AHC, Araripe MNBA, Monteiro CAB, Lopes JB, Araripe HGA (2012) Uso
325 de Probióticos na Aquicultura – Revisão. *Revista Eletrônica Nutritime* 176,
326 9(5):1965–1980.
- 327 13. Figueiredo HCP, Leal CAG (2008) Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *R.*
328 *Bras. Zootec.* 37:08-14.
- 329 14. Garrido-Pereira MA, Schwarz M, Delbos B, Rodrigues RV, Romano L, Sampaio L
330 (2014) Probiotic effects on cobia *Rachycentron canadum* larvae reared in a
331 recirculating aquaculture system. *LAJAR* 42(5):1169-1174.
- 332 15. Gatesoupe FJ (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming:
333 natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*
334 14:107-114.
- 335 16. Geng X, Dong XH, Tan BP, Yang QH, Chi SY, Liu HY, Liu XQ (2011) Effects of
336 dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific
337 immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish*
338 *Immun.* 31(3):400-406.

- 339 17. Hajar S, Hamid THTA (2013) Isolation of lactic acid bacteria strain *Staphylococcus*
340 *piscifermentans* from Malaysian traditional fermented shrimp cinaluk. Int. Food.
341 Res. J. 20(1):125-129.
- 342 18. Heo WS, Kim YR, Kim EY, Bai SC, Kong IS (2013) Effects of dietary probiotic,
343 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune
344 response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 376–379:20–24.
- 345 19. Kumari A, Kumar A, Kumar S (2014) Increase in growth and haematological
346 parameters by *Bacillus licheniformis* dietary supplementation to climbing perch,
347 *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). Int. J. Fish. Aquat. Stud. 2(2): 215-219.
- 348 20. Lallo R, Ramchuran S, Ramduth D, Gorgens J, Gardiner N (2007) Isolation and
349 selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water
350 quality in culture of ornamental fish. J. Appl. Microbiol. 103:1471–1479.
- 351 21. Li J, Xu Y, Jin L, Li X (2015) Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1
352 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea
353 cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). Aquac. Res. 46:3008–3019.
- 354 22. Liu PC, Lin JY, Chuang WH, Lee KK (2004) Isolation and characterization of
355 pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish
356 *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. World J. Microb. Biot.
357 20(5):495–499.
- 358 23. Machen JW (2008) *Vibrio* spp. disinfection and immunization of cobia
359 (*Rachycentron canadum*) for the prevention of disease in aquaculture facilities.
360 United States, 98p. (Thesis. Master. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and
361 State University).

- 362 24. Mclean E, Salze G, Craig SR (2008) Parasites, diseases and deformities of cobia.
363 Ribarstvo: CJF 66(1):1-16.
- 364 25. Mmanda FP, Zhou S, Zhang J, Zheng X, An S, Wang G (2014) Massive mortality
365 associated with *Streptococcus iniae* infection in cage-cultured red drum (*Sciaenops*
366 *ocellatus*) in Eastern China. Afr. J. Microbiol. Res. 8(16):1722-729.
- 367 26. Nayak SK (2010) Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shellfish
368 Immunol. 29(1):2-14.
- 369 27. Neiffer DL, Stamper MA (2009) Fish sedation, anesthesia, analgesia, and
370 euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs. ILAR J. 50(4):343-360.
- 371 28. Rameshkumar P, Kalidas C, Tamilmani G, Sakthivel M, Nazar AKA, Maharshi VA,
372 Rao SKS, Gopakumar G (2014) Microbiological and histopathological
373 investigations of *Vibrio alginolyticus* infection in cobia, *Rachycentron canadum*
374 (Linnaeus, 1766) cultured in sea cage. Indian J. Fish. 61(1):124-127.
- 375 29. Reneshwary C, Rajalakshmi M, Marimuthu K, Xavier R (2011) Dietary
376 administration of *Bacillus thuringiensis* on thr cellular innate immune response of
377 African catfish (*Clarias gariepinus*) against *Aeromonas hydrophila*. Eur. Rev. Med.
378 Pharmacol. Sci. 15:53-60.
- 379 30. Román L, Padilla D, Acosta F, Sorroza L, Fátima E, Déniz S, Grasso V, Bravo J,
380 Real F (2015) The effect of probiotic *Enterococcus gallinarum* L-1 on the innate
381 immune parameters of outstanding species to marine aquaculture. J. Appl. Anim.
382 Res. 43(2):177–183.
- 383 31. Romero J, Feijoó CG, Navarrete P (2012) Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse
384 and Alternatives. In: Carvalho, E.D.; David, G.S.; Silva, R. (Ed.) Health and
385 Environment in Aquaculture. InTech, 159-198.

- 386 32. Sampaio LA, Moreira CB, Miranda-Filho KC, Rombenso AN (2011) Culture of
387 cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the Brazilian coast. *Aquac.*
388 *Res.*, v. 42(6):832-834.
- 389 33. Sarra M, Taoufik G, Patrick LC, Benjamin B, Yannick F, Khaled H (2013) Isolation
390 and Characterization of Enterococci Bacteriocin Strains from Tunisian Fish
391 Viscera. *J Nutr. Food Sci.* 4(6):701-708.
- 392 34. Savay-da-Silva LK (2015) Produção de beijupirá (*Rachycentron canadum*) visando
393 a rastreabilidade - parâmetros de qualidade ambiental; físico-químicos e
394 microbiológicos da espécie. São Paulo, Brasil, 174p (Tese. Doutorado. Centro de
395 Energia Nuclear na Agricultura. USP).
- 396 35. Schaik WV, Top J, Riley DR, Boekhorst J, Vrijenhoek JEP, Schapendonk CME,
397 Hendrickx APA, Nijman IJ, Bonten MJM, Tettelin H, Willems RJL (2010)
398 Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen
399 *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island.
400 *BMC Genomics* 11(239):1-18.
- 401 36. Schoeni JL, Wong AC (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food*
402 *Prot.* 68(3):636-648.
- 403 37. Silva FCP, Brito MFG, Farias LM, Nicoli JR (2005) Composition and antagonistic
404 activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J.*
405 *Fish Biol.* 67:1686-1698.
- 406 38. Silva, ADR (2014) Aplicação de bactérias probióticas, em dietas para juvenis de
407 beijupirá cultivados em sistema de recirculação. Recife, Brasil, 82 p (Tese.
408 Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. UFRPE).

- 409 39. Sorroza L, Padilla D, Acosta F, Roma L, Grasso V, Vega J, Real F (2012)
410 Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of
411 European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*.
412 Vet. Microbiol. 155:369–373.
- 413 40. Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP,
414 Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS (2006) Isolation of a
415 *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory
416 to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. Antimicrob. Agents
417 Chemother. 50(9):3111-3116.
- 418 41. Subharanjani S, Prema P, Immanuel G. Supplementation of *B. cereus* as Probiotic in
419 Fish Feed of *Trichogaster trichopterus* (Blue Gourami) and Calculating its Growth
420 and Survival. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 4(12):744-751.
- 421 42. Sun Y, Yang H, Ling Z, Chang J, Ye J (2009) Gut microbiota of fast and slow
422 growing grouper *Epinephelus coioides*. Afr. J. Microbiol. Res. 3(11):713-720.
- 423 43. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as
424 biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(4):655-671.
- 425 44. Vijayabaskar P, Somasundaram ST (2008) Isolation of bacteriocin producing lactic
426 acid from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen
427 *Aeromonas hydrophila*. Biotechnology 7(1):124.
- 428 45. Xing CF, Hu HH, Huang JB, Fang HC, Kai YH, Wu YC, Chi SC (2013) Diet
429 supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*)
430 enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. Fish
431 Shellfish Immun. 35(4):1122-1128.

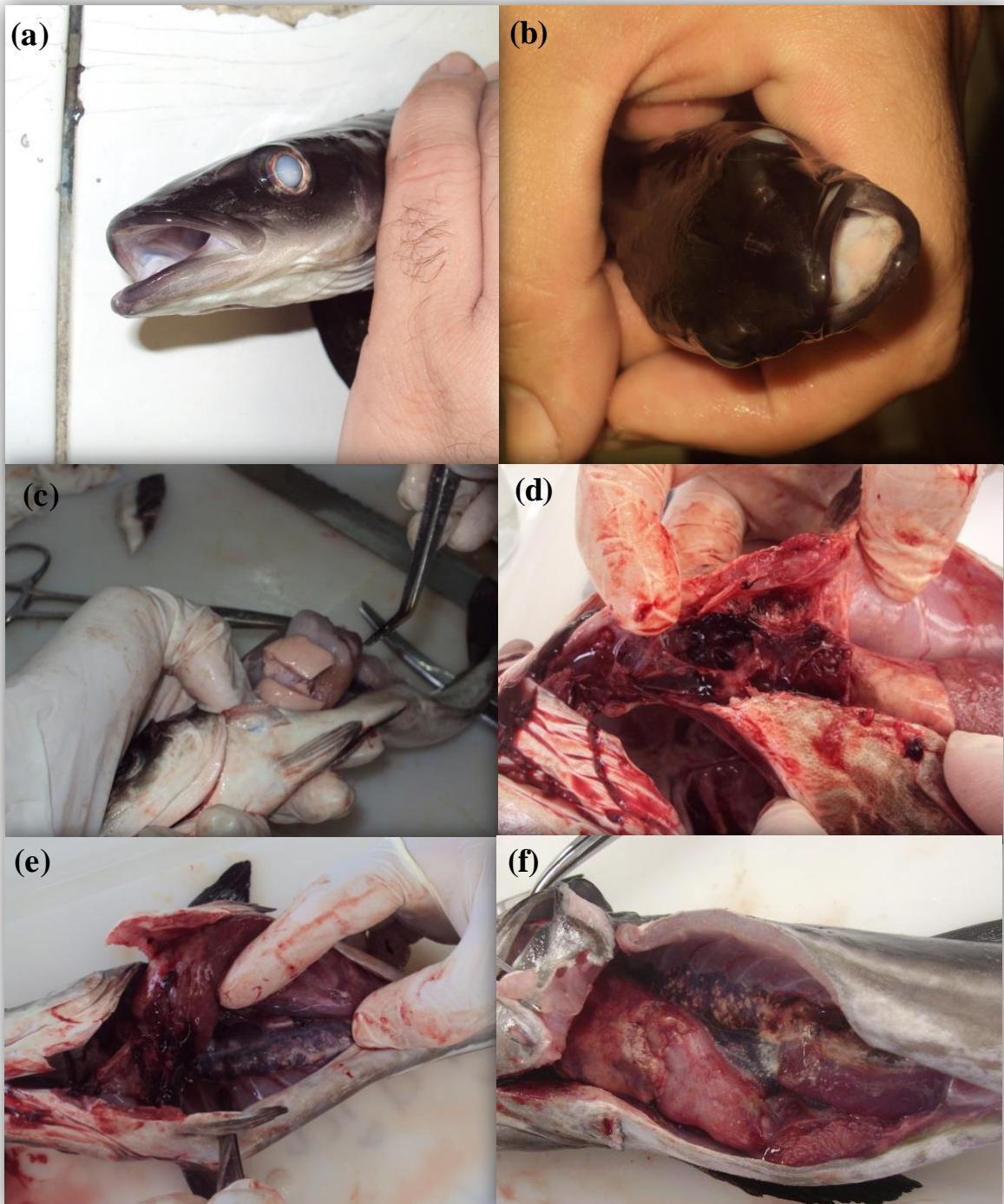
- 432 46. Yang HL, Xia HQ, Ye YD, Zou WC, Sun YZ (2014) Probiotic *Bacillus pumilus*
433 SE5 shapes the intestinal microbiota and mucosal immunity in grouper *Epinephelus*
434 *coioides*. Dis. Aquat. Org. 111(2):119-127.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O intestino do beijupirá compõe uma diversificada microbiota que inclui bactérias Gram-negativas potencialmente patogênicas para animais aquáticos e humanos, com elevadas taxas de multirresistência aos antimicrobianos testados, Gram-positivas patogênicas oportunistas para humanos e bactérias com atividade antimicrobiana frente à *Vibrio*. As espécies patogênicas representam desafio à sanidade do peixe cultivado, preocupação com a disseminação de resistência no meio ambiente, e risco a saúde de piscicultores e população humana consumidora. As espécies com propriedades antibacterianas são consideradas probióticas para outras espécies de peixes, e a partir desse estudo podem ser consideradas em formulações de um probiótico para beijupirá, como alternativa profilática e/ou terapêutica contra vibrioses.

7. APÊNDICES

Apêndice A Lesões externas e internas em beijupirá



Lesões externas em beijupirá (a) Opacidade de córnea, (b) Deformidade mandibular; **Lesões internas** (c) Fígado anêmico, (d) Sinéquias pericárdicas, (e) e (f) Cálculos renais ou nefrocalcinose.

Apêndice B

Sequenciamento do gene rRNA 16S

Tabela 1. Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene rRNA 16S extraído de bactérias Gram-negativas isoladas do intestino de beijupirá cultivado.

| Espécie | BLAST - NCBI | | | | | | | | | |
|--|--|----------------|------------|------------|------|--------|-----------------|-----|----------------|------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Aeromonas hydrophila YL17, complete genome Sequence ID: gb CP007518.1 Length: 4806266 Number of Matches: 10 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 339100 to 340532 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2625 bits(1421)</td> <td>0.0</td> <td>1427/1433(99%)</td> <td>0/1433(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Features: chemotaxis protein CheV rRNA-16S ribosomal RNA</p> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2625 bits(1421) | 0.0 | 1427/1433(99%) | 0/1433(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2625 bits(1421) | 0.0 | 1427/1433(99%) | 0/1433(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | Chromobacterium violaceum strain 968 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb HM449690.1 Length: 1474 Number of Matches: 1 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 64 to 1474 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2599 bits(1407)</td> <td>0.0</td> <td>1409/1411(99%)</td> <td>0/1411(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2599 bits(1407) | 0.0 | 1409/1411(99%) | 0/1411(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2599 bits(1407) | 0.0 | 1409/1411(99%) | 0/1411(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Enterobacter cloaca</i> | Enterobacter cloacae strain RPR-CCFL3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KR611993.1 Length: 1511 Number of Matches: 1 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 32 to 1451 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2577 bits(1395)</td> <td>0.0</td> <td>1409/1420(99%)</td> <td>2/1420(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2577 bits(1395) | 0.0 | 1409/1420(99%) | 2/1420(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2577 bits(1395) | 0.0 | 1409/1420(99%) | 2/1420(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Enterobacter ludwigii</i> | Enterobacter ludwigii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: AF13 Sequence ID: dbj L_C015543.1 Length: 1442 Number of Matches: 1 ▶ See 1 more title(s) | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 6 to 1405 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2542 bits(1376)</td> <td>0.0</td> <td>1388/1400(99%)</td> <td>0/1400(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2542 bits(1376) | 0.0 | 1388/1400(99%) | 0/1400(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2542 bits(1376) | 0.0 | 1388/1400(99%) | 0/1400(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Enterobacter sp.</i> | Enterobacter sp. SR19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KF896099.1 Length: 1454 Number of Matches: 1 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 14 to 1446 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2606 bits(1411)</td> <td>0.0</td> <td>1422/1433(99%)</td> <td>0/1433(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2606 bits(1411) | 0.0 | 1422/1433(99%) | 0/1433(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2606 bits(1411) | 0.0 | 1422/1433(99%) | 0/1433(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | Escherichia coli strain SF-166, complete genome Sequence ID: gb CP012633.1 Length: 4910962 Number of Matches: 7 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 4733687 to 4735116 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2623 bits(1420)</td> <td>0.0</td> <td>1425/1430(99%)</td> <td>0/1430(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2623 bits(1420) | 0.0 | 1425/1430(99%) | 0/1430(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2623 bits(1420) | 0.0 | 1425/1430(99%) | 0/1430(0%) | Plus/Minus | | | | | | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Klebsiella oxytoca DNA, complete genome, strain: JKo3 Sequence ID: dbj AP014951.1 Length: 5944658 Number of Matches: 8 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 224269 to 225694 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2579 bits(1396)</td> <td>0.0</td> <td>1411/1426(99%)</td> <td>0/1426(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2579 bits(1396) | 0.0 | 1411/1426(99%) | 0/1426(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2579 bits(1396) | 0.0 | 1411/1426(99%) | 0/1426(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>ssp. pneumoniae</i> | Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain ATCC 43816 KPPR1, complete genome Sequence ID: gb CP009208.1 Length: 5374834 Number of Matches: 8 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 2377249 to 2378681 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2610 bits(1413)</td> <td>0.0</td> <td>1424/1433(99%)</td> <td>1/1433(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Features: rRNA-16S ribosomal RNA</p> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2610 bits(1413) | 0.0 | 1424/1433(99%) | 1/1433(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2610 bits(1413) | 0.0 | 1424/1433(99%) | 1/1433(0%) | Plus/Minus | | | | | | |
| <i>Klebsiella spp.</i> | Klebsiella sp. GR9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb DQ100465.1 Length: 1453 Number of Matches: 1 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 23 to 1442 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2571 bits(1392)</td> <td>0.0</td> <td>1407/1420(99%)</td> <td>1/1420(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2571 bits(1392) | 0.0 | 1407/1420(99%) | 1/1420(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2571 bits(1392) | 0.0 | 1407/1420(99%) | 1/1420(0%) | Plus/Plus | | | | | | |
| <i>Morganella morganii</i> | Morganella morganii subsp. morganii KT 16S ribosomal RNA, complete sequence Sequence ID: ref NR_102517.1 Length: 1531 Number of Matches: 1 | | | | | | | | | |
| | <p>Range 1: 49 to 1484 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2630 bits(1424)</td> <td>0.0</td> <td>1431/1436(99%)</td> <td>1/1436(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2630 bits(1424) | 0.0 | 1431/1436(99%) | 1/1436(0%) |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | |
| 2630 bits(1424) | 0.0 | 1431/1436(99%) | 1/1436(0%) | Plus/Plus | | | | | | |

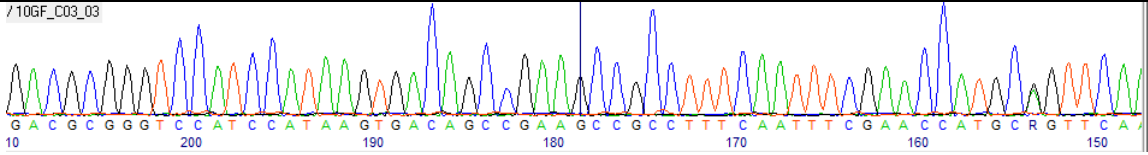
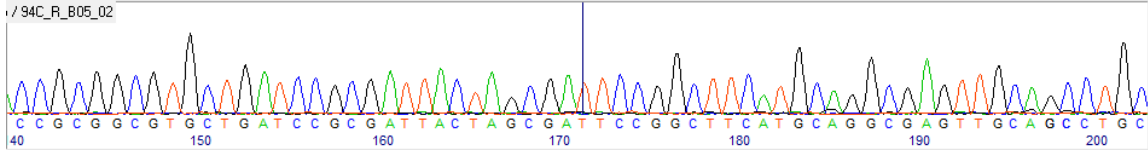
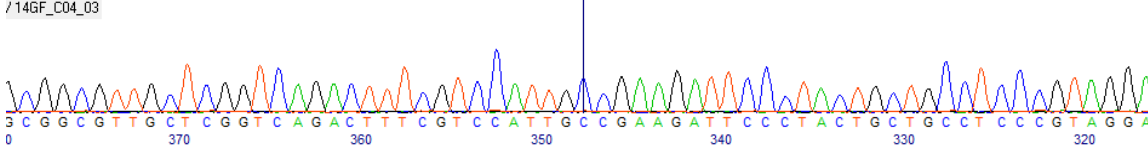
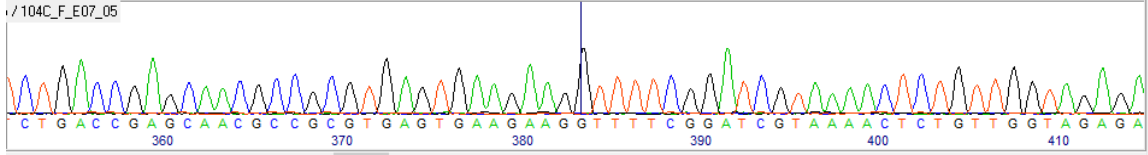
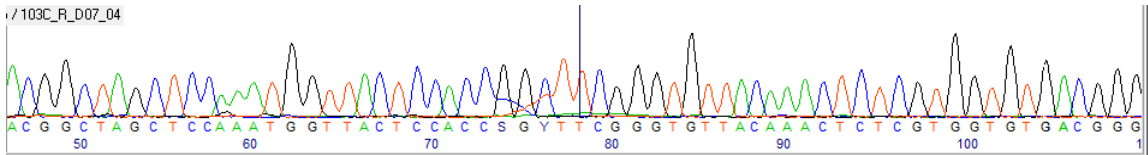
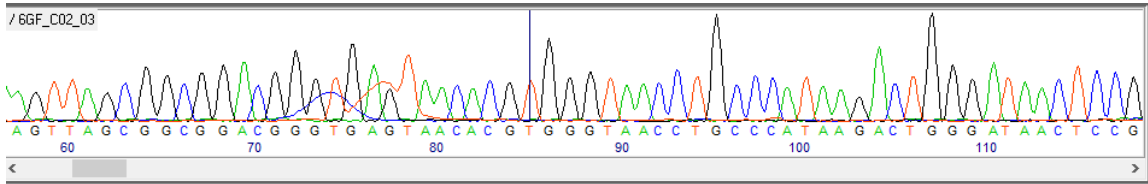
| <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> | <p>Photobacterium damsela subsp. damsela gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 04Ya311 Sequence ID: dbjAB571870.1 Length: 1512 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 46 to 1494 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2665 bits(1443)</td> <td>0.0</td> <td>1446/1449(99%)</td> <td>0/1449(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2665 bits(1443) | 0.0 | 1446/1449(99%) | 0/1449(0%) | Plus/Plus |
|---|--|----------------|------------|------------|------|--------|-----------------|-----|----------------|------------|------------|
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2665 bits(1443) | 0.0 | 1446/1449(99%) | 0/1449(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i> | <p>Plesiomonas shigelloides strain NCIMB 9242 16S ribosomal RNA gene, complete sequence Sequence ID: reflNR_044827.1 Length: 1499 Number of Matches: 1 ▶ See 2 more title(s)</p> <p>Range 1: 48 to 1482 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2630 bits(1424)</td> <td>0.0</td> <td>1431/1436(99%)</td> <td>1/1436(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2630 bits(1424) | 0.0 | 1431/1436(99%) | 1/1436(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2630 bits(1424) | 0.0 | 1431/1436(99%) | 1/1436(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <p>Proteus mirabilis strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KC344360.1 Length: 1530 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 50 to 1482 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2632 bits(1425)</td> <td>0.0</td> <td>1429/1433(99%)</td> <td>0/1433(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2632 bits(1425) | 0.0 | 1429/1433(99%) | 0/1433(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2632 bits(1425) | 0.0 | 1429/1433(99%) | 0/1433(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Proteus penneri</i> | <p>Proteus penneri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 105705 Sequence ID: dbj AB682277.1 Length: 1468 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 28 to 1465 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2639 bits(1429)</td> <td>0.0</td> <td>1435/1438(99%)</td> <td>0/1438(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2639 bits(1429) | 0.0 | 1435/1438(99%) | 0/1438(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2639 bits(1429) | 0.0 | 1435/1438(99%) | 0/1438(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Providencia stuartii</i> | <p>Providencia stuartii strain FDHR1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KT216580.1 Length: 1465 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 36 to 1464 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2628 bits(1423)</td> <td>0.0</td> <td>1426/1429(99%)</td> <td>0/1429(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2628 bits(1423) | 0.0 | 1426/1429(99%) | 0/1429(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2628 bits(1423) | 0.0 | 1426/1429(99%) | 0/1429(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | <p>Pseudomonas sp. K2DN344 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KT308224.1 Length: 1500 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 63 to 1469 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2540 bits(1375)</td> <td>0.0</td> <td>1391/1407(99%)</td> <td>0/1407(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2540 bits(1375) | 0.0 | 1391/1407(99%) | 0/1407(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2540 bits(1375) | 0.0 | 1391/1407(99%) | 0/1407(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | <p>Vibrio alginolyticus NBRC 15630 = ATCC 17749 chromosome 1, complete sequence Sequence ID: gb CP006718.1 Length: 3334467 Number of Matches: 10</p> <p>Range 1: 1955985 to 1957351 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2398 bits(1298)</td> <td>0.0</td> <td>1334/1367(98%)</td> <td>0/1367(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Features: rRNA-16S ribosomal RNA</p> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2398 bits(1298) | 0.0 | 1334/1367(98%) | 0/1367(0%) | Plus/Minus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2398 bits(1298) | 0.0 | 1334/1367(98%) | 0/1367(0%) | Plus/Minus | | | | | | | |
| <i>Vibrio</i> spp. | <p>Vibrio sp. QY20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KP676705.1 Length: 1430 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 208 to 1255 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1842 bits(997)</td> <td>0.0</td> <td>1023/1048(98%)</td> <td>0/1048(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 1842 bits(997) | 0.0 | 1023/1048(98%) | 0/1048(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 1842 bits(997) | 0.0 | 1023/1048(98%) | 0/1048(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |

Tabela 2. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene rRNA 16S extraído de bactérias Gram-positivas isoladas do intestino de beijupirá cultivado.

| Espécie | BLAST - NCBI | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------------|------------|------------|------|--------|-----------------|-----|----------------|------------|------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | <p>Bacillus cereus strain GD15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KF928771.1 Length: 1513 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 48 to 1496 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2669 bits(1445)</td> <td>0.0</td> <td>1447/1449(99%)</td> <td>0/1449(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2669 bits(1445) | 0.0 | 1447/1449(99%) | 0/1449(0%) | Plus/Minus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2669 bits(1445) | 0.0 | 1447/1449(99%) | 0/1449(0%) | Plus/Minus | | | | | | | |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | <p>Bacillus licheniformis strain APT40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KC519412.1 Length: 1453 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 3 to 1442 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2619 bits(1418)</td> <td>0.0</td> <td>1429/1440(99%)</td> <td>0/1440(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2619 bits(1418) | 0.0 | 1429/1440(99%) | 0/1440(0%) | Plus/Minus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2619 bits(1418) | 0.0 | 1429/1440(99%) | 0/1440(0%) | Plus/Minus | | | | | | | |

| <i>Bacillus pumilus</i> | <p>Bacillus pumilus strain ML568 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KC692176.1 Length: 1489 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 16 to 1464 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2665 bits(1443)</td> <td>0.0</td> <td>1446/1449(99%)</td> <td>0/1449(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2665 bits(1443) | 0.0 | 1446/1449(99%) | 0/1449(0%) | Plus/Plus |
|---|---|----------------|------------|------------|------|--------|-----------------|-----|----------------|------------|------------|
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2665 bits(1443) | 0.0 | 1446/1449(99%) | 0/1449(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Bacillus safensis</i> | <p>Bacillus safensis strain OU93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KR140378.1 Length: 1474 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 29 to 1471 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2651 bits(1435)</td> <td>0.0</td> <td>1439/1443(99%)</td> <td>0/1443(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2651 bits(1435) | 0.0 | 1439/1443(99%) | 0/1443(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2651 bits(1435) | 0.0 | 1439/1443(99%) | 0/1443(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Bacillus</i> spp. | <p>Bacillus sp. FJAT-22379 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KP728958.1 Length: 1452 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 7 to 1446 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2656 bits(1438)</td> <td>0.0</td> <td>1439/1440(99%)</td> <td>0/1440(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2656 bits(1438) | 0.0 | 1439/1440(99%) | 0/1440(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2656 bits(1438) | 0.0 | 1439/1440(99%) | 0/1440(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | <p>Bacillus thuringiensis strain S3-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KJ496381.1 Length: 1539 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 50 to 1494 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2658 bits(1439)</td> <td>0.0</td> <td>1442/1445(99%)</td> <td>0/1445(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2658 bits(1439) | 0.0 | 1442/1445(99%) | 0/1445(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2658 bits(1439) | 0.0 | 1442/1445(99%) | 0/1445(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Brevibacillus borstelensis</i> | <p>Brevibacillus borstelensis strain NBRC 15714 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: ref NR_113799.1 Length: 1461 Number of Matches: 1 ▶ See 1 more title(s)</p> <p>Range 1: 28 to 1460 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2636 bits(1427)</td> <td>0.0</td> <td>1430/1433(99%)</td> <td>0/1433(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2636 bits(1427) | 0.0 | 1430/1433(99%) | 0/1433(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2636 bits(1427) | 0.0 | 1430/1433(99%) | 0/1433(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Enterococcus faecium</i> | <p>Enterococcus faecium strain AT15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KP137385.1 Length: 1555 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 51 to 1504 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2678 bits(1450)</td> <td>0.0</td> <td>1452/1454(99%)</td> <td>0/1454(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2678 bits(1450) | 0.0 | 1452/1454(99%) | 0/1454(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2678 bits(1450) | 0.0 | 1452/1454(99%) | 0/1454(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | <p>Enterococcus gallinarum strain FUA3375 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb JN102572.1 Length: 1472 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 9 to 1459 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2673 bits(1447)</td> <td>0.0</td> <td>1449/1451(99%)</td> <td>0/1451(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2673 bits(1447) | 0.0 | 1449/1451(99%) | 0/1451(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2673 bits(1447) | 0.0 | 1449/1451(99%) | 0/1451(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Enterococcus</i> spp. | <p>Enterococcus sp. w17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: gb KP198609.1 Length: 1474 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 11 to 1467 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2684 bits(1453)</td> <td>0.0</td> <td>1456/1457(99%)</td> <td>1/1457(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2684 bits(1453) | 0.0 | 1456/1457(99%) | 1/1457(0%) | Plus/Minus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2684 bits(1453) | 0.0 | 1456/1457(99%) | 1/1457(0%) | Plus/Minus | | | | | | | |
| <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> | <p>Lactococcus lactis subsp. lactis MR17 16S ribosomal RNA gene, complete sequence Sequence ID: gb AF493058.1 Length: 1542 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 52 to 1492 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2639 bits(1429)</td> <td>0.0</td> <td>1437/1441(99%)</td> <td>1/1441(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2639 bits(1429) | 0.0 | 1437/1441(99%) | 1/1441(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2639 bits(1429) | 0.0 | 1437/1441(99%) | 1/1441(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | <p>Staphylococcus lugdunensis N920143 complete genome Sequence ID: emb FR870271.1 Length: 2595888 Number of Matches: 5</p> <p>Range 1: 2424017 to 2425461 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2654 bits(1437)</td> <td>0.0</td> <td>1441/1445(99%)</td> <td>0/1445(0%)</td> <td>Plus/Minus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2654 bits(1437) | 0.0 | 1441/1445(99%) | 0/1445(0%) | Plus/Minus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2654 bits(1437) | 0.0 | 1441/1445(99%) | 0/1445(0%) | Plus/Minus | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus piscifermentans</i> | <p>Staphylococcus piscifermentans strain CIP103958 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: ref NR_116436.1 Length: 1516 Number of Matches: 1 ▶ See 1 more title(s)</p> <p>Range 1: 49 to 1494 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2656 bits(1438)</td> <td>0.0</td> <td>1443/1446(99%)</td> <td>1/1446(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> | Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | 2656 bits(1438) | 0.0 | 1443/1446(99%) | 1/1446(0%) | Plus/Plus |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | | | | | | | |
| 2656 bits(1438) | 0.0 | 1443/1446(99%) | 1/1446(0%) | Plus/Plus | | | | | | | |

Tabela 3. Parte dos cromatogramas provenientes de sequenciamento do gene rRNA 16S extraído de bactérias potenciais probióticas isoladas do intestino de beijupirá, *Rachycentron canadum*.

| Espécie | Cromatograma |
|---|---|
| <i>Bacillus</i> spp. |  <p>10GF_C03_03</p> |
| <i>Enterococcus faecium</i> |  <p>94C_R_B05_02</p> |
| <i>Enterococcus</i> spp. |  <p>14GF_C04_03</p> |
| <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> |  <p>104C_F_E07_05</p> |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> |  <p>103C_R_D07_04</p> |
| <i>Staphylococcus piscifermentans</i> |  <p>6GF_C02_03</p> |

8. ANEXO - Normas para publicação no *Brazilian Journal Microbiology*



ISSN 1517-8382 *versão impressa*

ISSN 1678-4405 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Escopo da revista
- Submissão de um artigo
- Publicação do artigo
- Preparo do artigo

Escopo da revista

A partir do dia 01/01/2015 o Brazilian Journal of Microbiology (BJM) aceitará manuscritos que versem sobre genoma de microrganismo sequenciado recentemente. Eles serão publicados na seção "Genome Announcement". O objetivo desta seção é permitir que autores do sequenciamento informem aos leitores do BJM sobre um genoma que está disponível e qual seria o interesse para a comunidade científica. O publicação não impedirá a futura publicação de um artigo científico completo no BJM ou em outra revista.

Escopo da seção "Genome Announcement" no BJM:

- Os autores da publicação deverão ser os mesmos ou na sua maioria dos contidos no depósito da sequência do genoma;
- A sequência do genoma deve estar disponível para o público no DDBJ / EMBL / NCBI dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no momento do envio do manuscrito para o BJM. O número de acesso válido no GenBank para o genoma, deve ser claramente indicado no manuscrito;
- As sequências completas de plasmídeos circulares serão aceitas sem lacunas;
- As sequências de nucleotídeos que se refere o "announcement", deve cobrir pelo menos 95% do tamanho do genoma esperado para o organismo;
- Serão considerados para publicação depósitos completos feitos no GenBank e gapped cromossomos (scaffolded) do genoma. Para tais depósitos é preferível ter uma anotação funcional.
- O manuscrito enviado para a seção "Genome Announcement" deve conter no máximo 500 palavras no corpo do texto e um resumo de 150 palavras;
- Os autores devem indicar claramente a origem da cepa microbiana, a importância de ter sequenciado o genoma e os benefícios que o campo da microbiologia.
- O texto deve conter a metodologia utilizada no sequenciamento, incluindo o número e tamanho das leituras geradas, métodos de montagem utilizado, as medidas tomadas para gerar os scaffolds e para fechar o genoma, quando aplicável. Além disso, informar quais métodos serão utilizados para anotação e curadoria se for o caso.

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

É um prazer aceitar o seu trabalho para ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia. No entanto, só será publicada uma vez revisada a versão final do texto em Inglês. Por favor, envie o texto revisado e o certificado emitido pelo " American Journal Experts ".

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

SEÇÕES

Microbiologia Industrial:

Fermentação Bacteriana

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.
- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

Fermentação Fúngica

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

Microbiologia de Alimentos:

Tecnologia de Alimentos

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

Segurança e Qualidade dos alimentos

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

Microbiologia Médica:

Patogênese Bacteriana

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

Patogenicidade de Fungos

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

Microbiologia Clínica:**Bacteriologia**

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

Micologia

- Estudos sobre fungos de importância médica.

Virulogia

- Estudos sobre vírus de importância médica.

Microbiologia Ambiental:**Ecologia Microbiana**

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

Biotecnologia

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

Fisiologia de Fungos

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Fisiologia de Bactérias

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Genética e Biologia Molecular de Fungos

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Bactérias

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Vírus

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Microbiologia Veterinária

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnóstico de patógenos de animais
- Patógenos veterinários ou zoonóticos

Ensino de Microbiologia

- Estratégias de ensino em microbiologia
- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados sequencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br

- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo. Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

a. **Artigos de Periódicos**

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.

b. **Artigos ou Capítulos de Livro**

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens.* Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.

c. **Livros**

Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction.* ASM Press, Washington, D.C.

d. **Patentes**

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. **Teses e Dissertações**

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. **Publicações na Web**

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. **Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas sequencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve

ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas sequencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título do Artigo: " _____ "

Nome(s) do(s) Autor(es): _____

Assinatura(s): _____

Data: ____/____/____