UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQÜICULTURA

Isolamento, cultivo e identificação de bactérias com potencial uso probiótico no cultivo de organismos aquáticos: Estudo de caso com bactérias do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839)

FABIO FELIPE GABRIEL ROSELET

FURG
RIO GRANDE, RS.
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQÜICULTURA

Isolamento, cultivo e identificação de bactérias com potencial uso probiótico no cultivo de organismos aquáticos: Estudo de caso com bactérias do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839)

Fabio Felipe Gabriel Roselet

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura no Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Abreu
Co-Orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

Rio Grande - RS - Brasil
Julho, 2008

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS ..... **IV**

RESUMO ..... **V**

ABSTRACT ..... **VI**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1. A TEORIA DE THOMAS MALTHUS 1
1.2. A TRAGÉDIA DOS COMUNS 1
1.3. O ADVENTO DA AQÜICULTURA E O USO DE ANTIBIÓTICOS 2
1.4. CONCEITO DE PROBIÓTICO 3
1.5. PROBIÓTICOS COMERCIAIS EXÓTICOS 5
1.6. PROBIÓTICOS NATIVOS 6

2. OBJETIVOS **7**

2.1. OBJETIVO GERAL 7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 7

3. MATERIAL E MÉTODOS **8**

3.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO 8
3.2. RETIRADA DO TRATO GASTROINTESTINAL 8
3.3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS 9
3.4. MEIOS DE CULTIVO 10
3.5. SEMEADURA DAS AMOSTRAS 10
3.6. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS 11
3.7. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS MORFOTIPOS 11
3.8. COLEÇÃO DE ISOLADOS 12
3.9. EXTRAÇÃO DO DNA 13
3.10. QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO 14
3.11. PUREZA DO DNA EXTRAÍDO 15
3.12. AMPLIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO 16
3.13. ELETROFORESE E ESTIMATIVA DO PESO MOLECULAR 17
3.14. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR 18
3.15. REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO 18
3.16. PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO 19
3.17. SEQÜENCIAMENTO 19
3.18. EDIÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS 20
3.19. OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA CONSENSO 21
3.20. COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA COM O GENBANK E O RIBOSSOMAL DATABASE PROJECT 22
3.21. CONSTRUÇÃO DOS FENOGRAMAS 22

4. RESULTADOS **24**

4.1. CRESCIMENTO BACTERIANO 24
4.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO 26
4.3. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS 27

5. DISCUSSÃO **36**

6. CONCLUSÕES **45**

7. PERSPECTIVAS **46**

8. SUGESTÕES METODOLÓGICAS **49**

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **50**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cesar Abreu, pela oportunidade em poder desenvolver este trabalho sob sua orientação. Também agradeço pela atenção e paciência durante os momentos finais da redação.

Ao Prof. Dr. Fabiano Thompson pela oportunidade em fazer parte de sua excelente equipe durante cinco meses enquanto realizava parte deste trabalho sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Luís Sampaio pela oportunidade em trabalhar com os linguados cultivados na Estação Marinha de Aquacultura.

Ao Prof. M.Sc. Marcelo Okamoto e à Biol. Vanessa Britto pela ajuda nas inúmeras tentativas dos testes *in vivo* com as larvas recém eclodidas.

À Profª. Drª. Ana Carolina Paulo Vicente do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro pelo seqüenciamento das amostras.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Lemos Miguel do Departamento de Microbiologia Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo empréstimo do meio de cultivo.

À Profª. Drª. Lúcia Martins Teixeira do Departamento de Microbiologia Médica pelas cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Enterococcus faecium* ATCC 19434.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microrganismos Marinhos (a lista é longa...) por estes quase três anos de convivência.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana que me acolheram tão bem durante a minha estada na UFRJ. Agradeço a vocês pela amizade e pela ajuda prestada em todas as etapas deste trabalho. Em especial aos amigos Nelson (me desculpe pelas dúvidas!), Anderson, Bruno, Oswaldo e Rodrigo. Um grande abraço para o Itamar! Me desculpem pelo fedor das minhas bactérias!

E por último agradeço às duas pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe e minha namorada “Thai”. Obrigado por existirem!

RESUMO

Por definição, organismos probióticos são aqueles que melhoram a saúde do hospedeiro, seja auxiliando na digestão do alimento e na assimilação de nutrientes, estimulando o sistema imunológico, ou atuando no controle de microrganismos patogênicos. No entanto, o uso de probióticos comerciais apresenta riscos para a saúde dos animais cultivados e para o meio ambiente que precisam ser considerados. Bactérias utilizadas em produtos comerciais podem apresentar genes de resistência a antibióticos, que podem ser transferidos para microrganismos patogênicos presentes no ambiente de cultivo. Desta forma, o isolamento de linhagens do próprio hospedeiro seria uma alternativa parar solucionar este problema. O objetivo deste trabalho foi isolar, cultivar e identificar bactérias, com potencial uso probiótico em cultivo de animais aquáticos. Neste estudo as bactérias foram obtidas a partir do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) cultivado na Estação Marinha de Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. Diluições de material extraído do trato gastrointestinal foram semeadas em quatro meios de cultivo (TCBS, MRS, MA e NA), incubadas e as colônias foram isoladas e purificadas. Os valores de UFC foram baixos (10^4 UFC ml^{-1}) devido, provavelmente, ao longo período decorrido entre a coleta dos tratos intestinais e semeadura das bactérias, ou devido ao transporte deste material no gelo. Apesar disso, foram isoladas 94 bactérias, cujas colônias se apresentaram em oito morfotipos diferentes. O DNA genômico de 46 isolados provenientes dos meios TCBS e MRSA foi extraído, amplificado e purificado, sendo seqüenciada a região codificadora do gene 16S rRNA destes microorganismos. As bactérias foram agrupadas e identificadas pela construção de fenogramas. Os resultados mostraram a presença dos gêneros *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Photobacterium* e *Staphylococcus*. Dezenove isolados não agruparam com nenhuma linhagem-tipo existente, permitindo supor que se tratem de espécies não descritas. Como perspectivas futuras propõe-se a realização de testes *in vitro* e *in vivo* para se verificar a possível atuação das bactérias isoladas como inibidoras de bactérias patogênicas, ou na melhoria da performance zootécnica de *P. orbignyanus*. Além disso, pretende-se obter microorganismos probióticos isolados a partir de outros organismos aquáticos cultivados.

ABSTRACT

Probiotic organisms are those capable to improve the health of their hosts, by assisting in the food digestion and nutrient assimilation, stimulating their immunological system or by controlling the development of pathogens. However, the use of commercial probiotics poses a serious hazard to the health of farmed animals and to the environment that must be considered. Bacteria present in such commercial products might have resistance genes to antibiotics that can be transferred to pathogenic microrganisms in the culture environment. The screening for strains isolated from the host itself would be an alternative for this issue. The aim of this work was to isolate, culture and identify native bacteria with putative use as probiotic in the rearing of aquatic animals. In the present work bacteria were obtained from the gastrointestinal tract of a laboratory-reared flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) reared at the Marine Aquaculture Station of the Federal University of Rio Grande - FURG. Serial dilutions from the gastrointestinal tract were seeded in plates with four culture mediums (TCBS, MRSA, MA and NA), incubated and the growing colonies were isolated and purified. Low values of CFU (10^4) were probably due to the long time taken from sampling to analysis or due to transporting conditions. Despite of it, 94 strains, present in eight different colony morphotypes, were recovered. The genomic DNA of 46 strains isolated from the TCBS and MRSA mediums were extracted, amplified, purified and the gene coding the 16S rRNA region was sequenced. The bacteria were clustered and identified by the construction of phenograms. The results showed the presence of four genera, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Photobacterium* and *Staphylococcus*. Nineteen of the isolates clustered with none of the existing type-strain, suggesting that they might be species not previously described. Future perspectives of this work are the setting up of *in vitro* and *in vivo* tests in order to define the probiotic potential of the isolated strains by improving the growth performance of *P. orbignyanus* or inhibiting the development of pathogens. Beside that we intend to isolate probiotic micoorganisms from other laboratory-reared aquatic organisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A teoria de Thomas Malthus

Ao escrever "*Um ensaio sobre o princípio da população*", Thomas Malthus (1798) afirmou que a população humana tende naturalmente a crescer geometricamente, enquanto que a produção de alimentos aumenta em uma razão aritmética. Isto significa que em um mundo finito, quando a população atinge a capacidade de suporte do ambiente, a divisão per capita dos bens mundiais deve decrescer constantemente até que um novo ponto de equilíbrio seja estabelecido. Este equilíbrio, ainda de acordo com Malthus, seria resultante de processos naturais de controle populacional. Este conceito de "*Luta pela sobrevivência*", proposto por Malthus foi o alicerce do princípio da "*Sobrevivência do mais apto*" de Charles Darwin (1873), como o próprio escreveu em sua biografia mas, a teoria de Malthus foi extremamente criticada na época. William Godwin (1820) em seu ensaio "*Sobre a população*" escreveu que, devido aos avanços tecnológicos das Revoluções Agrícola e Industrial e das vastas extensões de terras não cultivadas, a oferta de alimentos não seria afetada pelo aumento populacional.

1.2. A tragédia dos comuns

Fazendo uma retrospectiva até os dias atuais podemos afirmar que as previsões Malthusianas de falta de alimento não se confirmaram no que se refere à produção de alimentos cultivados (frutas, cereais e verduras) e na criação de animais (bovinos, aves e suínos). No entanto, ela se mostrou verdadeira quando analisamos a indústria pesqueira que, apesar dos diversos avanços tecnológicos implementados, possui a sua produção condicionada pelo estado dos estoques existentes. Por ser o alvo de uma atividade econômica cujo fundamento é a extração, os estoques pesqueiros estão sofrendo um colapso devido à grande pressão exercida, refletindo no aumento do esforço de captura para manter estável a produção de pescado.

Em um artigo publicado em 1968 Garret Hardin apresenta o seu conceito de "*Tragédia dos Comuns*", onde analisa que um recurso de uso comum, ao qual todos possuem acesso, está *inevitavelmente destinado* à exaustão. Hardin argumenta que se um indivíduo egoísta resolve sobre-explorar um recurso comum a todos, o bônus desta ação pertence apenas ao indivíduo egoísta enquanto que o ônus é dividido por toda a população. A *tragédia* ao qual Hardin se refere deve-se ao fato de que, individualmente, é mais lucrativo (a curto prazo) exaurir um recurso natural do que mantê-lo intacto, ou gerenciá-lo de forma sustentável. Este conceito de "*Tragédia dos Comuns*" se aplica perfeitamente à condição na qual os estoques pesqueiros e, consequentemente a indústria, se encontram atualmente.

1.3. O advento da aqüicultura e o uso de antibióticos

Devido a sobre-exploração dos estoques pesqueiros, o cultivo de organismos marinhos e de água doce (aqüicultura) ganhou uma enorme importância no cenário atual, como forma de reduzir a pressão exercida sobre os estoques naturais e, principalmente, como forma de contribuir com a demanda crescente por proteínas de pescado (FAO 2007). No entanto, o cultivo de organismos marinhos (maricultura) é uma tarefa árdua, principalmente devido à falta de conhecimento das interações entre o organismo cultivado e o seu ambiente natural. Sem este tipo de informação não é possível criar um ambiente favorável ao cultivo destes organismos que, freqüentemente, não apresentam um desempenho comparável ao de organismos selvagens do ambiente natural. Além do mais, o uso de rações que não atendem às exigências nutricionais, associado às condições de superpopulação que, por sua vez, influenciam a qualidade da água de cultivo, são alguns exemplos de fatores que contribuem negativamente no desempenho do organismo cultivado. A resposta mais comum que os organismos apresentam frente à estas condições de desequilíbrio ambiental (estresse) é o aparecimento de doenças oportunistas provocadas por microrganismos presentes no próprio organismo ou no ambiente de cultivo (Son *et al.* 1997, Nicolas *et al.* 2007). Desta forma, a presença de bactérias patogênicas no ambiente de cultivo, ou no próprio organismo, tem sido combatida com medidas profiláticas como a utilização de

antibióticos. No entanto, o otimismo provocado pela administração de antibióticos se mostrou prematuro, pois atualmente presenciamos o ressurgimento mundial de doenças infecciosas com a identificação de novos agentes patogênicos, além do reaparecimento de antigos agentes que se apresentam mais resistentes aos antibióticos utilizados (Son *et al.* 1997, FAO 2005, Nicolas *et al.* 2007). A pressão seletiva provocada pela administração de antibióticos no ambiente de cultivo, seja por razões profiláticas ao combate de agentes patogênicos ou como forma de estimular o crescimento dos organismos, proporcionou o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos empregados (Alderman & Hastings 1998, Sørum 1999, Le *et al.* 2005, Akinbowale *et al.* 2006, Giraud *et al.* 2006). Além do mais, este fator de resistência adquirido (gene de resistência a antibióticos) pode ser transferido horizontalmente para o resto da população bacteriana presente no ambiente de cultivo através de conjugação bacteriana mediada por plasmídeos de resistência, resultando no aparecimento de doenças resistentes a tratamentos, além de preocupar as autoridades sanitárias quanto à transmissão destes genes para bactérias patogênicas de humanos (Cocconcelli *et al.* 2003, FAO 2005, Ammor *et al.* 2007, Bennett 2008, Courvalin 2008).

1.4. Conceito de probiótico

Uma das soluções adotadas para controlar o aparecimento de microrganismos patogênicos em ambientes de cultivo, além de permitir a redução do uso de antibióticos, foi o desenvolvimento de microrganismos com atividade antagonista àqueles patogênicos, os microrganismos probióticos (Balcázar *et al.* 2008, Gatesoupe 2008, Kesarcodi-Watson *et al.* 2008, Tinh *et al.* 2008). Este conceito de manipulação da composição bacteriana foi proposto por Metchnikoff em 1907, sendo aplicado desde então em diversos campos como a agricultura e a medicina, porém apenas no final dos anos 80 este conceito foi aplicado na aqüicultura (Kozasa 1986).

De acordo com a definição de probiótico para utilização em aqüicultura, proposta por Gatesoupe (1999), o termo refere-se a células microbianas que, administradas de forma a colonizarem o trato gastrointestinal, possuem a função de melhorar a saúde do organismo hospedeiro. Esta função pode ser realizada de diversas

formas como, por exemplo, a promoção do crescimento através da produção de vitaminas, minerais, ácidos graxos de cadeia curta, lipídios e de enzimas digestiva capazes de digerir quitina, amido, proteínas, celulose e lipídios contribuindo, desta forma, com a digestão e a assimilação de nutrientes (Sugita *et al.* 1991, Hansen & Olafsen 1999, Farzanfar 2006, Gómez & Balcázar 2008, Tinh *et al.* 2008). Por exemplo, de acordo com Sugita *et al.* (1991) a presença de bactérias produtoras de vitamina B_{12} no trato gastrointestinal da truta arco-íris (*Oncorhychus mykiss*) seria a razão pela qual a espécie não necessita da inclusão desta vitamina em sua dieta. Além de promover o crescimento, probióticos podem contribuir também com a saúde do organismo através da estimulação do sistema imunológico, e pela ação antagonista à microrganismos patogênicos, através da produção de metabólicos inibidores da colonização ou do crescimento destes microrganismos no trato digestivo ou, simplesmente, pela competição por recursos como nutrientes ou espaço (sítios de adesão) (Verschuere *et al*. 2000, Olafsen 2001, Farzanfar 2006, Vine *et al.* 2006).

Além da definição de probiótico empregada por Gatesoupe (1999), faz-se necessário a apresentação de outros conceitos funcionais como biocontrole e biorremediador, com o intuito ressaltar as diferenças entre estes e o termo probiótico. De acordo com a classificação dos tratamentos microbianos empregados na aqüicultura, proposta por Gatesoupe (1999), um microrganismo biorremediador possui a função de melhorar a qualidade da água de cultivo através da degradação de poluentes ou de metabólicos produzidos pelos organismos cultivados. Já o biocontrole refere-se especificamente à ação antagonista à microrganismos patogênicos presentes na água de cultivo (Maeda *et al.* 1997), sem que este colonize o trato digestivo dos organismos cultivados. Por outro lado, além de possuir função antagonista, um microrganismo probiótico deve possuir outras funções (citadas anteriormente) e transitar ou colonizar o trato digestivo do hospedeiro (Gatesoupe 1999). Além dos termos mencionados, deve-se ainda citar o conceito dos prebióticos, isto é, ingredientes alimentares não digeríveis que selecionam e estimulam o crescimento de bactérias benéficas para a saúde do organismo hospedeiro (Gatesoupe 1999).

Apesar de quase 20 anos de pesquisas, a maioria dos probióticos utilizados atualmente na aqüicultura corresponde ao grupo das bactérias lácticas, empregado pela indústria alimentar e por centros de pesquisa no desenvolvimento de produtos para o

consumo humano e de animais terrestres (Tannock 1997, Klein *et al.* 1998, Ringø & Gatesoupe 1998, Ringø *et al.* 2003). O interesse pelas bactérias lácticas deve-se ao fato de serem residentes naturais do trato gastrointestinal de humanos, por historicamente serem empregadas na fabricação de alimentos e possuírem o status de "seguras" (i.e. não causadoras de doenças), além de tolerarem a ação dos ácidos gástricos e da bile e converterem a lactose em ácido láctico diminuindo, desta forma, o pH do trato gastrointestinal, reduzindo a colonização bacteriana (Tannock 1997, Ringø & Gatesoupe 1998, Salminen *et al.* 1998, Konings *et al.* 2000, Carr *et al.* 2002). O gênero de bactérias lácticas mais amplamente empregado como probióticos é o Lactobacillus, do qual as espécies L. plantarum, L. rhamnosus, L. helveticus e L. salivarius são exemplos de bactérias utilizadas como probióticos no cultivo de organismos marinhos, mas que foram isoladas inicialmente a partir de organismos terrestres (Farzanfar 2006, Vine et al. 2006, Frouel *et al.* 2008). Além deste, representantes dos gêneros Bacillus (B. subtilis e B. pumilus), Enterococcus (E. faecium e E. faecalis) e Carnobacterium (C. divergens e C. inhibens) também são empregados (Ringø & Gatesoupe 1998, Gatesoupe 1999, Verschuere et al. 2000, Olafsen 2001, Irianto & Austin 2002, Farzanfar 2006, Balcázar et al. 2006, Vine et al. 2006).

1.5. Probióticos comerciais exóticos

Apesar da utilização de microrganismos probióticos comercias isolados a partir de outros ambientes constituir uma prática comum, é importante discutir a questão da introdução de um microrganismo exótico em um ambiente de cultivo, ou no corpo de água receptor de seus efluentes. Trabalhos recentes demonstraram que as bactérias comensais do trato digestivo de organismos, incluindo as bactérias lácticas, podem atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos (Mathur & Singh 2005, Courvalin 2008, Gómez & Balcázar 2008, Lee *et al.* 2008). Além do mais, acredita-se que as bactérias lácticas possam transferir horizontalmente genes adquiridos de resistência múltipla a antibióticos amplificando significativamente a magnitude da questão (Courvalin 2008). Um exemplo disto são as bactérias do gênero *Enterococcus* das quais, suspeita-se possuírem plasmídeos contendo genes de resistência à antibióticos

(Vancomicina), além de fatores de virulência como hemolisinas e citolisinas (Cocconcelli *et al.* 2003). Devido a estas suspeitas a FAO (2002) resolveu proibir a utilização de novas linhagens de *Enterococcus* na confecção de probióticos. No entanto, de acordo com Lee *et al.* (2008), cerca de 50% dos probióticos comercializados na Coréia são constituídos de espécies de *Enterococcus*, sendo que muitos não apresentam o número da linhagem, causando grandes preocupações a respeito ao seu uso. Acredita-se também que *L. rhamnosus, B. subtillis*, espécies utilizadas como probióticos, possam ter causado doenças em humanos (Richard *et al*. 1988, Oggioni *et al.* 1998, Rautio *et al.* 1999, Mackay *et al.* 1999, Spinosa *et al*. 2000). Linhagens de *Lactobacillus* apresentaram resistência a antibióticos como Cloramfenicol, Meticilina, Tetraciclina, Eritromicina e Amplicilina (Vidal & Collins-Thompson 1987, Olukoya *et al.* 1993, Gevers *et al.* 2003).

1.6. Probióticos nativos

Uma alternativa para o uso de probióticos comerciais (exóticos) seria o isolamento, cultivo e emprego de probióticos nativos do ambiente, ou do trato intestinal dos organismos que estão sendo cultivados. Verschuere *et al.* (2000) aconselham o isolamento de microrganismos probióticos a partir do próprio hospedeiro. De acordo com alguns autores, um microrganismo capaz de colonizar e dominar um sítio de adesão (ex. muco do trato gastrointestinal) do organismo hospedeiro seria um bom candidato para competir com microrganismos patogênicos, assim como a adição de um determinado grupo de bactérias na água de cultivo poderia competir por nutriente com possíveis linhagens de bactérias patogênicas (exclusão competitiva). Vine *et al.* (2006) propuseram um protocolo para a seleção de microrganismos probióticos isolados a partir do próprio organismo hospedeiro que está sendo, ou se pretende cultivar. Apesar de não haverem evidências demonstrando que probióticos isolados do próprio organismo hospedeiro apresentam uma performance melhor quando comparados com os probióticos isolados de espécies ou ambientes diferentes, supõem-se que os riscos apontados acima são consideravelmente menores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a composição da comunidade bacteriana e verificar a existência de bactérias, com potencial uso como organismos probióticos, obtidas a partir do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbignyanus* cultivado na Estação Marinha de Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar bactérias, em especial bactérias lácticas, do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbinyanus*,
- Cultivar as bactérias isoladas,
- Estabelecer uma coleção bacteriana e
- Caracterizar taxonomicamente, através de seqüenciamento genético, as bactérias lácticas e não-lácticas isoladas das amostras do trato gastrointestinal do linguado *Paralichthys orbinyanus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material biológico

O material biológico utilizado no presente trabalho foi obtido a partir de amostras do peixe *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). O linguado *P. orbignyanus*, organismo eurihalino típico da região estuarina da Lagoa dos Patos, foi coletado no dia 06 de julho de 2007 a partir de peixes cultivados na Estação Marinha de Aqüicultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, Rio Grande, RS). Os peixes amostrados, de forma aleatória e com o auxílio de um puçá, foram agrupados em três classes de tamanho (25 mm, 200 mm e 300 mm de comprimento total) sendo cada classe de tamanho proveniente de tanques de cultivo diferentes, mas mantidos sob as mesmas condições. Todos os indivíduos foram sacrificados através do emprego de choque térmico (acondicionados em freezer a -20ºC por 45 minutos) e, após isto, o peso úmido total (PT) e o comprimento total (CT) individual foram medidos com uso de balança de precisão e paquímetro, respectivamente (tabela 1).

Tabela 1 – Média (± DP) do comprimento e peso dos indivíduos coletados. CT = Comprimento total (mm), PT = Peso total (g), n = número de indivíduos.

	Cultivo (n = 13)	
Classe	CT	PT
25 mm	24,6 (±0,5)	-
200 mm	202,5 (±18,5)	93,8 (±36,8)
300 mm	321,7 (±23,6)	297 (±88,5)

3.2. Retirada do trato gastrointestinal

Para a retirada do trato gastrointestinal os indivíduos foram desinfetados externamente com solução de etanol 70% ($^{v}/_{v}$) seguido de 3 lavagens com água destilada e, então, dissecados com auxílio de tesoura e pinça previamente esterilizadas. Após a retirada, os tratos gastrointestinais foram lavados externamente por 3 vezes com auxílio de pisseta contendo água destilada, acondicionados em sacos plásticos estéreis

tipo Ziploc® devidamente etiquetados e transportados para o laboratório (Buller 2004). Os tratos gastrointestinais dos indivíduos foram transportados para o Laboratório de Genética Molecular Bacteriana da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro, RJ) em caixa de isopor mantida sob refrigeração. Para a classe de 25 mm os indivíduos foram transportados inteiros e os tratos foram retirados *in loco* com auxílio de lupa binocular, tesoura e pinça gentilmente cedidos pelo Laboratório de Ictiologia da UFRJ.

3.3. Diluição das amostras

Uma vez no laboratório, o trato gastrointestinal dos indivíduos de cada classe de tamanho foi agrupado formando, desta forma, uma única amostra por classe ("pool"). Os tratos foram macerados manualmente com auxílio de gral e pistilo e, então, transferiu-se 0,1 g para um tubo tipo Falcon contendo 0,9 ml de solução salina estéril 0,85% e homogeneizado com o uso de um agitador de tubos tipo vortex. Na classe de tamanho 25, devido ao pouco volume de material, resolveu-se dobrar o volume da amostra com adição de solução salina. De cada tubo transferiu-se uma alíquota de 100 µl para um tubo contendo 9,9 ml de solução salina realizando-se, desta forma, uma diluição inicial de 100 vezes (Buller 2004). Ao total foram realizadas 4 diluições seriadas na escala de 1:100 (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} e 10^{-8}) (Figura 1).

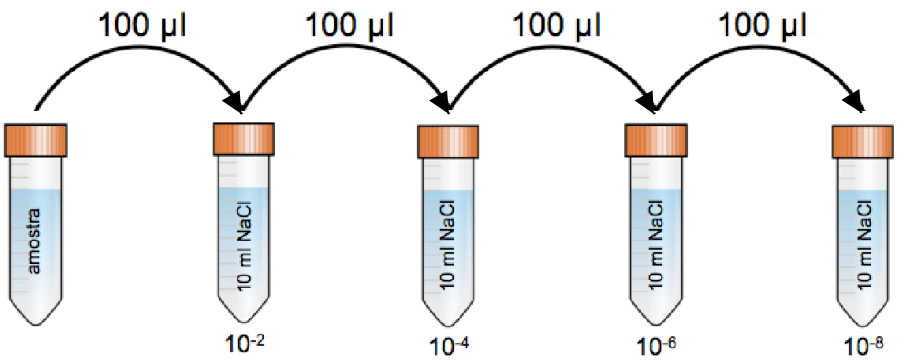

Figura 1: Diluições seriadas (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} e 10^{-8}) a partir da amostra original não diluída (10^{0}).

3.4. Meios de cultivo

A fim de abranger o maior número possível de espécies bacterianas presentes no trato gastrointestinal dos linguados, optou-se por utilizar quatro meios de cultivo distintos, sendo dois de espectro amplo (meios não-seletivos) e dois de espectro restrito (meios seletivos). Os meios de cultivo utilizados no presente trabalho foram: Caldo Marinho 2216 (MB; Difco), Caldo Nutriente (NB; Difco), Ágar Tiossulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS; Difco) e Caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Oxoid). Os meios de cultivo MB e NB são ambos não-seletivos, sendo o primeiro utilizado para o cultivo de bactérias heterotróficas provenientes de ambientes marinhos e o segundo para o cultivo de bactérias provenientes de ambientes diversos (i.e. água, esgoto, fezes, etc.). O meio de cultivo TCBS é um meio eletivo para bactérias do gênero *Vibrio*, não permitindo o crescimento e/ou desenvolvimento abundante de organismos de gêneros diferentes enquanto que o meio de cultivo MRS é um meio eletivo para bactérias lácticas.

Os meios de cultivo foram preparados com água destilada de acordo com as instruções do fabricante. Aos meios MB, NB e MRS, cuja apresentação era na forma de caldo, foram adicionados 2% (p/v) de Ágar Bacteriológico (BA; Oxoid) para a obtenção do meio na forma sólida resultando, desta forma, em Ágar Marinho (MA), Ágar Nutriente (NA) e Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRSA). Após o preparo, os meios foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121º C durante um período de 15 minutos, à exceção do meio Ágar Tiossulfato-Citrato-Bile-Sacarose que, de acordo com o fabricante, não necessita ser esterilizado. Após isto, os meios foram transferidos para uma estufa a 45ºC até esfriar, para posterior inversão em placa de Petri (Buller 2004). Aproximadamente 15 ml de meio foram invertidos por placa de petri e deixados solidificar por 15 minutos em superfície nivelada dentro da capela de fluxo laminar.

3.5. Semeadura das amostras

De cada diluição anteriormente obtida (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} e 10^{-8}), inoculou-se uma alíquota de 100 µl por placa de petri para cada um dos quatro meios utilizados totalizando, desta forma, 16 placas de petri por classe de tamanho. A alíquota inoculada

na placa foi estriada com o auxílio de uma alça estéril descartável e, após isto, as placas foram incubadas em posição invertida a 27ºC por 48 horas à exceção das placas de MRSA que foram incubadas em Jarra de Anaerobiose (Probac do Brasil) com Meio Microaerofílico (Probac do Brasil) a 27ºC por 5 dias.

3.6. Contagem de unidades formadoras de colônias

Ao término do período de incubação verificou-se se houve crescimento de colônias e, nas placas onde houve crescimento, procedeu-se à contagem do número de colônias para o cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Além do número de colônias também foi determinado o número de morfotipos total para cada meio de cultivo. Os morfotipos foram determinados de acordo com as características da colônia, como coloração, tipo de crescimento, formato da borda, tamanho e textura da colônia. O número de UFC foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula (Buller 2004):

UFC (mL^{-1}) = número de colônias / (diluição da amostra * vol. inoculado)

3.7. Isolamento e purificação dos morfotipos

Após a contagem de UFC e da identificação visual dos diferentes morfotipos procedeu-se ao isolamento destes para posterior purificação. O isolamento foi realizado em capela de fluxo laminar onde, com o auxílio de alça estéril descartável, uma porção da colônia de um morfotipo selecionado foi transferida e estriada em uma placa de isolamento contendo o mesmo meio de cultivo. Esta placa, identificada de acordo com o morfotipo inoculado, foi incubada nas mesmas condições utilizadas no processo de semeadura. Cada morfotipo que se acreditava ser um organismo distinto recebeu como prefixo a identificação da placa da qual se originou, além de um sufixo identificador, por exemplo, o morfotipo "TCBS 300 10^{-2} a" corresponde a um organismo a proveniente da amostra da classe de tamanho 300 mm, com diluição de 10^{-2} cultivado em meio TCBS (Figura 2).

Ao término do período de incubação e verificado o crescimento e a ausência de morfotipos diferentes daquele inoculado, realizou-se o processo de purificação do morfotipo. Para a purificação, uma porção de uma colônia bem isolada foi transferida da placa de isolamento e estriada em uma placa de purificação contendo Ágar Soja Triptona (TSA; Difco) enriquecida com 3% NaCl (TSA-SAL) e incubada pelo mesmo tempo e temperatura utilizados no processo anterior. O processo de purificação foi repetido três vezes ou até que se obtivesse uma colônia pura, ou seja, sem a presença de outros morfotipos (contaminação).

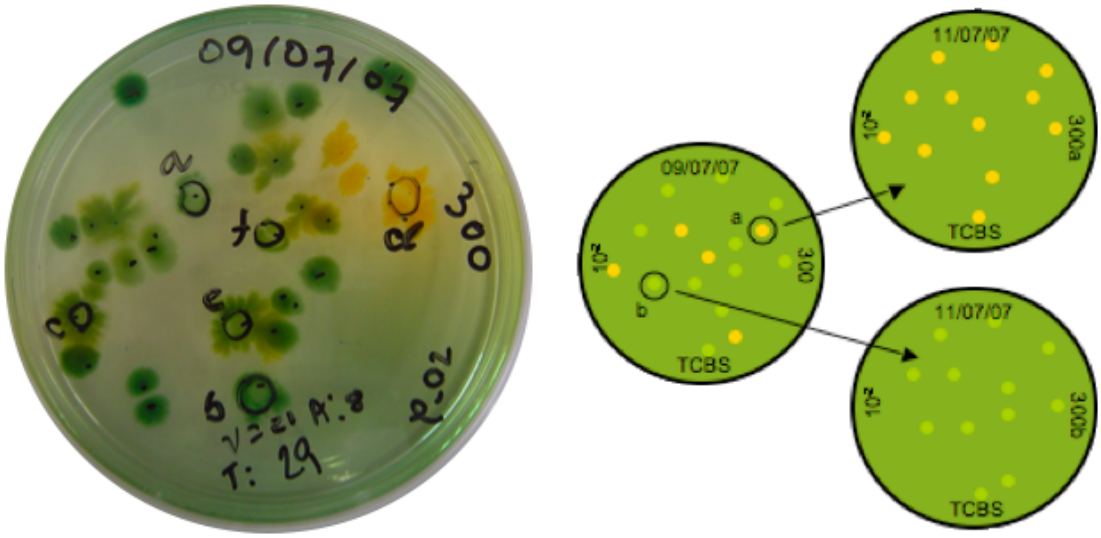

Figura 2: Exemplo do isolamento de dois morfotipos (*a* e *b*) em uma amostra de TCBS.

3.8. Coleção de isolados

Após o processo de purificação, os morfotipos foram preparados de forma a compor uma coleção de isolados viáveis para utilização nas etapas seguintes do trabalho. Os morfotipos purificados foram estocados sob duas formas distintas, a saber (Buller 2004):

a) Criotubo de Estoque – Com o auxílio de uma alça estéril descartável adicionou-se uma porção da colônia purificada em um critotubo contendo 1 ml de Caldo Soja Triptona (TSB; Difco), enriquecido de 3% NaCl (TSB-SAL). O caldo foi homogeneizado através de agitação constante com o auxílio de um agitador de

tubos e incubado a 27ºC durante a noite (12 horas) ou até que fosse verificado crescimento bacteriano. A verificação foi realizada por comparação do criotubo inoculado com um criotubo não inoculado, contendo as mesmas soluções (controle negativo). Após verificado o crescimento adicionou-se 300 µl de glicerol (Sigma-Aldrich) e, após repousar por 10 minutos, o caldo foi novamente homogeneizado e estocado, em duplicata, em freezer a -80 ºC.

b) Tubo de Motilidade – Com o auxílio de uma agulha estéril descartável adicionou-se uma porção da colônia purificada em um tubo contendo 1 ml de TSA-SAL e incubado a 27ºC até que se fosse verificado crescimento ao qual foi adicionado 200 µl de glicerol e estocado em temperatura ambiente.

3.9. Extração do DNA

O DNA bacteriano foi extraído a partir dos isolados puros mantidos em coleção sob a forma de criotubos de estoque. De cada criotubo retirou-se, com o auxílio de uma alça estéril descartável, uma alíquota da suspensão congelada que foi estriada em uma placa contendo TSA-SAL e incubada a uma temperatura de 28ºC por 48 horas ou até se verificar o crescimento das colônias. Depois disso, com o auxílio de uma alça estéril descartável, adicionou-se uma porção de uma colônia a um tubo tipo Eppendorf contendo 1 ml de TSB-SAL, sendo homogeneizado e incubado por toda a noite. Após o período de incubação o DNA genômico das bactérias foi extraído através da adaptação do protocolo proposto por Pitcher *et al.* (1989), como se segue: O eppendorf foi centrifugado (centrifuga Eppendorf 5804R) por 5 minutos a 14.000 rotações por minuto (rpm) e o sobrenadante foi descartado utilizando-se uma micropipeta. Após isto, o precipitado resultante da centrifugação foi ressuspendido em 50µl de solução tampão TE 1x (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e adicionado 100µl de Lisozima (10 mg/ml de TE 1x) à solução para romper a parede celular das bactérias Gram positivas. Após um período de 1 hora de incubação a 37ºC o eppendorf foi transferido para um recipiente resfriado e adicionado 300 µl de GES (60g de Guanidina-Tiocianato, 5 M EDTA pH 8,0, 20 ml de água Milli-Q (Millipore), 10 mg de N-lauril-sarcosina/ml de água Milli-Q e esterilizado por filtração com malha de 0,45 µm) e 200µl H_2O Milli-Q,

seguido por uma breve centrifugação. Adicionou-se 250µl de acetato de amônio (7,5 M) e o eppendorf foi mantido em gelo por 10 minutos seguido por uma breve centrifugação. Foi adicionado 500µl de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado manualmente e então centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. Após isto, 700 µl da fase aquosa da solução foram transferidos para um novo eppendorf de 1,5 ml e adicionados 400 µl de isopropanol gelado (-20ºC). A solução foi homogeneizada até se tornar monofásica e então centrifugada novamente por 15 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado duas vezes com 300 µl de solução de etanol (70%). Uma nova centrifugação foi realizada (1 minuto a 14.000 rpm), o sobrenadante restante foi desprezado com o auxílio de uma micropipeta e o eppendorf contendo o DNA precipitado foi deixado secar com a tampa aberta em capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. Após seco, o DNA foi rehidratado com a adição de 100 µl de solução tampão TE 1x e mantido por 12 horas em geladeira. Por fim, com o DNA novamente dissolvido, adicionou-se 25 µl de solução de RNase (250 µg/ml em TE 1x) e incubou-se o eppendorf por 1 hora a 37°C. Ao término do processo o eppendorf contendo o DNA extraído foi armazenado em freezer (-20ºC).

3.10. Quantificação do DNA extraído

Após o processo de extração verificou-se a quantidade do DNA extraído. Para isto utilizou-se duas metodologias distintas: fluorescência e espectrofotometria. A quantificação por fluorescência consiste, basicamente, na adição de um fluorocromo (ex. Brometo de Etídio) que se liga ao DNA e que, ao ser submetido a uma fonte de luz ultra-violeta emite fluorescência, sendo a quantificação verificada pela intensidade da fluorescência emitida (Sambrook & Russell 2001).

Para a quantificação por fluorescência adicionou-se a uma tira de para-filme uma alíquota de 5 µl de DNA extraído e, após isto, adicionou-se 2 µl de tampão de carregamento (0,025% de Azul de Bromofenol e 60% de Glicerol) seguido de uma breve homogeneização com a micropipeta. A amostra adicionada de tampão foi carregada em 100 ml de gel de Agarose 1% ($^{p}/_{v}$) preparado previamente com solução

tampão TBE 0,5x (Estoque 10x: 108 g de Tris, 55 g de Ácido Bórico, 20 mM de EDTA para 1 litro de solução em H_2O, esterilizado por autoclavagem) e adicionado 0,5 µl de Brometo de Etídio (0,5 µg/ml). O gel contendo as amostras foi transferido para uma cuba de eletroforese e adicionado de solução tampão TBE 0,5x em volume suficiente para cobrir o gel. A eletroforese foi realizada utilizando-se uma voltagem de 100 V por um período de 80 minutos e, após isto, o gel foi transferido para um Transiluminador UV para visualização da fluorescência sendo a quantificação verificada através da intensidade da emissão e comparada a um controle (Sambrook & Russell, 2001).

Já o método de quantificação por espectrofotometria se baseia na capacidade do DNA em absorver luz ultra-violeta, possuindo um pico de absorção no comprimento de onda de 260 nm (Sambrook & Russell, 2001). A quantificação por espectrofotometria foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro de bancada gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Molecular Vegetal da UFRJ. Após calibração do espectrofotômetro com água Milli-Q (amostra branco), uma alíquota de 5 µl de amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo previamente lavada com água destilada e a leitura de quantidade de luz ultra-violeta absorvida foi efetuada, sendo a quantidade de DNA presente na amostra expressa em µg/ml. Nos casos onde não foi verificada a presença de DNA extraído o processo de extração foi repetido.

3.11. Pureza do DNA extraído

A possível contaminação das amostras de DNA por proteína foi verificado, através de espectrofotometria, pela razão entre as leituras das amostras em dois comprimentos de onda específicos, um para DNA (260 nm) e outro para proteínas (280 nm). As leituras foram efetuadas nas mesmas condições que o processo de quantificação de DNA. Uma amostra livre de contaminação por proteínas deve apresentar a razão 260:280 próxima a 1,8, quanto menor for esta razão maior será a contaminação (Sambrook & Russell, 2001).

3.12. Amplificação do DNA extraído

Uma vez verificada a quantidade e a pureza do DNA bacteriano extraído, realizou-se o processo de amplificação dos genes selecionados para seqüenciamento e identificação das bactérias isoladas do trato gastrointestinal dos linguados. Os genes selecionados para amplificação foram 16S rRNA, *pyrH* e *pheS*. O gene 16S rRNA é um gene universal amplamente utilizado na identificação de bactérias em geral (Woese 1987, Buller 2004), o gene *pyrH* é muito eficaz para a identificação de Vibrios, sendo utilizado por Thompson *et al.* (2005 e 2007) para analisar a relação taxonômica das bactérias da família Vibrionaceae, tendo resolução suficiente para separar espécies enquanto que o gene *pheS,* de acordo com Naser *et al.* (2007), é um gene eficaz para realizar análise taxonômica de bactérias lácticas. Os *primers* (iniciadores) utilizados para amplificar os genes selecionados foram pA-F e pH-R para o gene do 16S rRNA, pyrH80F e pyrH530R para o gene do *pyrH* e pheS-21-F e pheS-23-R para o gene do *pheS* (Tabela 2).

Tabela 2 – Primers utilizados para amplificação dos genes 16S rRNA, *pyrH* e *pheS*.

Gene	Primer	Seqüência
16S rRNA	pA-F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
	pH-R	5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'
pyrH	pyrH80F	5' GATCGTATGGCTCAAGAAG 3'
	pyrH530R	5' TAGGCATTTTGTGGTCACG 3'
pheS	pheS-21-F	5' CAYCCNGCHCGYGAYATGC 3'
	pheS-23-R	5' GGRTGRACCATVCCNGCHCC 3'

A amplificação dos genes foi realizada através da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) utilizando-se um termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf). Para a amplificação procedeu-se à confecção do Mix, para uma amostra adicionou-se os seguintes reagentes a um tubo eppendorf de volume adequado: 25,75 µl de água Milli-Q estéril, 10 µl de tampão *Colorless GoTaq® Reaction Buffer* 5x, 1 µl de dNTPs (10 mM), 3 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2,5 µl de *primer* Forward, 2,5 µl de *primer* Reverse e 0,25 µl de GoTaq® DNA Polimerase (5 µ/µl), totalizando 45 µl de Mix por amostra. A confecção do mix foi executada em recipiente refrigerado, sendo o Mix mantido nestas condições até o momento de utilização. Para cada amostra a ser

amplificada adicionou-se 45 µl de mix e 5 µl de DNA a um microtubo de PCR de 200µl. Além das amostras de DNA foi adicionado dois controles para verificar a eficiência da amplificação e a presença de contaminantes no mix preparado. Para confirmar a eficiência utilizou-se pelo menos um controle positivo, isto é, em um microtubo de PCR foi adicionado 45 µl de Mix e 5 µl de DNA de um organismo conhecido, cuja eficiência do *primer* é conhecida. Os organismos controles utilizados no presente trabalho foram: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Enterococcus faecium* ATCC 19434 para os primers *pheS* e 16S rRNA e *Vibrio cholera* el Tor para os primers *pyrH* e 16S rRNA. As linhagens de *Enterococcus* e de *Vibrio* foram gentilmente cedidas pela Profª. Lúcia Teixeira do Departamento de Microbiologia Médica e pelo Laboratório de Genética Molecular Bacteriana, respectivamente, ambos da UFRJ. Para verificar a presença de contaminação por DNA foi utilizado um controle negativo, constituído de 45 µl de Mix adicionado de 5 µl de água Milli-Q. A programação utilizada para a amplificação do primer *pheS* foi a seguinte: (1) um ciclo de desnaturação de 5 min a 95ºC, (2) 3 ciclos de 1 min a 95ºC + 2 min 15 s a 46ºC + 1 min 15 s a 72ºC, (3) 30 ciclos de 35 s a 95ºC + 1 min 15 s a 46ºC + 1 min 15 s a 72ºC e (4) um ciclo final de extensão de 7 min a 72ºC. Para os primers *pyrH* e 16S rRNA foi utilizada a seguinte programação: (1) um ciclo de desnaturação de 2 min a 95ºC, (2) 30 ciclos de 1 min a 94ºC + 1 min a 55ºC + 3 min a 72ºC e (3) um ciclo final de extensão de 3 min a 72ºC. Após o término do processo de amplificação iniciou-se a verificação da eficiência da reação de PCR.

3.13. Eletroforese e estimativa do peso molecular

Após a amplificação do DNA bacteriano foi realizada uma eletroforese em gel de agarose adicionando-se aos poços do gel o DNA amplificado na PCR e um marcador molecular de 100 pares de base (Invitrogen) para verificação do tamanho do segmento amplificado (aproximadamente 500 pares de base). O produto de PCR foi visualizado em um transiluminador UV, sendo também verificada a presença de produtos inespecíficos e a contaminação controle negativo. Os microtubos contendo o produto de PCR foram armazenados em freezer a -20ºC até utilização na etapa seguinte.

3.14. Purificação do produto de PCR

Os produtos das amplificações que obtiveram resultado positivo e que possuíam tamanho e quantidade desejáveis foram purificados com o kit comercial de purificação ExoSAP-IT (USB) no qual os restos de *primers* e de dNTPs não utilizados durante o processo de amplificação são removidos (digeridos) por uma enzima a fim de evitar interferências no processo de seqüenciamento das amostras. Em um microtubo de 200 µl foi adicionado 5 µl de amostra amplificada ao qual foi adicionado 1 µl de ExoSAP-IT, o microtubo foi incubado por 15 minutos a 37ºC para remoção das impurezas e, após isto, aquecido por 15 minutos a 80ºC para inativação do produto de purificação. Após o processo de purificação a amostra de DNA amplificado e purificado foi armazenado em freezer a -20ºC para posterior seqüenciamento (conforme recomendação do fabricante).

3.15. Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA isolado no presente trabalho foi gentilmente realizado pela Profª. Drª. Ana Carolina Paulo Vicente do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro. Para a reação de seqüenciamento utilizou-se 3 µl de amostra de DNA amplificado e purificado (80 ng), 3,3 µl de água Milli-Q estéril, 1,2 µl (3,2 pmols) do primer utilizado na amplificação, 1 µl de BigDye® e 1,5 µl de tampão do kit de seqüenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems). A reação de seqüenciamento foi realizada em termociclador e a programação utilizada compreendeu 25 ciclos de (1) 10 segundos a 96ºC, (2) 5 segundos a 50°C e (3) 4 minutos a 60ºC. Para as amostras amplificadas com o *primer* para 16S rRNA foi utilizado um segundo *primer reverse* para o seqüenciamento (Tabela 3). As duas fitas do DNA foram seqüenciadas.

Tabela 3 – *Primers* utilizados na reação de seqüenciamento do gene 16S rRNA.

Gene	Primer	Seqüência
16S rRNA	pA-F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
	16R519	5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'

3.16. Precipitação da reação de seqüenciamento

Após o preparo realizou-se a precipitação da reação de seqüenciamento, cuja função é retirar os dNTPs e ddNTPs que não foram incorporados, os restos de enzimas que não foram utilizadas e sais que poderiam atrapalhar o processo de seqüenciamento.

A precipitação foi realizada adicionando-se 80 µl de isopropanol 75% a cada poço da placa de seqüenciamento e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos sob temperatura constante (21ºC) e, em seguida, o sobrenadante foi removido e centrifugado por 1 minuto a 900 rpm sob temperatura constante (21ºC). A placa foi seca a 75ºC por 5 minutos, após o qual foram adicionados 10 µl de formamida seguido por centrifugação por 1 minuto a 21ºC. A placa foi incubada a 95ºC por 5 minutos em termociclador e mantida refrigerada (4ºC) e ao abrigo da luz para posterior seqüenciamento.

3.17. Seqüenciamento

O seqüenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador ABI PRISM®3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems). O processo de seqüenciamento baseia-se na adição, na reação de seqüenciamento, de nucleotídeos modificados carregados com fluorocromos. Estes nucleotídeos não possuem a hidroxila 3', apresentando somente um hidrogênio e impossibilitando a ligação do nucleotídeo seguinte durante o processo de polimerização da fita de DNA. Ao longo deste processo há a formação de inúmeros fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, todos apresentando nucleotídeos marcados na extremidade. Estes fragmentos, uma vez ordenados por tamanho são submetidos a um feixe de laser onde os nucleotídeos modificados emitem luz ao serem excitados. Para cada um dos nucleotídeos (A, T, C e

G) há a emissão de luz em comprimentos de ondas específicos (A = verde, T = vermelho, C = azul e G = amarelo).

3.18. Edição das seqüências

Para cada amostra de DNA fita dupla sequenciada foram obtidas duas seqüências de fita simples, uma referente a fita *forward* e outra para a fita *reverse*. As seqüências *Forward* e *Reverse* de cada amostra foram visualizadas e editadas no programa *4Peaks* versão 1.7.2. Para verificar a qualidade das seqüências procedeu-se a comparação dos cromatogramas, sendo necessário primeiro inverter o sentido da fita *Reverse* e então obter o seu complementar para poder compará-la com a fita *Forward* (Tabela 4). Obtido o reverso complementar da fita *Reverse* procedeu-se a comparação e correção das fitas através da adição ou exclusão de bases, de acordo com o cromatogramas (Figura 3).

Tabela 4 – Lógica do reverso complementar da seqüência *Reversa*.

F (seqüenciado)	**5'- ATTGTCCAATGGCCGCAAATCTAAGCA -3'**
R (seqüenciado)	5'- TGCTTAGATTTGCCGCCATTGGACAAT -3'
R (reverso)	3'- TAACAGGTTACCGCCGTTTAGATTCGT -5'
R (reverso+complementar)	**5'- ATTGTCCAATGGCGGCAAATCTAAGCA -3'**

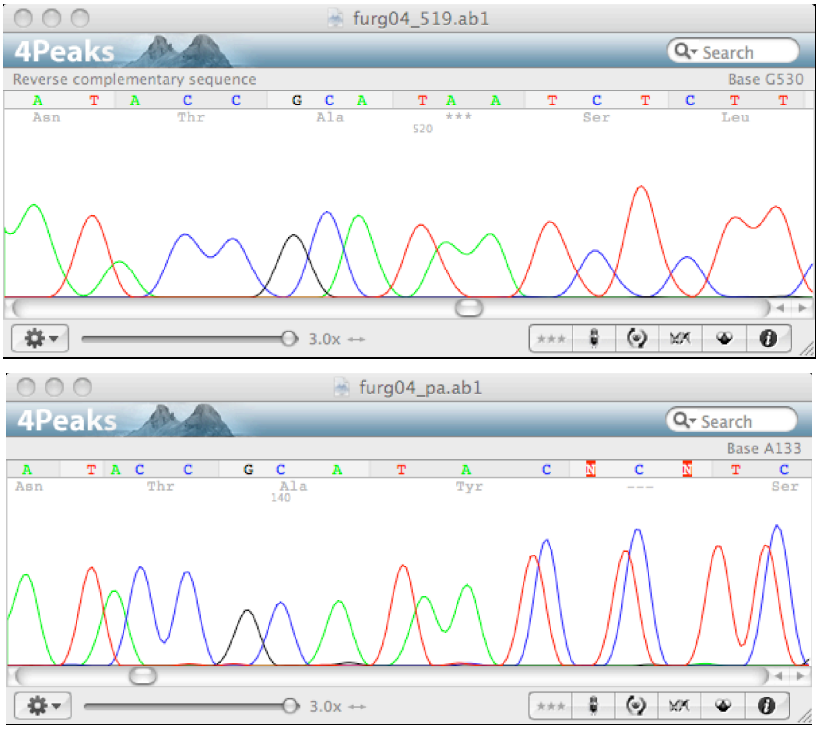

Figura3 - Correção da fita *Forward* baseada no reverso complementar da fita *Reverse*.

3.19. Obtenção da seqüência consenso

Após a comparação e correção das seqüências procedeu-se à obtenção da seqüência Consenso, isto é, aquela resultante da sobreposição das seqüências das fitas *Forward* e *Reverse* corrigidas. Para a obtenção da seqüência Consenso foi utilizado o programa *Geneious Pro* versão 3.7.0, onde as seqüências corrigidas foram importadas para o programa, selecionadas e agrupadas através do comando *Assembly* (Figura 4).

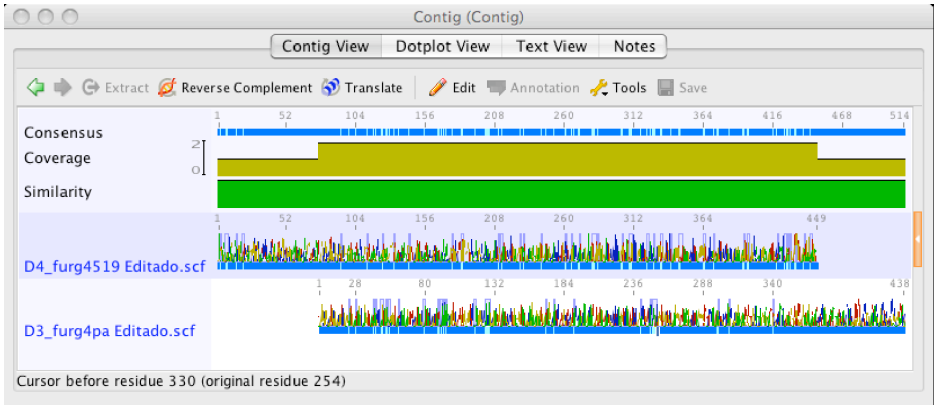

Figura 4 - Obtenção da seqüência Consenso a partir das fitas *Forward* e *Reverse* agrupadas.

3.20. Comparação da seqüência com o GenBank e o Ribossomal Database Project

Em seguida a seqüência Consenso foi extraída para um arquivo próprio em formato FASTA e submetida ao programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para comparação com as seqüências depositadas no repositório mundial de seqüências GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). As seqüências foram comparadas com a base de dados de nucleotídeos BLASTN utilizando-se o algoritmo MEGABLAST, otimizado para a busca de seqüências altamente similares, sendo o resultado classificado de acordo com o valor esperado *e-Value*, que calcula a probabilidade em se obter um resultado similar ao acaso, do valor do escore normalizado (*Bit-Score*) e dos valores de porcentagem de similaridade (*% Similarity*) e de identidade (*% Identical*). Para confirmar os táxons encontrados as seqüências foram comparadas com o banco de dados *Ribossomal Database Project* (http://rdp.cme.msu.edu/) utilizando-se a ferramenta *Sequence Match*, através de comparação com linhagens-tipo isoladas com seqüências de boa qualidade e com mais de 1.200 nucleotídeos.

3.21. Construção dos fenogramas

O resultado obtido a partir da ferramenta BLAST permitiu inferir o gênero ao qual a amostra analisada pertence. Para ampliar a resolução da análise taxonômica realizou-se a construção de fenogramas utilizando-se as espécies-tipos reconhecidas para cada gênero encontrado. As linhagens -tipo válidas foram obtidas a partir do banco de dados *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (http://www.bacterio.cict.fr/) e as respectivas seqüências referentes ao gene utilizado foram obtidas no banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). As seqüências das linhagens-tipo e das amostras obtidas neste estudo foram alinhadas através do programa para alinhamento de seqüências múltiplas *ClustalW* utilizando-se os valores padrão da matriz de peso *ClustalW* e do alinhamento resultante extraiu-se uma região de aproximadamente 500 nucleotídeos que abrangesse todas as seqüências utilizadas. Os fenogramas foram

construídos utilizando-se o programa *Geneious Pro,* o método de construção utilizado foi o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) baseado em matriz de distância de similaridade entre seqüências sendo a taxa evolutiva entre as amostras assumida como constante (relógio molecular), empregou-se o modelo de um parâmetro de substituição de nucleotídeos de Jukes-Cantor e teste de confiança por *Bootstrap* com reamostragem igual a 1000 (Nei 1987, Li & Graur 1991, Baldauf 2003).

4. RESULTADOS

4.1. Crescimento bacteriano

Após o período de incubação foi verificado o crescimento bacteriano nas diferentes diluições (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} e 10^{-8}) realizadas a partir da amostra original não diluída (10^{0}). Observou-se que a maioria das placas contendo as diluições 10^{-2} e 10^{-4} apresentaram crescimento enquanto que aquelas contendo as diluições 10^{-6} e 10^{-8} apresentaram pouco crescimento, sendo este igual ou inferior a $1,0 \times 10^{6}$ e $1,0 \times 10^{8}$ UFC mL^{-1}, respectivamente.

A tabela 5 apresenta os valores de unidades formadoras de colônias (UFC mL^{-1}) obtidos por classe de tamanho e por meio de cultivo. Foi observado um comportamento inverso entre os meios Ágar Tiossulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS), seletivo para o crescimento de vibrios e Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRSA), utilizado para o isolamento de bactérias lácticas, sendo que o número de unidades formadoras de colônias do meio TCBS apresentou uma relação inversa com o tamanho dos peixes, enquanto que no meio MRSA observou-se um uma relação positiva. Para as amostras de Ágar Marinho (MA) e de Ágar Nutriente (NA) não foi possível observar um comportamento definido da variação de UCF, ao longo das classes de tamanho.

Tabela 5 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC mL^{-1}) por classe de tamanho (25 mm, 200 mm e 300 mm) e por meio de cultivo (TCBS, MRSA, MA e NA).

	UFC mL^{-1}		
Meio	**25 mm (n = 5)**	**200 mm (n = 4)**	**300 mm (n = 4)**
TCBS	$3,5 \times 10^{6}$	$1,1 \times 10^{6}$	$2,9 \times 10^{5}$
MRSA	$7,4 \times 10^{5}$	$1,2 \times 10^{6}$	$3,0 \times 10^{6}$
MA	$2,3 \times 10^{5}$	$1,6 \times 10^{6}$	$1,0 \times 10^{6}$
NA	$7,0 \times 10^{6}$	$1,0 \times 10^{4}$	$2,0 \times 10^{6}$

As colônias que cresceram nos diversos meios de cultivo foram separadas de acordo com suas características em oito diferentes morfotipos (tabela 6). Todas as colônias obtidas neste estudo apresentaram superfície convexa e formato redondo, 84%

possuíam borda regular e os outros 16% possuíam borda irregular. O caráter visual mais variável foi a coloração da colônia, onde 30% apresentaram coloração amarelada, 23% coloração alaranjada, 19% coloração esverdeada e 28% coloração branca (Figura 5).

Tabela 6 - Morfotipos obtidos de acordo com coloração, formato, borda e superfície da colônia.

Morfotipo	Coloração	Borda	Formato	Superfície
1	Amarelo	Irregular	Redondo	Convexa
2		Regular		
3	Amarelo-claro			
4	Branco			
5	Laranja			
6	Laranja-claro			
7	Verde			
8	Verde-claro			

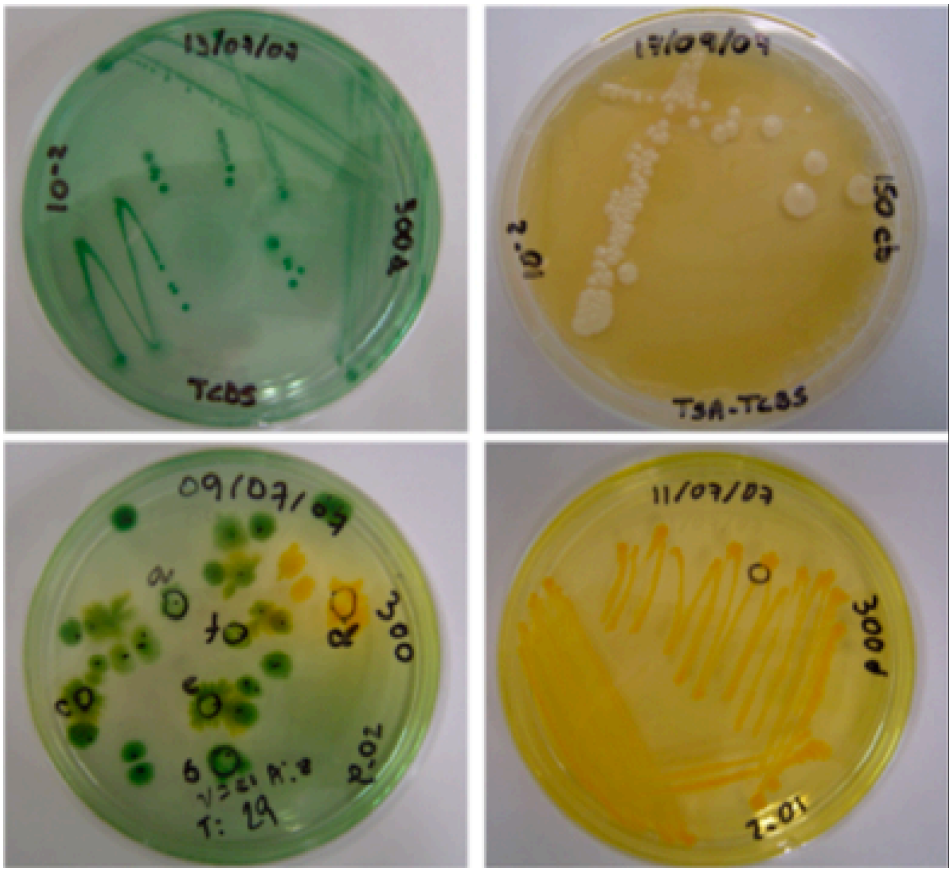

Figura 5 - Exemplo dos morfotipos isolados em meio de cultivo TCBS.

Na tabela 7 apresentam-se os morfotipos obtidos por classe de tamanho, as classes 25 mm (TCBS), 200 mm (MRSA e NA) e 300 mm (MRSA e NA) apresentaram apenas um único morfotipo enquanto que a classe de 25 mm (NA) apresentou o maior

número de morfotipos isolados (n = 5). Os morfotipos 1, 7 e 8 estiveram presentes apenas no meio TCBS enquanto que o morfotipo 6 foi isolado nos meios MA e NA.

Tabela 7 - Morfotipo (e porcentagem) isolado por classe de tamanho (25 mm, 200 mm e 300 mm), por diluição (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} e 10^{-8}) e por meio de cultura (TCBS, MRSA, NA e MA).

	TCBS	**MRSA**	**MA**	**NA**
25 mm	8 (100%)	2 (08%) 3 (50%) 4 (17%) 5 (25%)	2 (12%) 4 (38%) 5 (12%) 6 (38%)	2 (26%) 3 (04%) 4 (40%) 5 (26%) 6 (04%)
200 mm	1 (40%) 2 (60%)	4 (100%)	2 (17%) 3 (50%) 4 (33%)	4 (100%)
300 mm	1 (27%) 2 (09%) 7 (64%)	3 (100%)	3 (67%) 4 (33%)	4 (100%)

No total obteve-se 94 isolados, dentre os quatro meios de cultivo utilizados e os oito morfotipos observados. A classe de tamanho 200 mm apresentou o menor número de isolados (n = 16), independente do meio de cultivo utilizado, enquanto que as classes de 25 mm e 300 mm apresentaram, respectivamente, 52 e 26 isolados cada. A tabela 8 apresenta o número de isolados por classe de tamanho, por diluição e por meio de cultura.

Tabela 8 - Isolados por classe de tamanho (25, 200 e 300 mm), por diluição (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} e 10^{-8}) e por meio de cultura (TCBS, MRSA, NA e MA).

	TCBS				MRSA				NA				MA			
	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}
25 mm	8	2	-	-	7	5	-	-	15	8	-	-	3	4	-	-
200 mm	5	-	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-	3	2	2	-
300 mm	11	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	2	1	-	-

4.2. Extração do DNA genômico

Para a identificação das bactérias isoladas, devido ao considerável número de amostras e ao tempo disponível, optou-se por analisar primeiro as amostras

provenientes dos meios de cultivo TCBS (n = 26) e MRSA (n = 20). A tabela 9 apresenta os valores de concentração e de pureza do DNA extraído obtido através do método de extração utilizado. Em média obteve-se um DNA de boa qualidade com pureza de 84,3 % e com concentração de 502,4 µg de DNA por mililitro.

Tabela 9 - Concentração e pureza dos DNAs extraídos.

Amostra	Concentração (µg/mL)	Pureza (%)	Amostra	Concentração (µg/mL)	Pureza (%)
MRS 01	383,2	91,7	TCBS 01	294,5	87,2
MRS 02	218,2	97,2	TCBS 02	358,9	84,4
MRS 03	652,6	81,1	TCBS 03	748,3	84,4
MRS 04	977,6	85,6	TCBS 04	932,0	87,8
MRS 05	671,6	88,9	TCBS 05	493,0	98,9
MRS 06	1007,1	86,7	TCBS 06	596,0	85,6
MRS 07	1609,1	83,3	TCBS 07	143,1	82,8
MRS 08	1207,1	87,8	TCBS 08	1142,8	89,4
MRS 09	984,1	86,7	TCBS 09	474,6	93,3
MRS 10	344,5	78,3	TCBS 10	846,3	78,3
MRS 11	170,0	82,8	TCBS 11	517,7	76,1
MRS 12	78,3	94,4	TCBS 12	662,1	75,0
MRS 13	120,5	81,1	TCBS 13	627,2	79,4
MRS 14	213,6	82,2	TCBS 14	1080,7	80,0
MRS 15	112,7	80,6	TCBS 15	1030,5	79,4
MRS 16	103,0	78,3	TCBS 16	592,9	80,6
MRS 17	154,3	77,2	TCBS 17	609,1	82,8
MRS 18	212,5	80,6	TCBS 18	520,4	87,8
MRS 19	137,9	71,7	TCBS 19	356,2	82,2
MRS 20	211,3	82,2	TCBS 20	63,0	72,8
			TCBS 21	292,7	87,2
			TCBS 22	476,3	91,1
			TCBS 23	88,9	83,9
			TCBS 24	129,3	75,0
			TCBS 25	43,6	95,6
			TCBS 26	421,2	98,9

4.3. Identificação das espécies bacterianas

A tabela 10 apresenta os resultados da comparação das seqüências obtidas com a ferramenta BLAST do banco de dados GenBank. Todas as amostras de DNA foram amplificadas e seqüenciadas utilizando-se o par de *primers* para o gene 16S rRNA, pois os *primers* específicos *pyrH* (nas formas degenerada e não degenerada) e *pheS* não conseguiram amplificar as amostras, funcionando apenas para os controles positivos.

Todos os controles negativos não apresentaram fluorescência quando submetidos à radiação ultra violeta do transiluminador. As amostras MRS 18, MRS 19, TCBS 01 e TCBS 18 não puderam ser amplificadas pois o estoque havia perdido a viabilidade. As amostras MRS 11, TCBS 15, TCBS 19, TCBS 22 e TCBS 25 não foram sequenciadas pois não foi possível amplificar seus DNAs. As amostras TCBS 14 e TCBS 21 foram sequenciadas mas não foi possível identificar a espécie pois o estoque apresentou contaminação, acarretando uma sobreposição de picos nos cromatogramas. Apenas as fitas reversas foram sequenciadas pois o equipamento apresentou defeito e, portanto, as fitas complementares (*forward*) não puderam ser analisadas.

Tabela 10 - Resultado da identificação das amostras utilizando-se o banco de dados GenBank.

Amostra	**Espécie**	**Amostra**	**Espécie**
MRS 01	Uncultured *Brevibacterium* sp. clone CD04	TCBS 02	Uncultured bacterium clone Feces2clG10
MRS 02	*Brevibacterium* sp. J3	TCBS 03	Uncultured bacterium clone Feces2clG10
MRS 03	Uncultured *Brevibacterium* sp. clone CD04	TCBS 04	Uncultured bacterium clone Feces2clG10
MRS 04	*Brevibacterium* sp. J3	TCBS 05	Uncultured bacterium clone Feces2clG10
MRS 05	*Brachybacterium* sp. srbm-1-t7p	TCBS 06	Uncultured bacterium clone Feces2clG10
MRS 06	Uncultured bacterium clone aab56e10	TCBS 07	Uncultured bacterium clone Feces2clG10
MRS 07	*Brevibacterium* sp. CO63	TCBS 08	*Brachybacterium* sp. PB10
MRS 08	*Brevibacterium* sp. CO63	TCBS 09	Uncultured bacterium clone aab56e10
MRS 09	Uncultured bacterium clone aab56e10	TCBS 10	Uncultured bacterium clone aab56e10
MRS 10	*Staphylococcus epidermidis*	TCBS 11	Uncultured bacterium clone aab56e10
MRS 12	Uncultured bacterium clone Feces2clG10	TCBS 12	Uncultured bacterium clone aab56e10
MRS 13	Uncultured bacterium clone Feces2clG10	TCBS 13	*Staphylococcus* sp. iDCIII2
MRS 14	Uncultured bacterium clone Feces2clF02	TCBS 17	*Brevibacterium* sp. J3
MRS 15	Uncultured bacterium clone Feces2clE04	TCBS 20	Uncultured *Staphylococcus* sp. clone AV 5N -E10
MRS 16	Uncultured bacterium clone Feces2clG10	TCBS 24	*Staphylococcus* sp. iDCIII2
MRS 17	Uncultured bacterium clone Feces2clG10	TCBS 26	*Staphylococcus* sp. iDCIII2
MRS 20	*Staphylococcus* sp. iDCIII2		

A figura 6 apresenta um exemplo do resultado do BLAST obtido para a amostra TCBS 04 com 12 linhagens altamente possíveis para identificar este isolado, possuindo

valor esperado (*e-value*) tendendo a zero, ambos os percentuais de similaridade e de identidade igual 100% e um escore normalizado (*Bit-Score*) de 932,199.

nr GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAGGTAGTGTAGT

E Value	Name	Description	Sequence Length	%Similarity	%Identical	Hit range	Bit-Score
0	EU636460	Uncultured bacterium clone Feces2clG10 16S riboso...	470	100.0%	100.0%	14 - 483	932.199
0	EU636449	Uncultured bacterium clone Feces2clF11 16S riboso...	470	100.0%	100.0%	14 - 483	932.199
0	EU636430	Uncultured bacterium clone Feces2clE04 16S riboso...	470	100.0%	100.0%	13 - 482	932.199
0	EU636423	Uncultured bacterium clone Feces2clD08 16S riboso...	470	100.0%	100.0%	14 - 483	932.199
0	EU636388	Uncultured bacterium clone Feces2clA06 16S riboso...	470	100.0%	100.0%	13 - 482	932.199
0	EU636385	Uncultured bacterium clone Feces2clA03 16S riboso...	470	100.0%	100.0%	13 - 482	932.199
0	DQ530294	Photobacterium damselae strain UCP4 16S ribosoma...	470	100.0%	100.0%	13 - 482	932.199
0	AY163245	Photobacterium damselae subsp. piscicida strain CV...	470	100.0%	100.0%	2 - 471	932.199
0	AY147861	Photobacterium damselae subsp. damselae strain C...	470	100.0%	100.0%	16 - 485	932.199
0	DQ146992	Vibrio sp. V781 16S ribosomal RNA gene, partial se...	470	100.0%	100.0%	12 - 481	932.199
0	AB032015	Photobacterium damselae subsp. damselae gene for...	470	100.0%	100.0%	17 - 486	932.199
0	AB032014	Photobacterium histaminum gene for 16S rRNA, part...	470	100.0%	100.0%	17 - 486	932.199
0	EU636461	Uncultured bacterium clone Feces2clG11 16S riboso...	470	99.8%	99.8%	14 - 483	924.27
0	EU636445	Uncultured bacterium clone Feces2clF07 16S riboso...	470	99.8%	99.8%	13 - 482	924.27

Figura 6 - Exemplo do resultado do *BLAST* obtido para a amostra TCBS 04.

Como 50% do resultado do BLAST obtido para a amostra TCBS 04 não faz indicação de gênero (*Uncultured bacterium clone*) e os outros 50% apontam dois gêneros (*Photobacterium* 42% e *Vibrio* 8%) resolveu-se comparar a seqüência da amostra TCBS 04 com o banco de dados *Ribossomal Database Project*. O resultado da comparação apresentou novamente os dois gêneros mas o valor do escore obtido para o gênero *Photobacterium* foi maior que o obtido para o gênero *Vibrio*. Para poder localizar a espécie dentro do gênero proposto (*Photobacterium*) procedeu-se a construção do fenograma, contendo as linhagens-tipo do gênero. As linhagens-tipo foram obtidas no banco de dados *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (http://www.bacterio.cict.fr/), na figura 7 temos como exemplo a lista de linhagens com oito opções (ATCC 33539 = CAIM 331 = CCUG 13626 = CDC 2588-80 = CIP 102761 = IFO (now NBRC) 15633 = DSM 7482 = LMG 7892 = NCTC 11647) para a linhagem-tipo *Photobacterium damselae*. O gênero *Photobacterium* é composto por 20 espécies, sendo necessário obter as linhagens para as 20 linhagens-tipo para poder criar o fenograma.

Photobacterium damselae corrig. (Love *et al.* 1982) Smith *et al.* 1991, comb. nov.
Type strain (see also StrainInfo.net): strain ATCC 33539 = CAIM 331 = CCUG 13626 = CDC 2588-80 = CIP 102761 = IFO (now NBRC) 15633 = DSM 7482 = LMG 7892 = NCTC 11647.
Basonym: ¤ *Vibrio damsela* Love *et al.* 1982.
Other synonym: ¤ *Listonella damsela* (Love *et al.* 1982) MacDonell and Colwell 1986.
Reference: SMITH (S.K.), SUTTON (D.C.), FUERST (J.A.) and REICHELT (J.L.): Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love *et al.*) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991, **41**, 529-534.

Figura 7 - Opções de linhagens para a linhagem-tipo *Photobacterium damselae*.

A seqüência para o gene 16S rRNA para a espécie-tipo *Photobacterium damselae* foi obtida através do banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e salva em formato FASTA como exemplificado nas figuras 8 e 9.

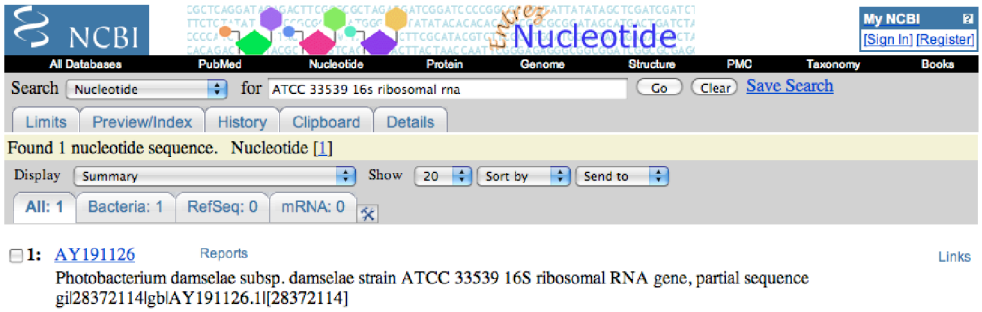

Figura 8 - Busca da seqüência para o gene 16S rRNA para espécie-tipo *Photobacterium damselae* linhagem ATCC 33539.

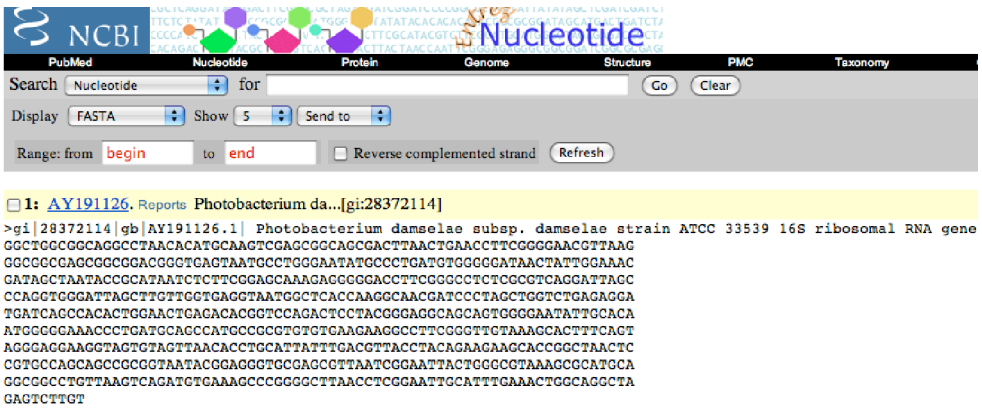

Figura 9 - Obtenção da seqüência para o gene 16S rRNA para espécie-tipo *Photobacterium damselae* linhagem ATCC 33539.

Após a obtenção das seqüências referentes ao gene 16S rRNA para todas as 20 linhagens-tipo do gênero *Photobacterium* procedeu-se ao alinhamento destas com as seqüências das amostras a serem identificadas. Terminado o processo de alinhamento, buscou-se uma região onde todas as seqüências estivessem representadas (figura 10) e, então, transferiu-se as informações desta região para um novo arquivo.

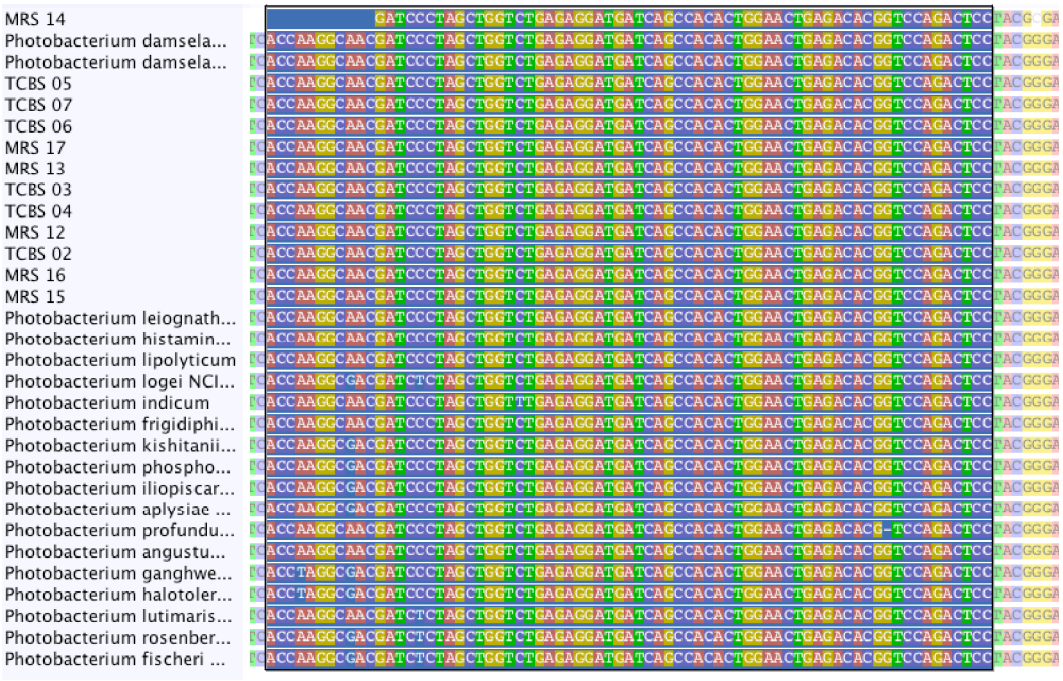

Figura 10 - Alinhamento das seqüências de 16S rRNA para o gênero *Photobacterium*.

O arquivo resultante foi utilizado para construir o fenograma do gênero, com as amostras a serem identificadas incluídas (figura 11). As figuras 11, 12, 13 e 14 apresentam os fenogramas obtidos para os gêneros *Photobacterium*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium* e *Brachybacterium*, respectivamente, os valores de *bootstrap* variaram de 50 a 100% e os números apresentados indicam os números de substituição por sítio das seqüências alinhadas.

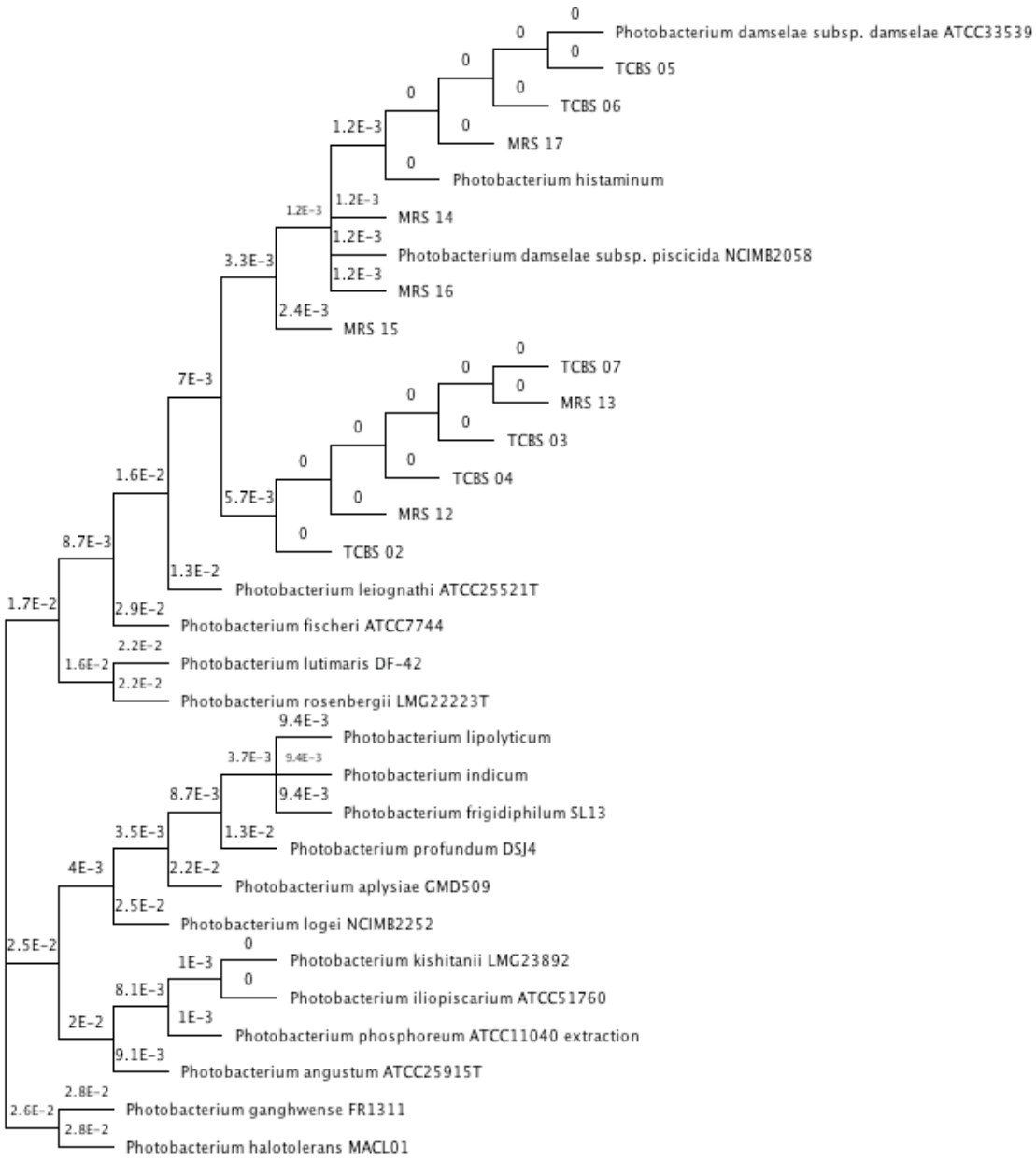

Figura 11 - Fenograma do gênero *Photobacterium* construído com as seqüências parciais do gene 16S rRNA (aproximadamente 500 nucleotídeos).

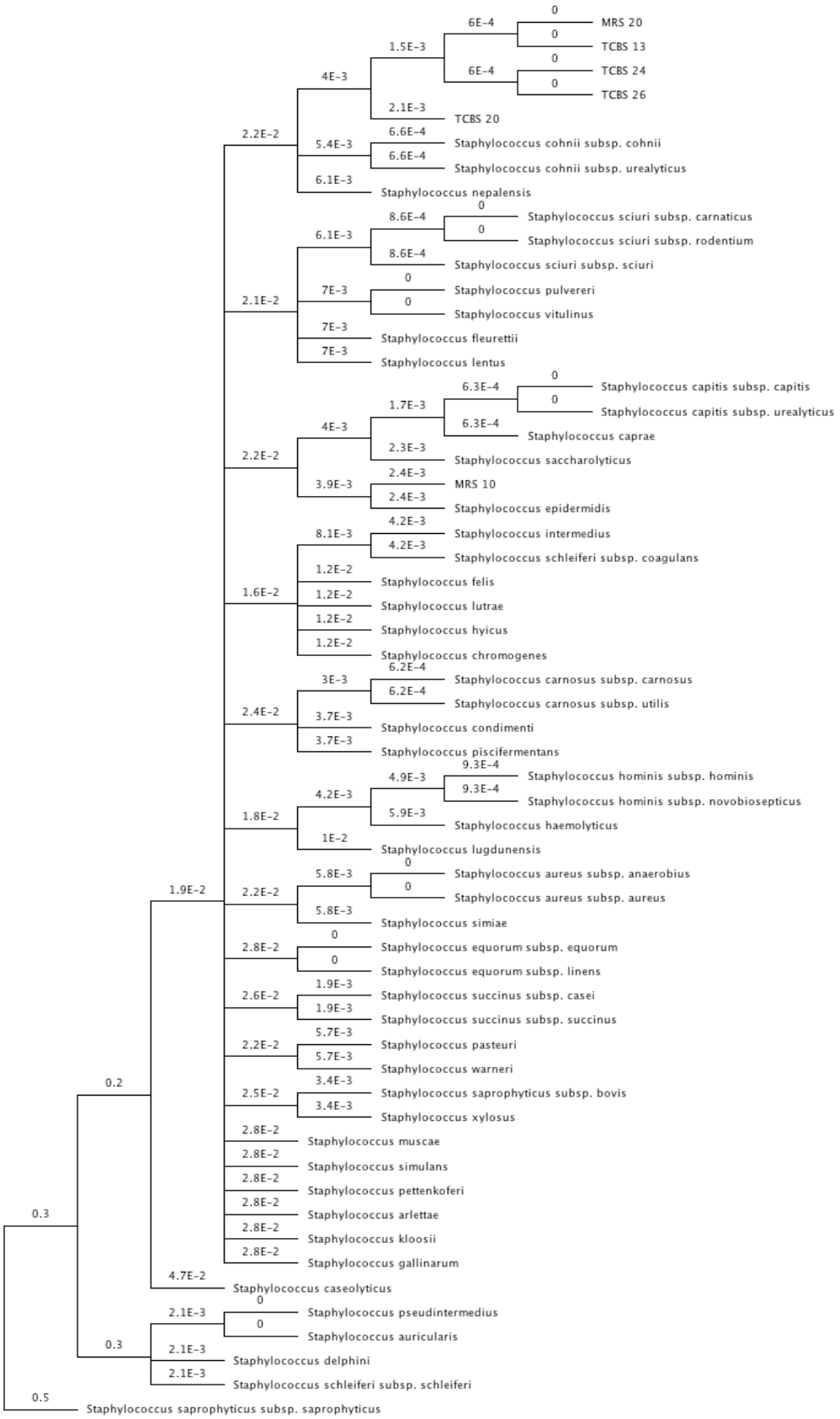

Figura 12 - Fenograma do gênero *Staphylococcus* construído com as seqüências parciais do gene 16S rRNA (aproximadamente 500 nucleotídeos).

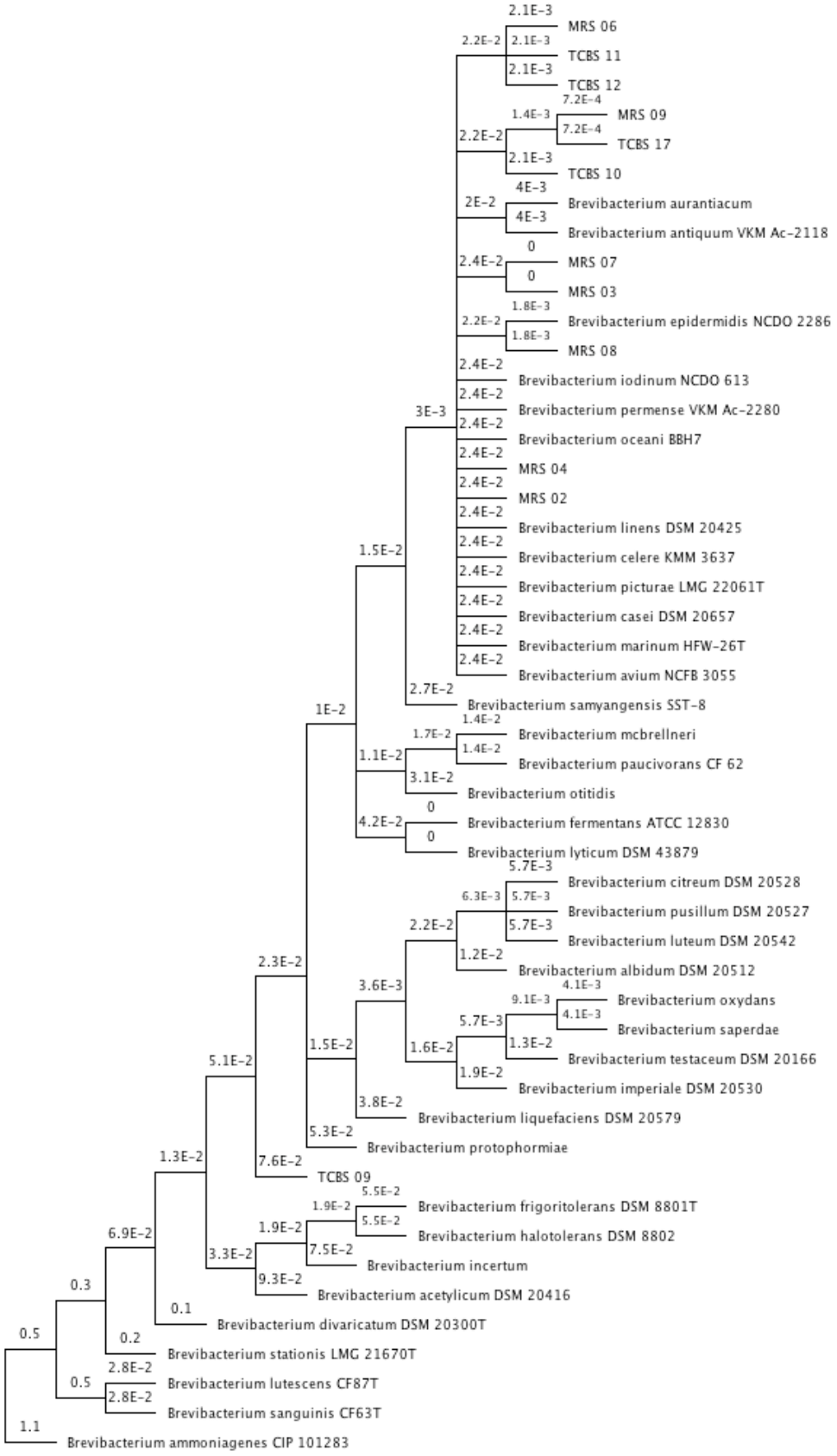

Figura 13 - Fenograma do gênero *Brevibacterium* construído com as seqüências parciais do gene 16S rRNA (aproximadamente 500 nucleotídeos).

Figura 14 - Fenograma do gênero *Brachybacterium* construído com as seqüências parciais do gene 16S rRNA (aproximadamente 500 nucleotídeos).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo isolar, cultivar e identificar bactérias, especialmente do grupo das bactérias lácticas, com potencial para uso como organismo probiótico, a ser utilizado na melhoria do cultivo de organismos aquáticos. Neste estudo, procuramos obter bactérias lácticas do trato intestinal do peixe linguado *Paralichthys orbignyanus*, de alto valor comercial, mas cabe ressaltar que a metodologia empregada no presente trabalho poderá ser também utilizada na obtenção de microorganismos probióticos para uso em cultivos de outras espécies de peixe, crustáceos e moluscos.

Com relação a primeira fase da metodologia empregada, isto é, isolamento de bactérias do trato digestivo, verificou-se em nosso estudo baixos valores de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (10^4 – 10^6 UFC mL^{-1}) em comparação com o valor de 10^8 UFC g^{-1} normalmente encontrado em estudos com tratos intestinais de peixes (Ringø *et al.* 1995). Com relação a outras espécies de linguados, Sugita *et al.* (2002) em um estudo com larvas e juvenis de linguados da espécie *Paralichthys olivaceus*, alimentadas com quatro rações comerciais encontraram valores totais de bactérias viáveis entre 1,4 x 10^4 a 2,5 x 10^7 UFC g^{-1} isolados em três meios de cultivo, Ágar Tiossulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS), Ágar Peptona-Extrato de Levedura-Extrato de Bife-Glucose (PYBG, não-seletivo para contagem) e Ágar para Bactérias Marinhas Anaeróbias Gram Positivas (MAGPC). Em outro estudo com esta mesma espécie, mas utilizando peixes de aproximadamente 10 g de peso total, Sugita & Ito (2006) encontraram valores de UFC g^{-1} entre 10^6 e 10^8 para amostras semeadas em TCBS. Já Rengpipat *et al.* (2008), trabalhando com o isolamento de bactérias lácticas do trato digestivo em juvenis do *Seabass* (*Lates calcarifer*), encontraram valores entre 10^6 e 10^8 UFC g^{-1} utilizando o meio Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRSA). Por outro lado, Makridis *et al.* (2005) estudando linguados da espécie *Solea senegalensis* de aproximadamente 150 mm CT (80 g) e utilizando dois dos quatro meios de cultivos utilizados no presente trabalho (TCBS e Ágar Marinho - MA) também encontraram baixos valores de UFC g^{-1} (variando entre 10^3 e 10^4) porém, sem explicar estes baixos valores.

Uma possível explicação para o baixo número de UFC encontrados em todos os meios empregados em nosso estudo pode ser o tempo decorrido entre a coleta e a semeadura das bactérias provenientes dos tratos digestivos (72 horas), além das condições de transporte empregadas (refrigeração), que podem ter influenciado negativamente a viabilidade dos microrganismos. Outra possibilidade refere-se à temperatura de incubação empregada em nosso estudo (27º C) pois, apesar de estar de acordo com a literatura, existem trabalhos que utilizam uma temperatura de incubação menor (20 - 22º C) (Eddy & Jones 2002, Sugita *et al.* 2002, Balcázar *et al.* 2007).

De maneira geral, os meios de cultivo utilizados no presente trabalho permitiriam abranger uma ampla variedade de grupos de bactérias. Os meios TCBS e MRSA, por serem seletivos, apresentariam, em princípio, um número menor de UFCs enquanto que a utilização de meios não seletivos permitiria a obtenção de um maior número de bactérias cultiváveis. O meio MA é um meio de amplo espectro comumente utilizado para o isolamento de bactérias marinhas heterotróficas mas, devido a presença de sal (NaCl) em sua composição, espécies com baixa tolerância ao sal, ou que possuem o crescimento inibido pela presença deste elemento não são capazes de crescer neste meio. Em razão disto utilizou-se também o meio Ágar Nutriente (NA), meio de amplo espectro que não possui sal em sua composição.

Com relação a concentração de bactérias (UFCs) por classe de tamanho dos peixes analisados verificou-se que para a classe de 25 mm o meio NA apresentou os maiores valores de UFC ($7,0 \times 10^6$), seguido pelo meios TCBS ($3,5 \times 10^6$), MRSA ($7,4 \times 10^5$) e MA ($2,3 \times 10^5$), respectivamente. Para a classe 200 mm, ao contrário, o meio MA apresentou os maiores valores de UFC ($1,6 \times 10^6$), seguido pelos meios MRSA ($1,2 \times 10^6$), TCBS ($1,1 \times 10^6$) e, finalmente, pelo meio NA com o menor valor de UFC registrado ($1,0 \times 10^4$). A classe de 300 mm, da mesma forma, apresentou um comportamento distinto das demais com o meio MRSA apresentando o maior valor de UFC ($3,0 \times 10^6$), seguido por NA ($2,0 \times 10^6$), MA ($1,0 \times 10^6$) e TCBS ($2,9 \times 10^5$). Esta variação quanto ao número de unidades formadoras de colônias por classe de tamanho pode ser explicada, em parte, pelo fato de que cada classe de peixe foi proveniente de tanques de cultivo diferentes. Apesar disto, o regime alimentar das três classes de tamanho foi semelhante, sendo oferecido a todos a mesma ração, apenas ajustando a granulometria da ração de acordo com a classe de tamanho. A taxa de renovação diária

da água dos tanques foi de aproximadamente 90% do volume. Os tanques da classe de 25 mm foram mantidos sob temperatura constante (23º C) enquanto que os tanques das classes maiores (200 e 300 mm) não tiveram a temperatura controlada (temperatura ambiental).

Outra possibilidade a ser considerada é que existam diferenças ontogenéticas na abundância e composição da comunidade bacteriana dos peixes de diferentes tamanhos, apesar da alimentação semelhante. Por exemplo, Eddy & Jones (2002) trabalhado com larvas (1 a 94 dias após a eclosão) do linguado *Paralichthys dentatus* chegou a conclusão de que a microbiota do trato digestivo já se encontrava estabelecida, com uma população autóctone e estável, logo após o processo de metamorfose. Ainda de acordo com estes autores, a microbiota apresentaria um aumento na sua diversidade (principalmente de *Vibrio*) relacionado com a ontogenia, influenciado pela oferta de fitoplâncton, rotíferos e de *Artemia* no sistema de cultivo. Condições similares de variações ontogenéticas da comunidade bacteriana no trato intestinal também podem ocorrer para *Paralichthys orbignyanus* entretanto esta hipótese precisa ser testada.

A relação inversa observada entre os valores de UFC e os meios TCBS e MRSA entre as diferentes classes de tamanho, poderia estar relacionada a um possível efeito inibitório das bactérias lácticas sobre os *Vibrio* presentes no trato digestivo ao longo das classes de tamanho. É conhecido o fato de que bactérias lácticas possuem a capacidade de produzir bacteriocinas como forma de inibir a competição interespecífica, seja esta por acesso a substrato para colonização ou por acesso a nutrientes (Gatesoupe 1994, Makridis *et al.* 2005, Tinh *et al.* 2008). No entanto, de acordo com os resultados do seqüenciamento, a serem discutidos mais adiante, não foi possível comprovar esta hipótese, pois não foi encontrado nenhuma bactéria láctica ou do gênero *Vibrio* crescendo nos meios específicos. Por outro lado, a possível produção de substâncias inibitórias por parte de alguma espécie de bactéria isolada nestes meios será avaliada futuramente em testes *in vitro* e *in vivo* (veja o item "Perspectivas Futuras" para maiores esclarecimentos).

No total foram caracterizados oito morfotipos diferentes. Deve-se ressaltar que o seqüenciamento foi feito apenas para sete morfotipos (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8), pois o morfotipo 6 esteve presente apenas nos meios MA e NA, que não foram seqüenciados neste trabalho. Pelos resultados de nosso estudo fica claro que um mesmo morfotipo

pode estar relacionado a distintas espécies e até mesmo gêneros de bactérias. Por exemplo, na classe de tamanho 25 mm do meio TCBS ocorreu apenas 1 morfotipo (8) e, no entanto, de acordo com o seqüenciamento este morfotipo apresentou três gêneros distintos de bactérias (*Brachybacterium*, *Brevibacterium* e *Staphylococcus*). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que, como o meio TCBS não é propício para estes gêneros, estes mantiveram um crescimento baixo, produzindo colônias pequenas e com mesma coloração. O inverso ocorreu para o meio MRSA, onde bactérias apresentando quatro morfotipos foram identificadas como pertencendo a estes mesmos três gêneros.

O meio TCBS apresentou, para a classe de tamanho 200 mm, 2 morfotipos (1 e 2) ambos pertencentes ao gênero *Staphylococcus,* enquanto que o meio MRSA apresentou apenas um morfotipo (4), também identificado como *Staphylococcus*. A classe de tamanho 300 mm, cultivada em TCBS, apresentou três morfotipos (1, 2 e 7) identificados como *Staphylococcus* e *Photobacterium*. Para o meio MRSA o morfotipo 3 foi identificado como sendo *Photobacterium*, agrupando com o morfotipo 7 isolado em TCBS. Os isolados, pertencentes ao gênero *Brevibacterium* apresentaram morfotipo 3, 5 e 6 quando cultivados em meio MRSA e morfotipo 8 quando cultivados em meio TCBS. Os isolados de *Brachybacterium* apresentaram morfotipo 3 em meio MRSA e 8 em meio TCBS enquanto que os isolados do gênero *Staphylococcus* apresentaram morfotipo 2 e 4 em MRSA e morfotipo 1 em TCBS. O que se pode concluir, é que as mesmas espécies cultivadas em meios diferentes levaram a formação de colônias com diferentes características, dando a falsa impressão de uma maior variedade de espécies isoladas. Além do mais, de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, fica evidente que espécies não-alvo podem ser isoladas a partir de meios seletivos para outras espécies ou grupos específicos de bactérias. Uma forma de contornar esta situação seria confirmar se os isolados que cresceram nos meios seletivos pertencem ao grupo-alvo através da utilização de testes bioquímicos, que permitiriam identificar previamente o gênero, ou até mesmo a espécie (Austin 1988). Outra feramenta que permitiria confirmar a presença das espécies-alvo nas amostras seria a utilização da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*) (Zwirglmaier 2005).

Como dito anteriormente, os isolados identificados por seqüenciamento do gene 16S rRNA estavam relacionados a quatro gêneros distintos: *Photobacterium*,

Brevibacterium, *Brachybacterium* e *Staphylococcus*. O gênero *Photobacterium* é constituído por bactérias Gram negativas pertencente a família *Vibrionaceae*, sendo atualmente composto por 19 espécies e 2 subespécies (Euzéby 1997). As espécies pertencentes a este gênero são facilmente encontradas no ambiente marinho e muitas são capazes de produzir bioluminescência como, por exemplo, a espécie *Photobacterium phosphoreum*, que vive em simbiose com diversas espécies de peixes, lulas e cifozoários. No entanto, algumas espécies deste gênero são patogênicas, causando graves problemas aos organismos infectados (Thompson *et al.* 2006). O gênero *Staphylococcus* é composto por 41 espécies e 24 subespécies, pertencente a ordem *Bacilli* este gênero divide com a ordem *Lactobacillales* (bactérias lácticas) o mesmo ancestral comum. As espécies que compõem este gênero são bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas produzindo ácido láctico como produto da respiração anaeróbia (fermentação) e a maioria apresenta risco para a saúde (Lindsay, 2008). Os representantes deste gênero podem ser encontrados nos mais diversos ambientes desde corais até a superfície de queijos mas, principalmente, associados a epiderme de seres humanos e de outros organismos (Austin 1988, Place *et al.* 2003, Harakeh *et al.* 2006). O gênero *Brevibacterium* é composto por 39 espécies bacterianas, sendo todas Gram positivas de metabolismo aeróbio. Espécies pertencentes a este gênero podem ser isoladas dos mais diversos ambientes como produtos derivados do leite, epiderme, ambiente clínico, solo, sedimento, oceano e pinturas medievais (Euzéby 1997). A maioria dos representantes deste gênero possui importância industrial (produção de queijos), não apresentando risco para a saúde, no entanto, algumas espécies como *Brevibacterium casei* podem provocar infecções oportunistas (Onraedt *et al.* 2005). O gênero *Brachybacterium* é um gênero pequeno, pertencendo a mesma sub-ordem do gênero *Brevibacterium* (*Micrococcineae*) possuindo apenas 12 representantes, todos Gram positivos não formadores de esporos e de metabolismo tanto aeróbio quanto anaeróbio e, assim como o gênero *Brevibacterium*, os representantes deste gênero podem ser isolados dos mais diversos ambientes (Euzéby 1997). Até o presente momento apenas três espécies foram isoladas a partir de amostras de ambiente marinho, *Brachybacterium zhongshanense, Brachybacterium phenoliresistens* e *Brachybacterium paraconglomeratum*, sendo esta última de interesse veterinário por apresentar

patogenidade em esponjas marinhas (Montalvo *et al.* 2005, Chou *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007).

É curioso notar que os quatro gêneros foram recuperados em ambos os meios específicos utilizados (TCBS e MRSA), independente da seletividade do meio. Por exemplo, o gênero *Photobacterium*, que pertence a mesma família do gênero *Vibrio* (*Vibrionaceae*), foi isolado a partir do meio TCBS como esperado mas, também foi isolado a partir do meio MRSA, eletivo para bactérias lácticas. Da mesma forma, sabe-se que bactérias do gênero *Staphylococcus* são capazes de crescer no meio seletivo para *Vibrios* (TCBS) (Thompson *et al.* 2006), entretanto, não há informação a respeito da sua capacidade de crescimento no meio MRSA. Para os gêneros *Brevibacterium* e *Brachybacterium* não há nenhuma informação sobre isolamento feito a partir dos dois meios utilizados em nosso estudo. De acordo com o fabricante, apesar da seletividade dos meios, espécies diferentes daquelas aos quais os meios se propõem a isolar podem crescer sem, no entanto, mencionar gêneros ou espécies.

Com relação ao isolamento dos diferentes tipos de bactéria por classe de tamanho do peixe, verificou-se que os isolados da classe de tamanho 25 mm apresentaram três gêneros (*Brachybacterium*, *Brevibacterium* e *Staphylococcus*), os isolados da classe de 200 mm eram compostos de apenas um gênero (*Staphylococcus*) e os isolados da classe de 300 mm eram compostos de dois gêneros (*Photobacterium* e *Staphylococcus*). Acredita-se que a classe de tamanho 25 mm tenha apresentado o maior número de gêneros devido ao fato de ter apresentado também o maior número de UFC, além de ter tido o maior número de isolados identificados através do seqüenciamento. Tais diferenças poderiam estar relacionadas com o fato de que os peixes de diferentes tamanhos foram coletados em tanques diferentes, porém, uma possível relação entre a ontogenia e a diversidade não pode ser descartada. Eddy & Jones (2002) verificaram um aumento na diversidade da comunidade microbiana do trato digestivo de larvas do linguado *Paralichthys dentatus* relacionado com a ontogenia. Larvas de 1-15 DAE (dias após a eclosão) apresentaram baixos valores de UFC (MA = 10^3 UFC larva^{-1} e TCBS = 10^1 UFC larva^{-1}) sendo a microbiota basicamente composta pelos gêneros *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Moraxella* e *Pseudomonas*. As larvas de 16-29 DAE apresentaram cerca de 10^4 UFC larva^{-1}, tanto para MA quanto para TCBS, sendo que 80% da microbiota foi constituída por vibrios, além da presença dos gêneros

Acinetobacter, *Enterobacter* e *Moraxella*. A partir desta classe o grupo *Flavobacterium*/*Cytophaga* não foi mais detectado. Nas duas classes seguintes, 30-49 e 50-95 DAE, o número de UFC se manteve estável, entre 10^4 e 10^5 UFC larva^{-1}, assim como a diversidade da microbiota porém, com uma ligeira redução na abundância de vibrios. As diferentes classes foram alimentadas com rotíferos (1-15 DAE), *Artemia* ou ração (16-29 e 30-49 DAE) e apenas com ração (50-95 DAE). De acordo com os resultados encontrados por estes autores, as larvas apresentam uma microbiota já estabelecida desde cedo, havendo apenas uma variação quanto a dominância ao longo da ontogenia. Munro *et al.* (1994) chegaram a mesma conclusão trabalhando com larvas do turbot *Scophthalmus maximus*, apresentando dominância de *Vibrio* e de *Aeromonas* em todas as classes de tamanho.

Com relação a terceira etapa deste trabalho, isto é, identificação das espécies isoladas, verificou-se que de acordo com os fenogramas construídos a partir das informações do seqüenciamento genético, o gênero *Photobacterium* foi constituído por cinco espécies das quais quatro não se agruparam com nenhuma espécie-tipo, podendo ser consideradas como possíveis espécies não descritas, e uma outra bactéria foi identificada como sendo *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* ATCC 33539 devido sua "proximidade" genética. A espécie *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, originalmente descrita como *Vibrio damsela* (1981) e depois reclassificada como *Listonella damsela* (1985), atualmente encontra-se classificada no gênero *Photobacterium* (Thompson *et al.* 2006). É um importante microrganismo patogênico encontrado em cultivos de peixes e de crustáceos, causando ulcerações seguidas de infecções graves acarretando na morte do indivíduo, inclusive de seres humanos (Love *et al.* 1981, Morris *et al.* 1982, Vaseeharan *et al.* 2007). Sua patogenicidade é atribuída a produção de citolisinas, de exotoxinas e de neuraminidase, proteína relacionada ao fator de virulência de microrganismos, facilitando a adesão no organismo hospedeiro (Kreger 1984, Sugita *et al.* 2000).

O gênero *Staphylococcus* foi constituído por quatro isolados, sendo um (MRS 10) aparentemente relacionado com a espécie-tipo *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044, enquanto que as demais não se agruparam com nenhuma outra espécie-tipo. A espécie *Staphylococcus epidermidis*, além de ser associada com doenças em seres humanos (Freestone *et al.* 2008, Longeon *et al.* 2004), também foi descrita como sendo

patogênica para peixes em pelo menos dois episódios distintos, no Japão em 1981 e em Taiwan entre 1992 e 1996, os principais sintomas apresentados foram exoftalmia e ulcerações, levando a morte dos organismos (Kusuda & Kawai 1998, Huang *et al.* 1999). Esta espécie produz colônias de tamanho pequeno com 1-2 mm de diâmetro e com coloração branca ou amarela e, apesar de não produzir hemolisina, a espécie é capaz de produzir exotoxinas capazes de romper membranas celulares (citolisinas).

Os isolados relacionados com o gênero *Brevibacterium* compõem um maior número de possíveis espécies (11), mas apenas um isolado (MRS 08) ficou agrupado com uma espécie-tipo (*Brevibacterium epidermidis* NCDO 2286) enquanto que os outros isolados não se agruparam com nenhuma podendo, neste caso, haver um grande número de possíveis espécies não descritas. *Brevibacterium epidermidis* é uma espécie Gram positiva em forma de bacilo e as colônias apresentam coloração amarela, não é formadora de esporos e não produz hemolisinas, ainda assim, pode ser associada a infecções oportunistas em seres humanos (Funke & Carlotti 1994). Apesar de ter sido originalmente isolada a partir de tecido epitelial de seres humanos, estudos conseguiram isolar esta espécie a partir de amostras de biofilme marinho. Apesar do epíteto específico das espécies *Brevibacterium epidermidis* e *Staphylococcus epidermidis* sugerirem como sendo provenientes de tecido epidermal (principalmente de seres humanos), sabe-se que ambas podem ser encontradas em ambientes marinhos, sendo inclusive isoladas do trato digestivo de peixes (Kusuda & Sugiyama 1981, Allen *et al.* 1983, Austin *et al.* 1992, Grisez *et al.* 1997, Kusuda & Kawai 1998).

Apenas dois isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Brachybacterium*, um aparentemente relacionado com o agrupamento formado pelas espécies-tipo *Brachybacterium conglometarum* NCIB 9859 e *Brachybacterium paraconglometarum* LMG 19861T e outro agrupado com a espécie *Brachybacterium phenoliresistens*. A respeito das espécies *Brachybacterium conglometarum* e *Brachybacterium paraconglometarum* poucas são as informações disponíveis na literatura, sabendo-se apenas que ambas foram descritas em 1995 e que são provenientes de ambientes distintos como trato digestivo de aves (*B. paraconglometarum*) e de salmoura (*B. conglometarum*) (Takeuchi *et al.* 1995). Da mesma forma, a espécie *B. phenoliresistens* também é uma espécie recente, sendo descrita em 2007 e proveniente de sedimentos costeiros de Taiwan contaminados com

óleo (Chou *et al.* 2007). Destas três espécies, até o momento apenas *B. paraconglometarum* possui interesse veterinário por ser patogênica em aves (Euzéby 1997). Os dezenove isolados que não agruparam com nenhuma espécie-tipo podem ser considerados como possíveis espécies não descritas, no entanto, novas análises devem ser realizadas para confirmar esta hipótese. O seqüenciamento com *primers* mais específicos, o seqüenciamento de multilocus (MLSA) assim como a hibridização DNA-DNA (Thompson *et al.* 2005; 2007) são opções que poderiam ser utilizadas para confirmar se os dezenove isolados constituem espécies não descritas ou se o gene 16S rRNA não possui resolução taxonômica suficiente para identificação destes organismos.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram que a metodologia empregada para o isolamento, extração, amplificação, purificação e seqüenciamento do DNA das bactérias isoladas do trato digestivo são eficientes. No entanto algumas questões precisam ser melhor esclarecidas. Por exemplo, o primeiro método de extração de DNA utilizado foi a aplicação de choque térmico, indicado para bactérias Gram negativas (como *Photobacterium*), mas os isolados tratados por este método não apresentaram DNA extraído ao serem examinados por eletroforese. Outra questão se refere ao *primer* indicado para *Vibrios* (*pyrH*) que não amplificou nenhuma amostra, apesar do gênero *Photobacterium* possuir este gene e do *primer* ter amplificado o DNA do controle positivo (*Vibrio cholerae* El Tor). Da mesma forma, o gênero *Staphylococcus* possui ambos os genes *pheS* e *pyrH* e, no entanto, nenhum dos dois *primers* amplificou o DNA destas amostras. Todas as amostras só conseguiram ser amplificadas com o *primer* para o gene 16S rRNA, o que indica que os DNAs extraídos possuíam qualidade e pureza necessárias para a realização do PCR. E, finalmente, deve-se verificar o motivo pelo qual os meios seletivos utilizados não apresentaram seletividade. A metodologia empregada para amostragem também esteve de acordo com a literatura, no entanto, o tempo decorrido entre a coleta e a análise das amostras (72 horas) e a forma de transporte (refrigeração) não são os recomendados para análises de microbiologia e, portanto, podem ter comprometido a integridade das amostras gerando algumas das incongruências observadas em nossos resultados. Além disto, a utilização de choque térmico para sacrificar os indivíduos talvez tenha que ser substituída pela administração de dose letal do anestésico MS-222 (Gauger *et al.* 2006, Balcázar *et al.* 2007).

6. CONCLUSÕES

1) Os números de unidades formadoras de colônias encontrados (10^4 - 10^6 UFC mL^{-1}) mantiveram-se abaixo do esperado para o trato gastrointestinal de organismos marinhos (10^6 - 10^8 UFC mL^{-1}).

2) Não foi possível isolar bactérias lácticas ou espécies de *Vibrio* a partir das amostras utilizando-se os meios de cultivo eletivos MRSA e TCBS, respectivamente.

3) Acredita-se que as metodologias para coleta e transporte empregadas, além do tempo decorrido entre coleta e análise das amostras, tenham influenciado a comunidade bacteriana presente no trato gastrointestinal.

4) O sequenciamento dos isolados provenientes dos meios de cultivo eletivos (MRSA e TCBS) permitiram identificar quatro gêneros bacterianos (*Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Photobacterium* e *Staphylococcus*).

5) Dentre os quatro gêneros as seguintes espécies foram identificadas: *Brachybacterium phenoliresistens*, *Brevibacterium epidermidis*, *Photobacterium damselae* ssp. *damselae* e *Staphylococcus epidermidis*.

6) Dezenove isolados não agruparam com nenhuma linhagem-tipo permitindo supor que podem se tratar de espécies não descritas.

7. PERSPECTIVAS

1) Aqueles isolados cujo seqüenciamento do gene 16S rRNA não resultaram numa identificação precisa da espécie e que, consequentemente, podem ser possíveis espécies ainda não descritas deverão ser novamente analisadas utilizando *primers* específicos para cada gênero anteriormente identificado (através do seqüenciamento do gene 16S rRNA). Isto permitirá uma maior e melhor resolução taxonômica, posicionando corretamente os isolados em relação as espécies-tipo, ou confirmando-se a ocorrência de novas espécies.

2) Da mesma forma, os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Photobacterium* deverão ser submetidos, novamente, ao seqüenciamento do gene específico (*pyrH*) a fim de confirmar suas identidades, além do fato de verificar a razão pela qual o *primer* específico para este gene utilizado anteriormente não obteve sucesso na amplificação do gene *pyrH*.

3) As amostras isoladas a partir dos meios Ágar Marinho (MA) e Ágar Nutriente (NA), que não foram analisadas nesta primeira etapa do trabalho, deverão ser analisadas através do seqüenciamento do gene 16S rRNA. Espera-se, com isto, verificar a presença de outras espécies que não foram detectadas anteriormente a partir dos meios seletivos Ágar Tiossulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) e Ágar Man-Rogosa-Sharpe (MRSA). Acredita-se que o número de espécies identificadas aumentará, contribuindo ao conhecimento da composição e da diversidade da comunidade bacteriana do trato gastrointestinal dos linguados. Caso o resultado do seqüenciamento do gene 16S rRNA não permita o agrupamento dos isolados com as espécies-tipo, *primers* específicos deverão ser utilizados para a obtenção do correto posicionamento taxonômico, a exemplo do que foi sugerido acima nos itens 1 e 2.

4) Após a identificação dos isolados, testes *in vitro* e *in vivo* serão realizados a fim de identificar espécies com possível potencial probiótico especialmente aquelas que podem controlar o crescimento de espécies patogênicas, também isoladas do trato

intestinal de *Paralichthys orbignyanus*. Primeiramente serão desenvolvidos testes de inibição *in vitro* com o objetivo de verificar se as espécies isoladas (não patogênicas) possuem a capacidade de inibir o crescimento de organismos patogênicos através da produção de substâncias inibitórias (i.e. bacteriocinas ou antibióticos). O teste de inibição *in vitro* consiste, basicamente, em estimular o crescimento confluente de um organismo patogênico em uma placa de Petri e inocular o organismo que deseja-se verificar efeito inibitório. Uma resposta positiva é verificada quando se obtém um halo de inibição, ou seja, uma zona ao redor do organismo inibidor onde não há o crescimento do organismo patogênico.

5) As espécies que durante os testes *in vitro* apresentarem inibição do crescimento dos organismos patogênicos, verificado através da formação do halo de inibição, serão utilizadas para a realização de dois testes *in vivo*. Será realizado um teste de desafio que terá como objetivo verificar se a espécie é capaz de inibir a ação de um microrganismo patogênico, quando administrados conjuntamente em um tanque contendo um organismo hospedeiro (linguado). Este teste visa confirmar se o poder inibitório do teste *in vitro* se repete no organismo hospedeiro. O outro teste *in vivo* que deverá ser realizado terá como objetivo verificar se a espécie ao ser inoculada (sem a presença do microrganismo patogênico) é capaz de promover alguma resposta positiva no organismo hospedeiro seja, por exemplo, no aumento da taxa de crescimento, da taxa de conversão alimentar ou, no caso da larvicultura do linguado, da taxa de sobrevivência.

6) A possível contaminação de amostras do trato intestinal com bactérias também presentes na pele humana (*Staphylococcus epidermidis* e *Brevibacterium epidermidis*) deverá ser investigada. Amostras da água dos tanques de cultivo deverão ser analisadas através da técnica de PCR para verificar a presença destes microrganismos ou, se possível, pela técnica de Real-Time PCR que além de verificar a presença também quantifica a carga bacteriana presente (Nadkarni *et al.* 2002).

7) Por último, outros organismos cultivados, como o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*, deverão ser submetidos a metodologia empregada no

presente trabalho com o intuito de se obter espécies com potencial probiótico para atuar no cultivo deste crustáceo.

8. SUGESTÕES METODOLÓGICAS

1) Recomenda-se que em futuros estudos utilize-se o anestésico Tricaína Metano Sulfonato (MS-222) como forma de sacrificar os organismos a serem amostrados.

2) As amostras devem ser analisadas, preferencialmente, até 12 horas após a coleta e o transporte para o laboratório pode ser feito sob refrigeração.

3) A presença do organismo-alvo na amostra deve ser verificada através do uso de *kits* comerciais específicos como o sistema API da BioMérieux. S.A, através da técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) ou através da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

4) A extração do DNA genômico, no caso de bactérias Gram negativas, pode ser realizada através do emprego de choque térmico, para o caso de bactérias Gram positivas recomenda-se a utilização de *kits* comerciais como por exemplo o Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega ou o Whatman® FTA® Elute da Whatman®.

5) Se o processo de extração do DNA genômico for realizado por meio da utilização de Protocolo, recomenda-se verificar a pureza e a quantidade de DNA genômico através do uso de espectrofotometria.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINBOWALE OL, PENG H & BARTON MD. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology. 100 (5): 1103-1113.

ALDERMAN DJ & HASTINGS TS. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks. International Journal of Food Science and Technology. 33 (2): 139-155.

ALLEN DA, AUSTIN B & COLWELL RR. 1983. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. Journal of General Microbiology. 129 (7): 2043-2062.

AMMOR MS, BELEN FLOREZ A & MAYO B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology. 24 (6): 559-570.

AUSTIN B. 1988. *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Wiley & Sons Ltd., New York. 425 p.

AUSTIN B, BAUDET E & STOBIE M. 1992. Inhibition of Bacterial Fish Pathogens by *Tetraselmis suecica*. Journal of Fish Diseases. 15: 55-61.

BALCÁZAR JL, DE BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, CUNNINGHAM D, VENDRELL D & MUZQUIZ JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. 114: 173-186.

BALCÁZAR JL, DE BLAS I, RUIZ-ZARZUELA I, VENDRELL D, GIRONES O & LUIS MUZQUIZ J. 2007. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy

salmonids. Comparative Immunology Microbiology And Infectious Diseases. 30 (2): 111-118.

BALCÁZAR JL, VENDRELL D, DEBLAS I, RUIZZARZUELA I, MUZQUIZ J & GIRONES O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture.. 278 (1-4): 188-191.

BALDAUF SL. 2003 Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. Trends in genetics. 19 (6): 345-51.

BENNETT PM. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. British Journal of Pharmacolog. 153 Supl 1: S347-57.

BULLER N. 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manua*l. CABI Publishing, Wallingford, UK. 384 p.

CARR FJ, CHILL D & MAIDA N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews In Microbiology. 28 (4): 281-370.

CHOU J, LIN K, LIN M, SHEU S, WEI Y, ARUN AB, YOUNG C & CHEN W. 2007. *Brachybacterium phenoliresistens* sp nov., isolated from oil-contaminated coastal sand. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. 57: 2674-2679.

COCCONCELLI PS, CATTIVELLI D & GAZZOLA S. 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. International Journal Of Food Microbiology. 88 (2-3): 315-323.

COURVALIN P. 2008. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. Journal of Internal Medicine. 264 (1): 4-16.

DARWIN C. 1873. *L'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle ou la lutte pour l'existence dans la nature*. C. Reinwald et Cie, Paris. 612 p.

EDDY SD & JONES SH. 2002. Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. Aquaculture. 211 (1-4): 9-28.

EUZÉBY JP. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. International Journal Of Systematic Bacteriology. 47 (2): 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Last full update: June 04, 2008. URL: http://www.bacterio.net). Acesso em: 20/06/2008.

FAO. 2005. *Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture*. Rome, Italy. 97 p.

FAO. 2007. *State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) - SOFIA 2006*. Rome, Italy. 192 p.

FARZANFAR A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 48 (2): 149-158.

FREESTONE PPE, SANDRINI SM, HAIGH RD & LYTE M. 2008. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. Trends In Microbiology. 16: 55-64.

FROUEL S, LE BIHAN E, SERPENTINI A, LEBEL JM, KOUETA N & NICOLAS JL. 2008. Preliminary study of the effects of commercial lactobacilli preparations on digestive metabolism of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal Of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14: 100-106.

FUNKE G & CARLOTTI A. 1994. Differentiation of *Brevibacterium* spp. encountered in clinical specimens. Journal Of Clinical Microbiology. 32 (7): 1729-1732.

GATESOUPE. 1994. Lactic-acid bacteria increase the resistance of Turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. Aquatic Living Resources. 7: 277-282.

GATESOUPE FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180 (1-2): 147-165.

GATESOUPE FJ. 2008. Updating the importance of lactic Acid Bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14 (1-3): 107-114.

GAUGER E, SMOLOWITZ R, UHLINGER K, CASEY J & GOMEZ-CHIARRI M. 2006. *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. Aquaculture. 260: 10-20.

GEVERS D, HUYS G & SWINGS J. 2003. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Letters. 225: 125-130.

GIRAUD E, DOUET DG, LE BRIS H, BOUJU-ALBERT A, DONNAY-MORENO C, THORIN C & POULIQUEN H. 2006. Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment. FEMS Microbiology Ecology. 55 (3): 439-448.

GODWIN W. 1820. *Of Population. An Enquiry concerning the Power of Increase in the Numbers of Mankind, being an Answer to Mr. Malthus's Essay on that Subject*. Longman, Hurst, Rees, Ornie & Brown, London.

GÓMEZ G & BALCÁZAR JL. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 52 (2): 145-154.

GRISEZ L, REYNIERS J, VERDONCK L, SWINGS J & OLLEVIER F. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture. 155: 387-399.

HANSEN GH & OLAFSEN JA. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology. 38 (1): 1-26.

HARAKEH S, YASSINE H, HAJJAR S & EL-FADEL M. 2006. Isolates of *Staphylococcus aureus* and *saprophyticus* resistant to antimicrobials isolated from the Lebanese aquatic environment. Marine Pollution Bulletin. 52 (8): 912-919.

HARDIN G. 1968. Tragedy of Commons. Science. 162 (3859): 1243-1248.

HUANG SL, CHEN WC, SHEI MC, LIAO IC & CHEN SN. 1999. Studies on Epizootiology and Pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*Oreochromis spp.*) Cultured in Taiwan. Zoological Studies. 38(2): 178-188.

IRIANTO A & AUSTIN B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. 25 (11): 633-642.

Joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada; 2002 Apr 30 to May 1, 2002.

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

KLEIN G, PACK A, BONAPARTE C & REUTER G. 1998 Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal Of Food Microbiology. 41: 103-125.

KONINGS WN, KOK J, KUIPERS OP & POOLMAN B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. Current Opinion in Microbiology. 3: 276-282.

KOZASA M. 1986. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promotor for animal feeding. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 4: 121-135.

KREGER. 1984. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. Infection and immunity. 44 (2): 326-31.

KUSUDA R & SUGIYAMA A. 1981. Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes - I. On the morphological, biological and biochemical properties. Fish Pathology. 16: 15-24.

KUSUDA R & KAWAI K. 1998. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathology. 33 (4): 221-227.

LE TX, MUNEKAGE Y & KATO S. 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. The Science of the Total Environment. 349 (1-3): 95-105.

LEE K, LEE M & LEE Y. 2008. Safety assessment of commercial *Enterococcus* probiotics in Korea. Journal Of Microbiology And Biotechnology. 18 (5): 942-945.

LI WH & GRAUR D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland. 284 p.

LINDSAY J. 2008. *Staphylococcus: Molecular Genetics*. Caister Academic Press, Norfolk. 278 p.

LONGEON A, PEDUZZI J, BARTHELEMY M, CORRE S, NICOLAS JL & GUYOT M. 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from

marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain x 4 53. Marine Biotechnology. 6: 633-641.

LOVE M, TEEBKEN-FISHER D, HOSE JE, FARMER JJ, HICKMAN FW & FANNING GR. 1981. *Vibrio damsela*, a Marine Bacterium, Causes Skin Ulcers on the Damselfish *Chromis punctipinnis*. Science. 214 (4525): 1139-1140.

MACKAY AD, TAYLOR MB, KIBBLER CC & HAMILTON-MILLER JMT. 1999. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. Clinical Microbiology and Infection, 5: 290-292.

MAEDA M, NOGAMI K, KANEMATSU M & HIRAYAMA K. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia. 358: 285-290.

MAKRIDIS P, MARTINS S, TSALAVOUTA M, DIONISIO LC, KOTOULAS G, MAGOULAS A & DINIS MT. 2005. Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. Aquaculture Research. 36 (16): 1619-1627.

MALTHUS TR. 1798. *An Essay on the Principle of Population as It Affects the Future Improvement of Society, with Remarks on the Speculations of Mr. Godwin, M. Condorcet, and Other Writers*. J. Johnson, London.

MATHUR S & SINGH R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. International Journal of Food Microbiology. 105 (3): 281-295.

METCHNIKOFF, E. 1907. *The prolongation of life. Optimistic studies*. William Heinemann, London, United Kingdom.

MONTALVO NF, MOHAMED NM, ENTICKNAP JJ & HILL RT. 2005. Novel actinobacteria from marine sponges. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 87 (1):29-36.

MORRIS JG, MILLER HG, WILSON R, TACKET CO, HOLLIS DG, HICKMAN FW, WEAVER RE & BLAKE PA. 1982. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet. 1 (8284): 1294-1297.

MUNRO PD, BARBOUR A & BIRKBECK TH. 1994. Comparison of the gut bacterial-flora of start-feeding larval turbot reared under different conditions. Journal Of Applied Bacteriology. 77 (5): 560-566.

NADKARNI MA, MARTIN FE, JACQUES NA & HUNTER N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology - SGM. 148: 257-266.

NASER SM, DAWYNDT P, HOSTE B, GEVERS D, VANDEMEULEBROECKE K, CLEENWERCK I, VANCANNEYT M & SWINGS J. 2007. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. 57 (12): 2777-2789,

NEI M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512 p.

NICOLAS JL, GATESOUPE FJ, FROUELI S, BACHERE E & GUEGUEN Y. 2007. What alternatives to antibiotics are conceivable for aquaculture? Productions Animales. 20: 253-258.

OGGIONI MR, POZZI G, BALENSIN PE, GALIENI P & BIGAZZI C. 1998. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Clinical Microbiology. 36: 325-326.

OLAFSEN. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture. 200 (1-2): 223-247.

OLUKOYA DK, EBIGWEI SI, ADEBAWO OO & OSIYEMI FO. 1993. Plasmid profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Lactobacillus* isolated from fermented foods in Nigeria. Food Microbiology. 10: 279-285.

ONRAEDT A, SOETAERT W & VANDAMME E. 2005. Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. Biotechnology Letters. 27 (8): 527-533.

PITCHER DG, SAUNDERS NA & OWEN RJ. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters In Applied Microbiology. 8 (4): 151-156.

PLACE RB, HIESTAND D, GALLMANN HR & TEUBER M. 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. Systematic And Applied Microbiology. 26: 30-37.

RAUTIO M, JOUSIMIES-SOMER H, KAUMA H, PIETARINEN I, SAXELIN M, TYNKKYNEN S & KOSKELA M. 1999. Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG. Clinical Infectious Diseases. 28: 1159-1160.

RENGPIPAT S, RUEANGRUKLIKHIT T & PIYATIRATITIVORAKUL S. 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. Aquaculture Research. 39: 134-143.

RICHARD V, AUWERA P, SNOECK R, DANEAU D & MEUNIER F. 1988. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 7: 783-785.

RINGØ E, STROM E & TABACHEK J. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. Aquaculture Research. 26: 773-789.

RINGØ E & GATESOUPE FJ. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160 (3-4): 177-203.

RINGO E, SALMINEM S, VON WRIGHT A & OUWEHAND AC. 2003. Lactic acid bacteria in fish and fish farming. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 139 (656): 581-610.

SALMINEN S, VON WRIGHT A, MORELLI L, MARTEAU P, BRASSART D, DE VOS WM, FONDEN R, SAXELIN M, COLLINS K, MOGENSEN G, BIRKELAND SE & MATTILA-SANDHOLM T. 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. International Journal Of Food Microbiology. 44 (1-2): 93-106.

SAMBROOK J & RUSSELL DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2344 p.

SON R, RUSUL G, SAHILAH AM, ZAINURI A, RAHA AR & SALMAH I. 1997. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, Telapia (Telapia mossambica). Letters In Applied Microbiology. 24(6): 479-482.

SØRUM H. 1999. Antibiotic resistance in aquaculture. Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum. 92: 29-36.

SPINOSA MR, WALLET F, COURCOL RJ & OGGIONI MR. 2000. The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to *Bacillus* in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic? Microbial Ecology in Health and Disease. 12: 99-101.

SUGITA H, MIYAJIMA C & DEGUCHI Y. 1991. The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freswater fish. Aquaculture. 92 (1991): 267-276.

SUGITA H, SHINAGAWA Y & OKANO R. 2000. Neuraminidase-producing ability of intestinal bacteria isolated from coastal fish. Letters In Applied Microbiology. 31: 10-13.

SUGITA H, OKANO R, SUZUKI Y, IWAI S, MIZUKAMI M, AKIYAMA N & MATSUURA S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. Fisheries Science. 68 (5): 1004-1011.

SUGITA H & ITO Y. 2006. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. Letters In Applied Microbiology. 43 (3): 336-342.

TAKEUCHI M, FANG CX & YOKOTA A. 1995. Taxonomic study of the genus *Brachybacterium* - Proposal of *Brachybacterium conglomeratum* sp-nov, nom rev, *Brachybacterium paraconglomeratum* sp-nov, and *Brachybacterium rhamosus* sp-nov. International Journal Of Systematic Bacteriology. 45 (1): 160-168.

TANNOCK GW. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental R&D. Trends In Biotechnology. 15 (7): 270-274.

THOMPSON FL, GEVERS D, THOMPSON CC, DAWYNDT P, NASER S, HOSTE B, MUNN CB & SWINGS J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Applied And Environmental Microbiology. 71 (9): 5107-5115.

THOMPSON FL, AUSTIN B & SWINGS J. 2006. *The Biology of Vibrios.* Washington, D. C. ASM Press. 454 p.

THOMPSON FL, GOMEZ-GIL B, VASCONCELOS ATR & SAWABE T. 2007. Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* Are Distinct Species. Applied And Environmental Microbiology. 73 (13): 4279-4285.

TINH NTN, DIERCKENS K, SORGELOOS P & BOSSIER P. 2008. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. Marine Biotechnology. 10: 1-12.

VASEEHARAN B, SUNDARARAJ S, MURUGAN T & CHEN JC. 2007. *Photobacterium damselae ssp damselae* associated with diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius in India. Letters In Applied Microbiology. 45 (1): 82-86.

VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P & VERSTRAETE W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64 (4): 655-671.

VIDAL CA & COLLINS-THOMPSON D. 1987. Resistance and sensitivity of meat lactic acid bacteria to antibiotics. Journal of Food Protection. 50: 737-740.

VINE NG, LEUKES WD & KAISER H. 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiology Reviews. 30 (3): 404-427.

WOESE CR. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews. 51 (2): 221-271.

ZHANG G, ZENG G, CAI X, DENG S, LUO H & SUN G. 2007. *Brachybacterium zhongshanense* sp. nov., a cellulose-decomposing bacterium from sediment along the Qijiang River, Zhongshan City, China. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. 57: 2519-2524.

ZWIRGLMAIER. 2005. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - the next generation. FEMS Microbiology Letters. 246 (2): 151-158.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo