

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MANOEL PAIVA DE ARAÚJO NETO

***Macrobrachium amazonicum* ORIUNDOS DE AMBIENTE NATURAL E
DE CATIVEIRO: DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA POR
LEVEDURAS, SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E FATORES DE
VIRULÊNCIA**

FORTALEZA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MANOEL PAIVA DE ARAÚJO NETO

Macrobrachium amazonicum ORIUNDOS DE AMBIENTE NATURAL E DE
CATIVEIRO: DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA POR LEVEDURAS,
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E FATORES DE VIRULÊNCIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros,
herbívoros, onívoros e aves.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA

2010

MANOEL PAIVA DE ARAÚJO NETO

Macrobrachium amazonicum ORIUNDOS DE AMBIENTE NATURAL E DE
CATIVEIRO: DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA POR LEVEDURAS,
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E FATORES DE VIRULÊNCIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará
Orientador

Profa. Dra. Célia Maria de Souza Sampaio
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará
Co-orientadora

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará
Examinador

Dedico este trabalho às pessoas que são à base da minha vida e criação: meus pais, *Solange* e *Lindemberg*, pela minha formação moral, exemplos de uma vida digna e honesta.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pela bolsa de iniciação científica obtida.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará.

Ao Laboratório de Carcinicultura (LACAR), da Universidade Estadual do Ceará.

Ao Professor Marcos Fábio Gadelha Rocha pela orientação, pelos ensinamentos, paciência, apoio e cobranças que só fazem favorecer o meu crescimento como pesquisador.

À Professora Célia Maria de Souza Sampaio pela atenção, paciência, confiança, apoio, orientação e dedicação em todos esses anos de graduação e pós-graduação, minha segunda mãe.

À Professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela orientação, pelo apoio, pelos conselhos, atenção e incentivos, dedicados durante o mestrado.

Ao Professor José Júlio Costa Sidrim, pelo comprometimento com o Centro Especializado em Micologia Médica, base para realização deste trabalho, além de toda sua base filosófica que fazem instrumento no despertar de um pesquisador.

À Professora Rossana Aguiar Cordeiro, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, orientação e apoio intelectual.

Ao Professor André Jalles Monteiro, pelos ensinamentos, capacidade e apoio estatístico.

Ao Prof. Aldeney Andrade Soares Filho pela amizade, incentivo, sugestões e brilhante orientação durante a realização de diversas pesquisas.

A Profa. Janaína Andrade dos Santos pela amizade, dedicação e incentivo na prática da pesquisa.

À Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia pelo auxílio, apoio intelectual e prático, orientação e base para realização deste trabalho.

Ao Carlos Eduardo Cordeiro, pela ajuda, disposição e interesse na melhor forma de execução do projeto, seja prática ou intelectual.

Ao Francisco Léo Nascimento de Aguiar, pelo apoio, amizade e incentivo na pesquisa.

Aos meus pais, Lindemberg Leite Paiva e Solange Silva Paiva, às minhas irmãs, Ândria Silva Paiva e Ânnya Lindemberg Silva Paiva, a minha Sobrinha, Andressa Silva Paiva Tavares e meu cunhado, Tobias Sousa Caetano, que sempre estiveram ao meu lado, com toda paciência e companheirismo, que somente essa família sabe dedicar.

À Míriam Luzia Nogueira Martins de Sousa, pela paciência, pelo companheirismo, pelos conselhos, tão importantes, por sua ajuda na pesquisa, de forma direta e indireta, pelo carinho, pela amizade, todo meu amor e carinho.

Em memória ao meu avô Pedro Gomes, exemplo de inteligência, amor pela vida, alegria, sabedoria... Obrigado meu avô!

Em memória ao amigo querido Raniere Memória Alves pelos conhecimentos transmitidos, pela força que sempre me deu nas minhas decisões acadêmicas por ser um exemplo de pessoa, orgulho de ter sido seu amigo, para sempre em minhas decisões... obrigado por tudo.

À Terezinha de Jesus, ao Daniel Teixeira Lima, à Monalisa Cunha, Eliane, Wagna e todos àqueles que fazem parte do grupo CEMM, por todo o suporte proporcionado para a realização de nossas pesquisas, pela convivência divertida e prazerosa.

A Deus, por ter me iluminado, ter dado força, paciência, perseverança e motivação para esse novo caminho que tanto me encantou e que me realiza como Biólogo.

RESUMO

Macrobrachium amazonicum é a espécie nativa de camarão dulcícola que mais atrai interesse de produtores brasileiros. Até o momento, o registro sobre a microbiota fúngica de *M. amazonicum* é muito restrito. Com este estudo buscou-se conhecer a microbiota por leveduras de *M. amazonicum*, bem como identificar os fungos presentes na água do cativeiro. Adicionalmente, buscou-se estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* e avaliar a produção de fosfolipase e de protease para os isolados de *Candida* spp. Para tanto, foram utilizados camarões de cativeiro da fase larval à adulta, camarões de vida livre e amostras da água de cativeiro. As amostras de camarão foram maceradas e suspensas em solução salina estéril e o sobrenadante foi semeado em placas contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e ágar semente de níger. A identificação da espécie fúngica foi baseada na micromorfologia e em características bioquímicas. Vinte e quatro isolados de *Candida* spp. foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo, frente a anfotericina B, itraconazol, fluconazol e caspofungina segundo metodologia padronizada pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (documento M27-A2), ao teste de produção de fosfolipase em ágar gema de ovo e à avaliação da atividade de proteases. Para análise dos dados foram utilizados os testes de Fisher, de Pearson e T de Student, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Foram obtidos a partir de camarões e da água de cultivo 26 isolados de leveduras, pertencentes a 7 espécies, sendo *C. famata* (38,5%) a mais prevalente, seguida por *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (15,14%). Ademais, foram encontrados 28 isolados de fungos filamentosos na água de cultivo, pertencentes a cinco gêneros, sendo *Penicillium* (46,42%) o gênero mais prevalente. Todas as cepas de *Candida* foram sensíveis a anfotericina B (CIM=0,03125 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$) e caspofungina (CIM=0,03125 a 1 $\mu\text{g/mL}$). Para itraconazol e fluconazol as CIMs foram de 0,03125 a ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 a ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De todos os isolados testados, 33,33% foram resistentes aos derivados azólicos, sendo dois isolados de *C. famata*, um de *C. tropicalis*, um de *C. parapsilosis*, um de *C. guilliermondii* e três de *C. albicans*. Das cepas de *Candida* spp. 12,5% e 37,5%, respectivamente, produziram fosfolipase e protease. Por fim, este trabalho representou o primeiro estudo da microbiota por leveduras de *M. amazonicum*, comparando populações selvagens e de cativeiro. Adicionalmente, *M. amazonicum* pode ser destacado como um possível animal sentinela na detecção de leveduras resistentes a antifúngicos no ambiente natural.

Palavras-chave: *Macrobrachium amazonicum*. Microbiota por leveduras. *Candida* spp. Fatores de virulência. Sensibilidade a antifúngicos.

ABSTRACT

Macrobrachium amazonicum is the most interesting native species of prawn for Brazilian producers. Until now, reports on fungal microbiota of *M. amazonicum* is very scarce. This study aimed at investigating yeast microbiota of *M. amazonicum* and identifying fungi present in water from captivity. Additionally, we sought to establish *in vitro* antifungal susceptibility profile and evaluate the production of phospholipase and protease of *Candida* spp. isolates. For such, we used prawns from captivity from the larval to adult stage, wild prawns and samples of cultivation water. The prawn's samples were macerated and suspended in sterile saline solution and the supernatant was seeded on plates containing Sabouraud agar with chloramphenicol and birdseed (*Guizotia abyssinica*) agar. The species identification was based on micromorphological and biochemical characteristics. Twenty-four *Candida* spp. isolates were submitted to antifungal susceptibility test, against amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole, according to the methodology standardized by the Clinical Laboratory Standards Institute (document M27-A2). Additionally, these isolates were tested for phospholipase production, on egg yolk agar, and protease activity. The data were analysed by Fisher's exact test, Pearson's correlation coefficient and Student's T-test, with a significant level of 5% ($P < 0.05$). Twenty-six yeast isolates were obtained from prawns and cultivation water, belonging to seven species, with *C. famata* (38.5%) as the most prevalent, followed by *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* (15.14%). Moreover, 28 isolates of filamentous fungi were found in cultivation water, belonging to five genera, with *Penicillium* (46.42%) as the most prevalent genus. All *Candida* spp. strains were sensitive to amphotericin B (MIC = 0.03125 to 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and caspofungin (MIC = 0.03125 to 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$). For fluconazole and itraconazole the MICs were 0.03125 to $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.5 to $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Out of all isolates tested, 33.33% were resistant to azole derivatives, two isolates of *C. famata*, one *C. tropicalis*, one *C. parapsilosis*, one *C. guilliermondii* and three *C. albicans*. Out of *Candida* spp. strains, 12.5% and 37.5% , respectively, produce phospholipase and protease. Finally, this work represents the first study on yeast microbiota of *M. amazonicum*, comparing wild and captive populations. Additionally, *M. amazonicum* can be posted as a sentinel animal for the detection of yeasts resistant to antifungal agents in the natural environment.

Key-words: *Macrobrachium amazonicum*. Yeast microbiota. *Candida* spp. Virulence factors. Antifungal Susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Macho de médio porte e fêmea ovada de <i>M. amazonicum</i> , morfologia externa.....	16
Figura 2 – Larva de <i>M. amazonicum</i>	17
Figura 3 – Sistema digestório de <i>M. amazonicum</i>	18
Figura 4 – Microdiluição em placas de 96 poços em formato de U para <i>Candida</i> spp.....	26
Figura 5 – Avaliação da produção de fosfolipase por cepas de <i>C. albicans</i> , em meio ágar gema de ovo. Observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca, indicativa da produção da enzima. A linha vermelha representa o diâmetro da colônia e a azul o diâmetro total.....	29

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 – Yeast species isolated from <i>M. amazonicum</i> and water from cultivation.....	53
Table 2 – Filamentous fungus species isolated from cultivation tanks of <i>M. amazonicum</i>	54
Table 3 – Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration of amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole against 24 isolates of <i>Candida</i> spp.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
HIV	Human immunodeficiency vírus
LACAR	Laboratório de Carcinicultura
MFC	Minimal fungicidal concentration
MIC	Minimal inhibitory concentration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Pz	Atividade de fosfolipase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Carcinicultura de água doce	14
2.2 Biologia de <i>Macrobrachium amazonicum</i>	15
2.3 Fungos filamentosos na Aquicultura	18
2.4 Leveduras na Aquicultura	21
2.5 Fungos em ambientes aquáticos	23
2.6 Teste de sensibilidade a antifúngicos	25
2.7 Secreção de fosfolipases e proteases como fatores de virulência de <i>Candida</i> spp.	28
3. JUSTIFICATIVA	31
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 Objetivo Geral	33
5.2 Objetivos Específicos	33
6. CAPÍTULO 1	34
7. CONCLUSÕES	56
8. PERSPECTIVAS	57
9. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura é um dos setores da aquicultura que mais atrai interesse de produtores no mundo, sendo que o segmento marinho desempenha um papel importante no cenário aquícola e na economia de um país, constituindo-se em um dos principais produtos de exportação, apresentando bons índices de rentabilidade e lucratividade. O rápido desenvolvimento desta atividade em importantes áreas tropicais do mundo tem ocorrido, entretanto, acompanhado de crescentes preocupações sobre a sustentabilidade ambiental, devido aos efeitos causados ao meio ambiente, como: a remoção de manguezais, a conversão do uso da terra, a descarga de nutrientes, dejetos e agroquímicos e sua influência sobre a biodiversidade (ABCC, 2001).

A carcinicultura de água doce, que representa a segunda prática mais disseminada no Brasil, ocorrendo em 20 Estados da federação, vem se tornando uma alternativa mais racional e viável para a manutenção da produção em níveis compatíveis com o consumo e com a preservação das populações naturais (VALENTI, 2002).

Das espécies exóticas de camarões de água doce, atualmente, *Macrobrachium rosenbergii* é a mais utilizada em criações comerciais em todo o mundo. Das espécies nativas do Brasil, *M. amazonicum* é a preferida, atualmente, para cultivos, devido ao seu rápido crescimento e fácil manutenção em cativeiro. Segundo Lobão e Rojas (1991), indivíduos dessa espécie embora possuam um crescimento menor que o de outras espécies do gênero, atingindo cerca de 10 cm comprimento e 10 g de peso médios, não apresentam a agressividade característica de *M. acanthurus* e *M. carcinus*, além de serem mais resistentes a doenças e predadores.

O cultivo de espécies do gênero *Macrobrachium* de importância econômica realiza-se em duas fases: 1) larvicultura - produção de pós-larvas, ou seja, obtenção e cultivo de larvas até estas atingirem a metamorfose e 2) engorda ou recria - criação de pós-larvas recém-metamorfoseadas em viveiros de fundo natural, onde permanecem até atingirem tamanho comercial; ou, alternativamente, em berçários por um período de 60 a 90 dias, antes de serem levadas para os viveiros de engorda (MORAIS-VALENTI; VALENTI, 2010).

As características artificiais inerentes aos sistemas de produção, frequentemente, submetem as populações de camarões de água doce em cativeiro a condições estressantes. O confinamento, a utilização de densidades elevadas de estocagem, a manipulação frequente dos indivíduos e flutuação dos parâmetros ambientais são alguns dos fatores que induzem ao estresse. Sob tais condições adversas, os indivíduos da população tornam-se mais susceptíveis

a patógenos oportunistas, propiciando o desenvolvimento de doenças (BUENO; GASTELÚ, 1998).

Na literatura científica, há registros relatando a importância dos fungos filamentosos e leveduras para a aquicultura, tanto como componentes da microbiota, como causadores de enfermidades em diferentes grupos de interesse para aquicultura (GATESOUBE, 2007).

Os primeiros estudos realizados para investigar a presença fúngica em camarões do gênero *Macrobrachium* foram realizados em meados da década de 1980, por Colorni (1989) e Lombardi e Lobão (1989a), porém visaram somente investigar aqueles causadores de enfermidades em espécies de cativeiro, a partir da observação de características macroscópicas que pudessem inferir na presença de fungos como patógenos primários ou secundários.

Até o momento, o registro sobre a microbiota fúngica de *M. amazonicum* é restrito, sendo, portanto, de suma importância a caracterização desta microbiota, assim como o acompanhamento da qualidade microbiológica da água, onde estes camarões são cultivados. Segundo Bueno e Gastelú (1998), conhecer a biologia da espécie cultivada e adotar procedimentos de cultivo adequados são importantes para amenizar os impactos negativos causados pela falta de manejo apropriado.

A proposta deste estudo foi determinar a microbiota por leveduras de *M. amazonicum*, assim como verificar a sensibilidade antifúngica, *in vitro*, e a produção de fosfolipase e protease pelas espécies de *Candida* isoladas. Adicionalmente, investigou-se a presença de fungos na água de cultivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinicultura de água doce

Há um enorme potencial para o desenvolvimento das redes produtivas do camarão de água doce no Brasil, já que a oferta atual não atende completamente a demanda no país. O camarão de água doce é um produto interessante pela fonte potencial de lucratividade que representa, podendo ser criado juntamente com várias espécies de peixes, diversificando as fontes de renda de cultivos pouco lucrativos (PIEIDADE et al., 2002).

O *M. rosenbergii* é a espécie de camarão de água doce mais utilizada em cultivos de escala comercial, em vários países tropicais e subtropicais. É conhecido como Camarão de água doce, Gigante da Malásia, Camarão Azul, Pitu Havaiano, Lagostim de água doce. A tecnologia de produção está bem desenvolvida. Alcança bons preços no mercado nacional e internacional devido ao seu tamanho e sabor da sua carne. Além disso, a instalação de um criatório de camarão de água doce causa menos conflitos por não necessitar da utilização de áreas costeiras, que são requeridas para os camarões marinhos, causando impactos ambientais pela substituição das áreas de mangue por viveiros de cultivo (NEW et al., 2002). Entretanto, a partir de 2003, a produção anual vem diminuindo no Brasil, fato caracterizado principalmente por uma tendência mundial em cultivar espécies nativas, devido a importância na manutenção da biodiversidade local, bem como evitar problemas causados pela introdução de espécies exóticas sobre as populações locais.

Na China, a produção da espécie local *M. niponense* já superou a de *M. rosenbergii*, e na Índia, há um esforço de pesquisa concentrado sobre a espécie nativa *M. malcolmsonii* (KUTTY; VALENTI, 2010).

Neste contexto, o cultivo de *M. amazonicum* torna-se uma importante alternativa para expansão do mercado brasileiro da carcinicultura de água doce. No Brasil, *M. amazonicum* é o camarão de água doce nativo que tem gerado maior interesse para a aquicultura (NEW, 2005). Esta espécie pode adaptar-se bem a aquicultura intensiva ou extensiva, devido a baixa agressiva e sua capacidade de crescer em reservatórios, lagoas, e viveiros, além de maior resistência a doenças. Apesar de *M. amazonicum* ser bem menor que *M. rosenbergii*, a sua taxa de sobrevivência é alta e sua metamorfose mais rápida (MORAIS-VALENTI; VALENTI, 2010).

2.2 Biologia de *Macrobrachium amazonicum*

O termo “camarão de água doce” é utilizado para caracterizar tanto espécies que têm todo seu ciclo de vida restrito a esse ambiente, como espécies que necessitam de água salobra no início de seu desenvolvimento e de água doce depois da metamorfose (COELHO et al., 1981).

Embora sejam também chamados de camarões, como os de água salgada, os de água doce são evolutivamente mais próximos das lagostas, apresentando muitas semelhanças com estas, principalmente quanto aos hábitos reprodutivos, pois as fêmeas de ambas as espécies incubam seus ovos no abdômen até a eclosão das larvas (ISMAEL; NEW, 2000).

Os camarões de água doce são crustáceos decápodes pertencentes à Subordem Pleocyemata e família Palaemonidae (MARTIN; DAVIS, 2001). O gênero mais representativo desta família é *Macrobrachium*, que segundo Holthuis (2000), é circuntropical e nativo em todos os continentes, exceto na Europa. Atualmente, existem em todo o mundo cerca de 210 espécies de camarões pertencentes a esse gênero (SHORT, 2004), das quais 45 são registradas nas Américas e 18 no Brasil (MELO, 2003). A maioria das espécies de camarão de água doce de interesse comercial pertence ao gênero *Macrobrachium*, distribuindo-se pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (JALIHAL et al., 1993; MELO, 2003).

M. amazonicum pertence ao grupo de espécies continentais de desenvolvimento larval completo. Esta espécie é amplamente distribuída na América do Sul, desde a bacia do Orenoco, passando pelo rio Amazonas, até a bacia do Rio Paraguai (HOLTHUIS, 1952).

O camarão da Amazônia (*M. amazonicum*) pode ser separado em dois grupos distintos: populações costeiras, as quais habitam rios de estuário; e populações continentais, as quais vivem em rios, lagos e outros corpos d'água, sem contato com o litoral (MORAIS-VALENTI; VALENTI, 2010).

Essa espécie caracteriza-se por apresentar rostro longo e delgado com margem superior provida de nove a doze dentes, margem inferior com oito a dez dentes distribuídos irregularmente. Carapaça e abdômen lisos e transparentes e telson terminando em uma extremidade aguda com dois pares de espinhos na margem posterior. A segunda pata no adulto é a mais forte. Machos adultos apresentam mero, carpo e própode cobertos por espínulos curtos os quais nas fêmeas estes estão ausentes (MELO, 2003).

Os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* apresentam sexos separados, além de características morfológicas externas que permitem distinguir facilmente, em exemplares maduros, o sexo dos indivíduos (NEW, 2002).

Machos e fêmeas de camarões palaemonídeos apresentam compleição física semelhante até atingirem a maturidade sexual, quando têm início os processos reprodutivos. A partir deste momento, as fêmeas destinam suas reservas energéticas à produção e à incubação dos ovos, enquanto os machos direcionam o gasto energético ao crescimento somático, fazendo com que se tornem os maiores indivíduos da população (AMMAR et al., 2001).

Os juvenis são translúcidos, com o segundo par de pereiópodes delgado. As fêmeas de *M. amazonicum* normalmente são menores que os machos, e têm menos espinhos no segundo par de pereiópodes (Figura 1). Os ovos se desenvolvem em uma câmara de incubação, formada pelo arqueamento e alongamento da pleura abdominal. Estes são geralmente pequenos e passam, durante o desenvolvimento embrionário, da cor verde escuro, no início, a verde claro, até apresentarem uma coloração verde acinzentado, cinza claro ou esbranquiçado quando se encontram próximo à eclosão das larvas (figura 2) (MORAIS-VALENTI; VALENTI, 2010).



(Fonte: LACAR, 2005)

Figura 1. Macho de médio porte e fêmea ovada de *M. amazonicum*, morfologia externa.



(Fonte: LACAR, 2010)

Figura 2. Larva de *M. amazonicum*.

No início da década de 1990 Odinetz-Collart (1993) e Odinetz-Collart e Moreira (1993) observaram em populações naturais de *M. amazonicum* do Rio Amazonas uma grande variabilidade de tamanho em indivíduos machos e a ocorrência de diferenças nas taxas de crescimento entre estes. No entanto, somente anos depois foi confirmada a existência de morfotipos machos, tanto em espécimes cultivados em viveiros (MORAES-RIODADES; VALENTI, 2004), quanto em indivíduos de população natural (SANTOS et al., 2006).

O sistema digestivo em *Macrobrachium* é completo e tubular; inicia-se com a boca anteroventral, percorre dorsalmente o corpo do animal e termina em um ânus localizado na base do telson (ISMAEL; NEW, 2000). Segundo Ismael e New (2000), o sistema digestório se divide em três regiões: anterior, média e posterior (Figura 3), e inclui também uma glândula digestiva, cecos pilóricos e divertículos. O intestino anterior se situa na porção dorsal do cefalotórax e apresenta esôfago e estômago, este com duas câmaras: a cardíaca e a pilórica, responsáveis pelos mecanismos de trituração e filtração e que junto com as enzimas iniciam o processo digestivo. O moinho gástrico, um mecanismo de trituração formado por ossículos na

câmara anterior do intestino anterior está presente em todos os decápodes, exceto em alguns carídeos como os camarões de água doce do gênero *Macrobrachium*. Desta maneira, a mastigação nestes animais depende exclusivamente das mandíbulas que quebram e separam as partículas alimentares, encaminhando-as para o intestino médio.



(Fonte: LACAR, 2010)

Figura 3. Sistema digestório de *M. amazonicum*.

2.3 Fungos filamentosos na Aquicultura

Os fungos são microrganismos eucariontes, cuja membrana plasmática é constituída em grande parte por ergosterol, e que possuem parede celular composta de polissacarídeos e, algumas outras macromoléculas. Por aproveitarem a energia contida em ligações químicas dos diversos nutrientes são considerados heterotróficos (SIDRIM; ROCHA, 2004). São microrganismos considerados ubíquos no meio ambiente, sendo impossível erradicá-los (SYMOENS; NOLARD, 1999).

A caracterização dos fungos pode ser feita de acordo com sua estrutura celular. Nesse caso, os fungos filamentosos que possuem unidade estrutural denominada hifa. A maioria das espécies fúngicas apresenta-se na natureza na forma filamentosa. As hifas são estruturas tubulares ramificadas e pluricelulares. Apesar de freqüentemente apresentarem na sua constituição os septos, estes podem não ser vistos como estruturas de separação entre as

células uma vez que apresentam um grande número de poros que permitem a passagem de estruturas celulares de uma célula para outra (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Na literatura científica, há registros relatando a importância dos fungos filamentosos e leveduras para a aquicultura, principalmente em estudos realizados com peixes, anfíbios, algas e crustáceos (FISHER, 1983; COLORNI, 1989; BROCK; LEAMASTER, 1992; ANDLID et al., 1995; LU et al., 1997; LU et al., 1998; ANDLID et al., 1998; LIGHTNER; REDMAN, 1998; CZEZUGA, 1999; HIPOLITO; BACH, 2002; MOORE; STROM, 2003; BUTINAR et al., 2005; LEAÑO et al., 2005; RAMAIAH, 2006; GATESOUBE, 2007; NHA et al., 2009).

Ramaiah (2006) cita como principais fungos filamentosos causadores de doenças em peixes marinhos, aqueles pertencentes aos gêneros *Dermocystidium* e *Saprolegnia*, parasitando principalmente a pele, brânquias e ovos. Leño et al. (2005), a partir de amostras da mucosa bucal e estomacal de tilápias em cativeiro, identificou como dominantes espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Contudo, embora esses fungos sejam conhecidos como patógenos para peixes, sua mera presença não determina doenças nos animais de cultivo.

Batrachochytrium dendrobatidis é um fungo patógeno que, por via aquática, infecta primariamente tecidos queratinizados em anfíbios, sendo atualmente conhecido por causar um declínio na população desses animais em várias regiões do mundo, gerando uma doença conhecida por quitridiomicose (BELL et al., 2004; LIPS et al., 2004; PAUZA; DRIESSEN, 2008). Daszak et al. (2004), demonstraram experimentalmente que em condições inadequadas de cultivo, a rã touro gigante (*Rana catesbeiana*) torna-se um potencial carreador de *B. dendrobatidis*, propagando a quitridiomicose para novas regiões, podendo tornar-se uma ameaça para a biodiversidade de anfíbios. Beard e O'Neill (2005), observaram que sapos da espécie *Eleutherodactylus coqui* são resistentes a quitridiomicose, e que em contraste a outras espécies de anfíbios, como *Bufo boreas*, não apresentam mortalidade quando infectados em laboratório.

Algas verdes marinhas, *Cladophora frascatii* e *Rhizoclonium spp*, e alga azul-esverdeada, *Lyngbya sp.*, foram encontradas infectadas por *Olpidium sp.*, e exibiam escurecimento da porção terminal e sub-terminal dos ramos (RAGHUKUMAR, 1987a;1987b, RAMAIAH, 2006).

A maioria dos fungos patógenos de camarões são invasores secundários ou oportunistas e pertencem a biota da água de cultivo. Estes microorganismos ocasionam

problemas no cultivo, somente quando os camarões são submetidos a manejo inadequado, favorecendo a disseminação de outras doenças, principalmente aquelas causadas por bactérias (BUENO; GASTELÚ, 1998; LEAÑO et al., 2005).

Czeczuga et al. (1999) realizaram um estudo com diversas espécies de crustáceos em águas da Polônia, e identificaram espécies dos gêneros *Aphanomyces* e *Saprolegnia* em todos os crustáceos examinados.

Segundo Fisher (1983), *Lagenidium callinectes* é um fungo comum em infecções de ovos de camarões e, em todos os casos, os embriões infectados por *L. Callinectes* não sobrevivem, porém, em condições de cultivo adequadas, este fungo pode co-existir sem causar mortalidade aos animais adultos.

Fusarium spp. são fungos onipresentes em terra, que embora geralmente saprófitas, podem aparecer como parasitas de plantas e animais, bem como do homem, sendo um fungo de interesse médico (SIDRIM; ROCHA, 2004). Bueno e Gastelú (1998) alertaram para que cuidados sejam tomados ao manipular camarões infectados por *F. solani*, uma vez que esse fungo pode ser responsável pelo desenvolvimento de micoses em humanos.

Rodrigues et al. (2001) detectaram na Venezuela infecções em *M. rosenbergii*, causadas por *Fusarium* sp., principalmente em adultos que anteriormente tinha sofrido danos ao exoesqueleto, embora nenhuma mortalidade tenha sido observada.

Lombardi e Lobão (1989b) identificaram fungos associados ao “Black-spot”, condição de escurecimento da carapaça após destruição da quitina por meio de ataques bacterianos. Foram relatados casos de *Fusarium* em *M. rosenbergii* e *Saprolegnia* em *M. acanthurus* e em *M. carcinus*, ocorrendo como infectantes secundários e letais pela penetração dos fungos nos tecidos dos camarões (LOMBARDI; LOBÃO, 1989b). Colorni (1989) investigando a microbiota de larvas de *M. rosenbergii* alimentadas por *Artemia salina*, identificaram o fungo *Lagenidium* sp., patógeno para esta espécie.

F. solani é a espécie mais comum em isolados de camarões penaeideos, gerando prejuízos que, em longo prazo, podem causar mortalidade de até 100% nos viveiros de camarões (LIGHTNER, 1993). Colorni (1989) capturou adultos machos do camarão *Penaeus semisulcatus* os quais apresentavam melanização e grandes lesões no cefalotórax e abdômen. Ao realizar análise histológica observou coágulos produzidos pelos hemócitos, uma resposta inflamatória do hospedeiro, além de lesões musculares profundas desencadeadas pelo fungo *F. solani*. Estudos realizados com camarão tigre (*P. monodon*) coletados no Kenya e nas Filipinas e com camarão marinho (*P. stylirostris*) coletados no Hawaii, contaminados por *F.*

solani, mostraram que pescadores locais foram contaminados por este fungo, ao entrarem em contato com os animais infectados, gerando infecção ocular severa (COLORNI, 1989).

Nha et al. (2009), relataram o primeiro caso de *F. solani* causando a doença da mancha negra em brânquias de lagosta (*Panulirus ornatus*) cultivados em tanques redes no Vietnã. Adicionalmente, este autor relatou alta patogenicidade de cepas de *F. solani* causando mortalidade em peixes e outros crustáceos associados a cultura de lagostas contaminadas por este fungo.

Leaño et al. (2005), ao investigar a microbiota por fungos filamentosos em tilápia e em camarão tigre (*P. monodon*), bem como a presença desses fungos na água de cultivo desses animais, identificou o gênero *Penicillium* (30,3%) como dominante nas diferentes amostras, seguido por *Aspergillus* (9%).

Animais de interesse aquícola são geralmente bastante resistentes às condições adversas no ambiente, porém condições desfavoráveis, como a poluição de ambientes aquáticos e alta densidade no cultivo pode levar a uma super proliferação de alguns fungos que podem causar doenças. Boas práticas agrícolas e melhor planejamento são altamente recomendados para o êxito aquícultura (GATESOUPE, 2007; NHA et al., 2009).

2.4 Leveduras na Aquicultura

De acordo com De Hoog et al. (2000) levedura é um termo descritivo para qualquer fungo que se reproduz por brotamento, cuja unidade funcional é o blastoconídio. Os fungos denominados de leveduras se encontram classificadas nas classes *Hemiascomycetes*, da divisão *Ascomycota*, e *Hymenomycetes* e *Urediniomycetes*, da divisão *Basidiomycota*.

Artificialmente, são definidas como organismos unicelulares, não melanizados, brancos ou avermelhados. A formação de cadeias celulares coesas (pseudomicélio) é comum, inclusive, algumas espécies produzem talos hifas, células em brotamento, e artroconídios. Estes fungos são tratados como leveduras por serem filogeneticamente semelhantes a uma das classes supracitadas (DE HOOG et al., 2000).

A maioria das leveduras clinicamente relevantes se reproduz por processos vegetativos, cujos principais mecanismos são o brotamento celular, a fissão celular e a formação de artroconídios (DE HOOG et al., 2000).

Estudos avaliando o papel de leveduras em espécies de interesse para aquícultura são escassos e relatam principalmente o papel como patógeno e como representante da microbiota

de peixes e crustáceos. Andlid et al. (1995) isolaram leveduras do intestino de truta arco-íris (*Salmo gairdneri*), Linguado (*Scophthalmus maximus*) e Linguado americano (*Pleuronectes platessa* e *P. flesus*), identificando as leveduras *Candida famata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *R. glutinis* como espécies dominantes no trato intestinal destes peixes.

Bruce e Morris (1973), investigando a microbiota por leveduras de diferentes peixes marinhos coletados em águas com temperatura variando de 4 °C a 30 °C, e identificaram leveduras do gênero *Rhodotorula* em 50% dos isolados e *Trichosporon* em 10% dos isolados, além de espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Em estudos realizados com tilápias, a partir de amostras do trato gastrintestinal, Leño et al. (2005) identificaram o gênero *Rhodotorula* (45,45%) como principal representante da microbiota desse peixe, seguido por *Candida* (14%) e *Saccharomyces* (9%).

Moore e Strom (2003) observaram mortalidade em 35% do total de larvas de salmões cultivados, após 35 dias de alimentação com o crustáceo *Artemia franciscana*, microcrustáceo da ordem Anostraca, contaminado pela levedura *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata*. Estes autores relatam a importância do manejo na produção de cistos de *Artemia* sp., uma vez que a fonte de contaminação foi a água, onde estes crustáceos foram cultivados.

Pagnocca et al. (1989), realizaram um estudo associando a microbiota por leveduras em camarões branco (*Penaeus schmitti*) com ambientes aquáticos próximos a esgotos ou em áreas limpas. Leveduras normalmente associadas a animais de sangue quente e esgoto foram predominantes nos camarões coletados em local poluído, o que não foi observado em camarões coletados em locais adequados. Este estudo mostrou a prevalência de espécies de *Candida*, *Trichosporon*., *Rhodotorula* e *Cryptococcus*, nos camarões coletados próximo a esgotos.

Leño et al. (2005), investigando a microbiota por leveduras, encontrou o gênero *Saccharomyces* como o único representante em amostras de camarões tigre (*Penaeus monodon*). Contudo, em amostras de água onde estes camarões foram cultivados, *Candida* spp. ocorreram em 40% dos isolados, além de espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*, cada um representando 20% dos isolados.

Segundo Chen et al. (2003), a levedura *Metschnikowia bicuspidata*, patógeno de peixes e de diversas espécies de crustáceos, está associada a mortalidade de *M. rosenbergii* em fazendas localizadas em Taiwan. Contudo, esta levedura sempre foi isolada em associação

com a bactéria *Enterococcus faecium*, o que mostrou que essa levedura é uma co-infectante em camarões moribundos.

Johnson e Bueno (2000) citam que *Candida* spp. representam o maior número de isolados em culturas de camarão, sendo *C. sake* a espécie mais comum (dois em cada três isolados). Ademais, Lu et al. (1998) também citam *Endomyces fibuliger* e *Pichia anomala* em isolados de culturas de camarão cultivados no Sudeste da Tailândia, caracterizados como patógenos secundários, porém *C. sake* é o principal patógeno, com base em frequência de ocorrência destas leveduras em isolados de camarões.

2.5 Fungos em ambientes aquáticos

Invertebrados aquáticos refletem as águas onde vivem, mas apresentam uma maior densidade populacional de leveduras, quando comparados à água ou ao sedimento. Desta forma, estudos investigando a microbiota em ambientes aquáticos podem explicar a origem dos constituintes da microbiota de animais aquáticos (HAGLER et al. 1995; KUTTY; PHILIP, 2008).

Neste sentido, estudos têm sido realizados reportando a diversidade de leveduras em substratos, sedimentos, plantas, matéria orgânica e animais em ambientes aquáticos, incluindo rios, lagos, açudes, estuários e áreas de mangue (NAGAHAMA, 2006).

Boguslawska-Was e Dabrowski (2001) demonstraram a alta frequência de espécies do gênero *Candida* (25%) em amostras de diferentes estações da lagoa Szczecin, Polônia, cuja espécie dominante foi *C. famata* (9,3%). Buck (1975) mostrou a importância de estudos realizados com leveduras em ambientes aquáticos e isolou diversas espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula*, nas águas de rios em Connecticut. Vogel et al. (2007) realizaram um estudo avaliando a abundância e diversidade de leveduras em areia seca e úmida de três praias no Sul da Flórida. Um total de 21 espécies de leveduras foram identificadas por métodos moleculares. O maior número de isolados e de espécies foi observado em amostras de areia seca. *C. tropicalis* foi à espécie mais isolada nas diferentes amostras. Os altos níveis de leveduras bem como a prevalência de leveduras de origem humana isoladas em areias de praias podem ter influência na saúde da população local.

Diferentes espécies de leveduras têm sido isoladas de uma grande variedade de ecossistemas aquáticos, mas apenas um número limitado apresenta maior prevalência. As

leveduras mais freqüentes com altas densidades em ambientes aquáticos pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Trichosporon* (ROSA et al., 1995). Ademais, estes estudos focam a utilização desses microrganismos como bioindicadores de poluição (SLAVIKOVA et al., 1992).

Segundo Hagler et al. (1995), as condições relativamente uniformes dos ambientes aquáticos, principalmente do mar, conservam a diversidade de leveduras em diferentes zonas deste ambiente, sendo encontrada uma maior diversidade em ambientes dulcícolas próximos a esgotos. O fungo mais comumente isolado de águas marinhas é a levedura *Candida famata*. Ademais, *C. parapsilosis*, e outros patógenos humanos, também são amplamente distribuídos nos mares. Outro fungo associado com o ambiente aquático é *Metschnikowia bicuspidata*, patógeno de diversos animais aquáticos, isolados em águas de estuários do Rio de Janeiro, fato que motivou a investigação de leveduras em ambientes marinhos, sob diferentes níveis de poluição (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981).

Estudos realizados nos estuários do Rio de Janeiro evidenciaram 21 espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*. A maior diversidade de espécies estava concentrada em áreas poluídas ou próximas a esgotos, e mostrou uma dominância de espécies dos gêneros *Candida* e *Saccharomyces*, em relação aos demais gêneros (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981; NAGAHAMA, 2006).

Nas últimas duas décadas, estudos analisando as comunidades de leveduras em água doce, foram realizados principalmente em associação com águas poluídas (NAGAHAMA, 2006). Estudos sobre leveduras de água doce tem sido focados principalmente em sua aplicação como indicadores de poluição de rios, lagos e viveiros de peixes (SLAVIKOVA; VADKERTIOVÁ, 1995; BOGUSLAWSKA-WAS; DABROWSKI, 2001). Nestes estudos os principais representantes encontrados foram espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Algumas espécies desse gênero são consideradas como bioindicadores de poluição. As espécies mais comuns são *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. famata* e *R. mucilaginosa* (DYNOWSKA, 1997).

Comunidades de leveduras em águas limpas, independente de ser ambiente marinho ou dulcícola, são dominadas por espécies de leveduras fermentativas incluindo muitos patogênicos, especialmente *C. tropicalis* e *C. krusei* (HAGLER et al. 1995; KUTTY; PHILIP, 2008).

Leveduras foram isoladas de amostras de água e sedimento de lagos poluídos, localizados no sudeste do Brasil. Um total de 134 isolados de leveduras, pertencentes a 36 espécies, foram obtidos. O gênero *Candida* apresentou maior número de espécies, como *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*, caracterizadas como patógenos oportunistas (MEDEIROS et al., 2008).

Gadanho e Sampaio (2004) realizaram um estudo investigando a comunidade de leveduras em um estuário localizado em Portugal, sugeriram a presença de algumas espécies conhecidas como prevalentes em ambientes aquáticos poluídos. Dentre estas espécies de leveduras *C. inconspicua*, *C. intermedia*, *C. famata* e *C. guilliermondii*, foram caracterizadas como espécies típicas em ambientes aquáticos.

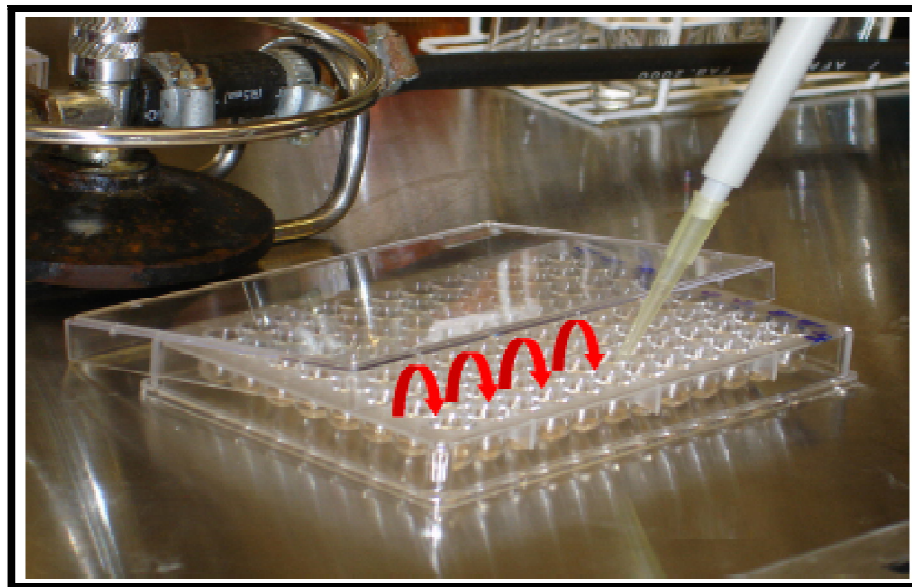
Trabalhos que tratam da investigação de fungos filamentosos em ambientes marinhos no Brasil são bastante escassos, fato que vem estimulando pesquisadores a realizar estudos para compreender a diversidade desses fungos no litoral brasileiro. Gomes et al. (2008), realizaram um estudo que teve como objetivo o isolamento e a identificação de fungos, de amostras de solo e de água, no litoral de Pernambuco, isolando e identificando 57 espécies correspondentes a 20 gêneros. *Aspergillus* e *Penicillium* dominaram, tanto no solo quanto na água, com um total de 11 e 19 espécies, respectivamente. Estes fungos são saprófitos e, ocasionalmente, patogênicos e podem ser isolados de água, solo, animais e seres humanos. Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, encontradas nas praias, podem ser uma fonte de infecção para micoses superficiais e profundas (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

2.6 Teste de sensibilidade a antifúngicos

O desenvolvimento de testes precisos de sensibilidade a antifúngicos, *in vitro*, surgiu a partir da mudança na epidemiologia das micoses humanas, principalmente com a epidemia da AIDS, quando se observou o aumento da ocorrência de candidoses relacionado a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (JOHNSON, 2008). Aliado a tais dados, nos últimos 20 anos, a incidência de infecções humanas causadas por leveduras, principalmente *C. neoformans* e *Candida* spp., tem aumentado, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com câncer (CAFARCHIA et al., 2006; 2008), e mesmo em indivíduos imunocompetentes (LAGROU et al. 2005). Ademais, nos últimos anos, tem sido observados casos de resistência a drogas antifúngicas, principalmente aos derivados azólicos.

O conhecimento do perfil de sensibilidade a antifúngicos de uma determinada região é de grande importância para o estabelecimento de condutas terapêuticas e profiláticas adequadas. Em 1985, o comitê da Área de Micologia do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), publicou o seu primeiro relatório, no qual foram apresentados os resultados de um pequeno estudo colaborativo. Constatou-se que 20% dos laboratórios membros da instituição realizavam testes de sensibilidade a agentes antifúngicos, na maioria das vezes, com *Candida* spp., empregando o método de diluição em caldo, e obtinham resultados de concentração inibitória mínima (CIM) discrepantes. A partir de então, foi decidido desenvolver e padronizar uma metodologia reprodutível e exequível para laboratórios de rotina. Em 1997, a Norma M27-A foi publicada, especificando os pontos de corte para os antifúngicos disponíveis e, em 2002, a Norma M27-A2 padronizou as faixas de referência de CIM 24 e 48 horas, para drogas previamente estabelecidas e recém lançadas (NCCLS, 2002).

O teste de microdiluição em caldo é realizado em placas acrílicas estéreis, com 96 poços em formato de U (Figura 2), e consiste na exposição de um inóculo definido de um determinado microorganismo a concentrações conhecidas das drogas testadas, sendo possível observar o efeito das mesmas sobre o crescimento fúngico. A leitura final determina a menor concentração da droga, capaz de inibir o crescimento do microorganismo, denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (NCCLS, 2002).



(Fonte: CEMM, 2007)

Figura 4. Microdiluição em placas de 96 poços em formato de U para *Candida* spp.

O objetivo final dos testes de sensibilidade é prever a resposta dos pacientes à terapia a ser instituída. No entanto, muitos fatores, além do perfil de sensibilidade *in vitro*, influenciam a resposta clínica, como o sítio de infecção, o status imunológico do hospedeiro, a farmacocinética da droga e a adesão do paciente à terapia. Portanto, o estabelecimento da correlação clínica direta entre os valores de CIM e o desfecho terapêutico ainda é limitado na terapia antifúngica (REX; PFALLER, 2002; HOSPENTHAL et al., 2004). Contudo, a realização de testes de sensibilidade torna-se importante, uma vez que pode orientar a instituição da terapia antifúngica mais adequada, direcionando o paciente aos 90% de sucesso terapêutico (REX; PFALLER, 2002).

A resistência aos azólicos começou a ser observada com o aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, entre pacientes HIV positivos que apresentavam candidose oral e esofágica, previamente à introdução de terapia anti-retroviral (JOHNSON, 2008; KANAFANI; PERFECT, 2008). No geral, a taxa de resistência aos azólicos permanece baixa, entre a maioria das espécies de *Candida* spp., variando de 1-2,1% em *C. albicans*, de 0,4-4,6% em *C. parapsilosis* e de 1,4-6,6% em *C. tropicalis*. No entanto, *C. glabrata*, a segunda espécie mais prevalente em infecções fúngicas sistêmicas nos Estados Unidos, apresenta crescente resistência ao fluconazol, cuja taxa de resistência aumentou de 7 para 12%, entre os anos de 2001 e de 2004 (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Existem muitos trabalhos com o monitoramento do perfil de sensibilidade a drogas de leveduras isoladas de amostras clínicas humanas. No entanto, são escassos os trabalhos com leveduras isoladas de animais. Brito et al. (2009) observaram resistência primária a cetoconazol, fluconazol e itraconazol em isolados de *C. albicans* e de *C. tropicalis* oriundos de cães e Brilhante et al. (2010) em um estudo que vem sendo realizado com calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), ave pertencente à família *Psittacidae*, observaram fenômeno de resistência a itraconazol e fluconazol, em isolados de *C. albicans*.

Diante do exposto, espécies de leveduras isoladas de ambientes aquáticos e de animais de interesse aquícola são conhecidas como patógenos e podem comprometer a saúde humana (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Algumas cepas de leveduras previamente consideradas colonizadores simples ou contaminantes, são resistentes a diversas drogas antifúngicas disponíveis e podem causar infecções em humanos. Estas infecções são descritas com frequência crescente em relação às permissivas condições ambientais, a pressão seletiva

antifúngica, e paciente imunodeprimidos (CANUTO; RODERO, 2002; ENOCH et al., 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Poucos estudos foram realizados para avaliar o perfil de sensibilidade antifúngica de cepas isoladas de ambientes aquáticos. Medeiros et al. (2008) isolaram leveduras de amostras de água e de sedimento de lagos poluídos, localizados no sudeste do Brasil, e traçaram o perfil de sensibilidade a diferentes drogas antifúngicas. De todos os isolados submetidos ao teste de sensibilidade *in vitro* (68 leveduras), 13% foram sensíveis ao cetoconazol, 79% para fluconazol, 50% para itraconazol, 31% para terbinafina e 78% das cepas foram sensíveis a anfotericina B. Sete isolados de diferentes espécies de *Candida* foram resistentes a todos esses antifúngicos.

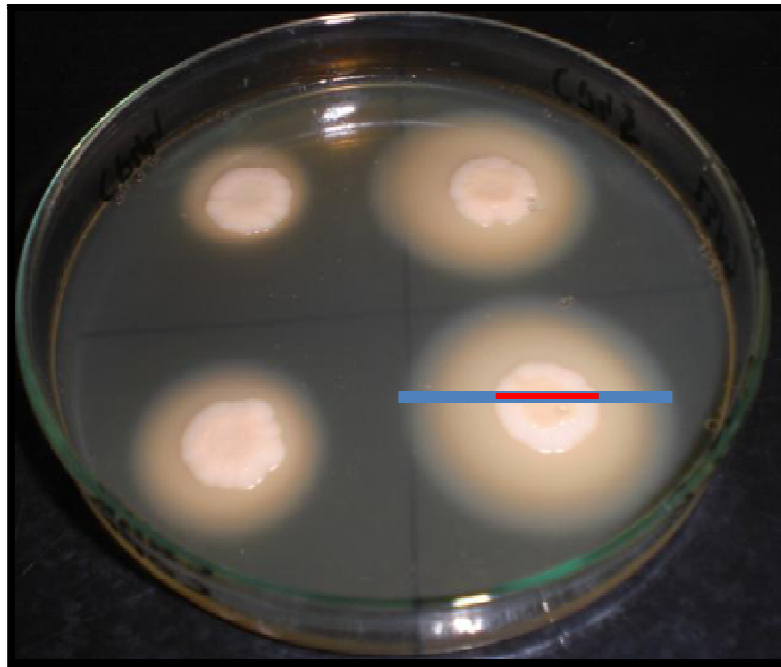
2.7 Secreção de fosfolipases e proteases como fatores de virulência de *Candida* spp.

A capacidade das leveduras passarem de microorganismos comensais a agentes patogênicos, sob condições hospedeiras favoráveis, depende de vários fatores de virulência (COSTA et al., 2009). Dentre estes fatores, podem-se destacar a produção de enzimas hidrolíticas, como fosfolipases, a habilidade de aderir a células epiteliais e endoteliais e a ocorrência de alterações fenotípicas e de modulação antigênica, em decorrência da formação de pseudohifas (IBRAHIM et al., 1995; GHANNOUM, 2000; OMBRELLA; RACCA; RAMOS, 2008; ZENG et al., 2008; VIEIRA; ACQUA-COUTINHO, 2009).

As fosfolipases fazem parte de um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam uma ou mais ligações éster nos glicerofosfolipídios. Apesar de todas terem os fosfolipídios como substrato, cada uma possuem atividade de clivar uma ligação éster específica. Assim, letras são utilizadas para diferenciar as fosfolipases, indicando a ligação alvo específica na molécula de fosfolipídio (GHANNOUM, 2000).

A secreção de fosfolipases por *C. albicans* foi inicialmente relatada por Costa et al. e Werner, ao final da década de 1960, ao observarem o crescimento desse microorganismo em meio sólido contendo gema de ovo ou lecitina. Em 1982, Price et al. descreveram um método em placa para detectar a atividade de fosfolipase em *C. albicans*. Tal método consiste na semeadura das cepas em meio ágar Sabouraud dextrose, acrescido de gema de ovo, a qual é rica em fosfolipídios. Quando os isolados são positivos, observa-se a formação de uma zona de precipitação densa, ao redor da colônia, provavelmente, devido à formação de complexos de cálcio com os ácidos graxos, liberados em decorrência da ação enzimática sobre os

fosfolipídios do meio (Figura 3) (GHANNOUM, 2000). Dessa forma, a atividade de fosfolipase (Pz) é definida como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro total, formado pela colônia e pela zona de precipitação. Quando Pz é igual a um ($Pz = 1$), não há produção de fosfolipase extracelular. Por outro lado, quando Pz é menor que um ($Pz < 1$), há atividade da enzima, sendo que $Pz \geq 0,64$ demonstra uma baixa atividade e $Pz < 0,64$ demonstra uma alta atividade enzimática (GHANNOUM, 2000, VIEIRA; ACQUA-COUTINHO, 2009).



(Fonte: CEMM, 2009)

Figura 5. Avaliação da produção de fosfolipase por cepas de *C. albicans*, em meio ágar gema de ovo. Observa-se a formação de uma zona esbranquiçada e opaca, indicativa da produção da enzima. A linha vermelha representa o diâmetro da colônia e a azul o diâmetro total.

As fosfolipasas promovem a virulência por ocasionarem lise das células hospedeiras ou alterações nas características de superfície das mesmas, facilitando os processos de aderência e de penetração (IBRAHIM et al., 1995; SAMARANAYAKE et al., 2005).

Por muitos anos, acreditou-se que apenas *C. albicans* era capaz de produzir fosfolipase, porém, agora, sabe-se que outras espécies de *Candida* também produzem esta enzima, geralmente em quantidades menores (GHANNOUM, 2000; SIDRIM et al., 2010).

Tem-se observado que a produção de fosfolipase por *C. albicans* isoladas de seres humanos varia de acordo com o sítio de isolamento e com o estado de saúde do hospedeiro (SAMARANAYAKE et al., 2005). Existem várias pesquisas avaliando a atividade da enzima fosfolipase para fungos isolados de seres humanos e de animais (FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2005; ZENG et al., 2008; SIDRIM et al., 2010). No entanto, pesquisas com leveduras isoladas de animais do ambiente aquático são escassas e não foram encontrados relatos avaliando a atividade da enzima fosfolipase de leveduras isoladas de camarões. Cafarchia et al. (2008), avaliaram a capacidade de produção de fosfolipase de 13 espécies de leveduras previamente isoladas da cloaca e de fezes de aves rapinantes. Das leveduras isoladas da cloaca e das fezes, 48,1% e 73,3% apresentavam produção de fosfolipase, respectivamente. Dentre as espécies de *Candida* spp., *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* e *C. tropicalis* apresentavam atividade da enzima.

Sidrim et al. (2010) realizaram um estudo avaliando a atividade de fosfolipase em 59 isolados de *Candida* spp. obtidos de amostras de calopsitas. Foi observada a produção de fosfolipase em 100% dos isolados de *C. albicans* e em 40% dos isolados de *C. não-albicans*, representados por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Nos últimos anos, atividade proteolítica tem atraído muita atenção como potencial fator de virulência em fungos. Essas enzimas atuam no colágeno, elastina, fibrinogênio, imunoglobulina e fatores do complemento, ocasionando danos teciduais, fornecendo nutrientes para o patógeno e proteção contra o sistema imune do hospedeiro (MONOD et al., 2002; MONOD, 2008).

A atividade de protease também já foi descrita em *Candida* spp.. Essas enzimas permitem um maior número de fontes de nitrogênio disponíveis para o fungo, por degradação de proteínas, bem como contribuem para a invasão tecidual e colonização (KANTARCIOGLU; YUCEL, 2002; MOHAN; BALLAL, 2008). Monod et al. (2002) relata que a família de proteases aspárticas secretada por *C. albicans* torna esta espécie mais adaptada que outras para superar as barreiras dos hospedeiros e causar infecções da mucosa e micoses profundas. Adicionalmente, Kantarcioglu e Yucel (2002), identificaram a produção de proteases em *C. kefir*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, além de *C. albicans*, isoladas de diferentes sítios anatômicos de pacientes com micoses invasivas.

3. JUSTIFICATIVA

Até o momento, o registro sobre a microbiota fúngica de *M. amazonicum* é restrito, sendo, portanto, de suma importância a caracterização desta microbiota, assim como o acompanhamento da qualidade microbiológica da água onde estes camarões são cultivados. Ademais, relatos sobre o perfil de sensibilidade, bem como a presença de fatores de virulência de cepas de *Candida* spp. de origem animal e ambiental são escassos.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1- *M. amazonicum* apresenta *Candida sake* como principal componente da sua microbiota fúngica;

2- Os fungos filamentosos são os mais abundantes na água de cultivo;

3- Não há fenômeno de resistência em *Candida* spp. isoladas de *M. amazonicum*;

4- *Candida* spp. isoladas de *M. amazonicum* apresentam baixa atividade fosfolipásica e insignificante produção de protease.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Comparar *M. amazonicum* oriundos de ambiente natural e do cativeiro, enfocando a caracterização da microbiota por leveduras, sensibilidade antifúngica e produção de fatores de virulência.

5.2 Objetivos Específicos

- 1 - Caracterizar a microbiota por leveduras de *M. amazonicum*, capturados no ambiente natural;
- 2 - Caracterizar a microbiota por leveduras de *M. amazonicum*, em cativeiro, da fase larval até a fase adulta;
- 3 - Investigar a presença de fungos na água de cultivo;
- 4 - Estabelecer o perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* para *Candida* spp.;
- 5 - Avaliar a produção dos fatores de virulência, fosfolipase e protease, pelas cepas de *Candida* isoladas.

6. CAPÍTULO 1

Macrobrachium amazonicum oriundos de ambiente natural e de cativeiro: um enfoque na microbiota por leveduras, sensibilidade antifúngica e fatores de virulência

Macrobrachium amazonicum from natural environment and captivity: a focus on yeast microbiota, antifungal susceptibility and virulence factors

Periódico: FEMS Microbiology Ecology- Research Paper (submetido em junho de 2010)

Fator de impacto: 3,586

FEMS Microbiology Ecology- Research Paper

Macrobrachium amazonicum from natural environment and captivity: a focus on yeast microbiota, antifungal susceptibility and virulence factors

Raimunda S.N. Brilhante^a, Manoel A.N. Paiva^{a,b,d}, Célia M. S. Sampaio^{b,d}, Carlos E. C. Teixeira^a, Débora S. C. M. Castelo-Branco^a, João J. Giffoni Leite^a, Liliane P. Silva^d, Rossana A. Cordeiro^a, André J. Monteiro^c, José J.C. Sidrim^a, Marcos F.G. Rocha^{a,b}

^a Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Post-Graduation Program in Medical Microbiology, Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b College of Veterinary Medicine, Post-Graduation Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^cDepartment of Statistics and Applied Mathematics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^dLaboratory of Carciniculture of the State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

***Corresponding Author:** R.S.N. Brilhante. Rua Barão de Canindé, 210; Montese. CEP: 60.425-540. Fortaleza, CE, Brazil. Fax: 55 (85) 3295-1736 E. mail: brilhante@ufc.br.

Running Title: Yeasts from wild and captive *M. amazonicum*

SUMMARY

Aquatic invertebrates reflect environmental conditions of their habitat. Thus, it was sought to compare yeast microbiota of wild and captive *Macrobrachium amazonicum* and evaluate the antifungal susceptibility profile and production of virulence factors by the recovered isolates of *Candida* spp. Additionally, cultivation water was monitored for the presence of fungi. Overall, 26 yeast isolates, belonging to three genera and seven species were obtained, out of which 24 were *Candida* spp., with *C. famata* as the most prevalent species for both wild and captive prawns. From cultivation water, 28 isolates of filamentous fungi were obtained, with *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp. and *Aspergillus* spp., as the most frequent genera. Eight out of 24 *Candida* spp. isolates were resistant to azole derivatives, out of which, four were recovered from wild-harvested prawns. As for production of virulence factors, three (12.5%) and eight (33.3%) isolates presented phospholipase and protease activity, respectively. This is the first comparative study between wild and captive prawns and the first report on yeast microbiota of *M. amazonicum*. The most relevant finding was the high percentage of resistant *Candida* spp., including from wild individuals, which suggests the occurrence of an environmental imbalance in the area where these prawns were captured.

INTRODUCTION

Macrobrachium amazonicum is a decapodal crustacean of the suborder Pleocyemata and the family Palaemonidae that belongs to the group of continental prawns that present complete larval development (Martin & Davis, 2001). This species is widely distributed in South America, from Orenoco basin, through the Amazon River, to Paraguay basin (Holthuis, 1952). Among all Brazilian native species, “sossego” prawn (*M. amazonicum*) is the preferred one for cultivation, due to its rapid growth and easy maintenance in captivity (Lobão & Rojas, 1991).

In the scientific literature, there are reports that emphasize the importance of yeasts and filamentous fungi for aquaculture, as pathogens of different groups of economic interest (Gatesoupe, 2007). The first studies investigating the presence of fungi in *Macrobrachium* prawn were performed in the beginning of the 1980's, but these studies only aimed at investigating disease causing microorganisms, in captive species, by observing macroscopic lesions (Colorni, 1989).

Candida species represent the greatest number of isolates from prawn farming, with *C. sake* as the most common one (Johnson & Bueno, 2000). Additionally, yeasts have been

found in water and sediment from lakes and ponds inhabited by these crustaceans (Lu et al., 1998).

Some studies have shown that yeast species that are potentially pathogenic to human beings have been isolated from fresh water environments and animals. It is noteworthy that among these fungi resistant strains to different antifungal drugs have also been found. In a research with lake water from Southeastern Brazil, resistance phenomenon to itraconazole and amphotericin B in 50% of the isolated yeasts and 6% of the isolated *Candida* spp., respectively, was observed (Medeiros et al., 2008). Additionally, the occurrence of resistance to ketoconazole, fluconazole and itraconazole in *C. albicans* and *C. tropicalis* obtained from dogs (Brito et al., 2009) and to fluconazole and itraconazole among *C. albicans* recovered from cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) (Sidrim et al., 2010) was observed.

Until this moment, no studies comparing microbiota composition, antifungal susceptibility profile and virulence factors of yeasts recovered from *M. amazonicum* from natural environment and captivity have been performed. Thus, this study sought to characterize yeast microbiota of *M. amazonicum* kept in captivity, from larval to adult phase, as well as wild-harvested adults and evaluate *in vitro* antifungal susceptibility profile and phospholipase and protease activity of recovered *Candida* spp. In addition, the presence of fungi in cultivation water was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Wild-Harvested Prawns

Adults of *M. amazonicum* were harvested from Catu Lake (03° 49' 44,8'' S and 38° 29' 9'' W), in the municipality of Aquiraz, 35 Km from Fortaleza, Ceará, Northeastern Brazil. The animals were captured by covos, traditional trap used to capture this species of prawn, and were properly taken to Laboratory of Carciniculture of the State University of Ceará, where healthy individuals, presenting all thoracic and abdominal appendices, were randomly selected for this study.

Captive Prawns

Experiment set-up and obtention of larvae

Larvae, juveniles and adults *M. amazonicum* that were cultivated at the Laboratory of Carciniculture of the State University of Ceará were used in this study. For the obtention of larvae, ovigerous females, in good health conditions, presenting all thoracic and abdominal

appendices and eggs at the final stage of embryonary development, were used (Valentii et al., 1998). These females were collected from Catu Lake, as described for wild-harvested praws, and they were maintained in a 60 L glass fiber tank, containing water with salinity of 4 ppm, under controlled temperature and abundant aeration, to which a biofilter was attached. These females were not fed, while they were kept in the eclosion tank.

Set-up and Maintenance of larviculture

Newly hatched larvae of *M. amazonicum* were stored in three rectangular tanks, with a capacity of 70 L, filled with 60 L of water with different salinity, equipped with closed water circulation and heating systems. During larviculture, the experiments were performed in three different tanks, each one of them with different salinities: 2, 4 and 6 mg/L for tanks T1, T2 and T3, respectively. A density of 20 larvae per liter was used. Water temperature, pH and ammonia and nitrite concentrations were monitored daily.

Larvae were fed *ad libitum* with *Artemia* sp. nauplii, in the morning, from stages II to IX. Starting at stage V, larvae were also fed in the afternoon. After observing the first post-larva, PVC pipe substrates were placed into the tanks, in order to avoid cannibalism.

Larval health

Every three days, four larvae of *M. amazonicum* were taken from each tank and placed into a clock glass, containing water from the respective salinity, in order to observe larval stage and larval health status. Such evaluation was based on the criteria previously described for *M. rosenbergii* larvae (Tayamen & Brown, 1999). Briefly, natatory behavior, presence of parasites and/or necrosis, intestinal conditions, pigmentation and phototaxis were evaluated.

Set-up and maintenance of grow-out

The post-larvae obtained during larviculture were stored in three different tanks, T4, T5 and T6, which contained the animals from the tanks with salinity of 2 (T1), 4 (T2) and 6 (T3) mg/L, respectively. The new tanks were circular, with a capacity of 400 L, filled with 360 L, and equipped with closed water circulation and heating systems. Only fresh water was used in the grow-out tanks, after filtering in activated charcoal filter. Water temperature, pH and ammonia and nitrite concentrations were monitored daily.

During three weeks, post-larvae were fed *ad libitum* with *Artemia* sp. nauplii and pelleted ration (Zimmermann & Sampaio, 1998), only in the morning. After this period, an all-ration diet was instituted and it was offered in the morning and in the afternoon.

Collection of Biological Material for Fungal Isolation

After randomly selecting healthy wild adults from Catu Lake, the digestive tracts of ten individuals were removed, by making a dorsal transversal incision, and were placed in sterile slants containing sterile saline and were treated as one single sample. Overall, 18 collections were performed, with a total of 180 adult prawns.

After starting larviculture, 10 larvae from each tank (T1, T2 and T3) were collected, once a week, for three weeks, totalizing 30 larvae per tank. After collection, larvae were ground and suspended in 1 mL of sterile saline (NaCl 0,9%). During the grow-out phase, 10 individuals (juveniles and/or adults) were collected, weekly, from each tank (T4, T5 and T6) and were treated as described for larvae, until reaching 2 cm in length. When cultivated animals were bigger than 2 cm, their digestive tracts were removed, as described for wild-harvested adults. Overall, 15 collections were performed during this phase, with a total of 150 individuals per tank. After each collection, microbiological processing was immediately performed, as described in the following section.

Water samples from cultivation tanks were collected with 5 mL syringes. Aliquots of water were obtained from different regions of each tank (bottom, substrate surface and walls). Then, samples were taken to the laboratory, where they were homogenized in vortex and an aliquot of 100 μ L was streaked onto microbiological media. All samples from animal and water were taken to Specialized Medical Mycology Center (CEMM) of Federal University of Ceará, in Fortaleza, Ceará, Brazil.

Microbiological Processing

Yeast Isolation

For each sample, two culture media were used for primary isolation: 2% Sabouraud agar with chloramphenicol (0.5 g/L) and birdseed (*Guizotia abyssinica*) agar. Larvae and post-larvae suspensions were streaked onto the media, by using microbiological loop.

Digestive tracts were opened and homogenized in sterile Petri dishes and, approximately, one gram was added to a saline solution (NaCl 0.9%), containing chloramphenicol (0.4 g/L). The suspension was homogenized in a vortex, for three minutes,

and it was left to decant for 30 minutes, at 25 °C. Afterwards, aliquots of 100 µL from the supernatant of each sample were streaked onto both media (Brilhante et al., 2010).

Petri dishes containing the cultured media were incubated at 25 °C, for 10 days, and were observed daily. Additionally, colony-forming unit (cfu) counts were performed for each cultured plate.

Identification

Initially, colonies that were suggestive of yeasts were observed microscopically (40X), after Gram staining, in order to verify the presence of blastoconidia, hyphae or pseudohyphae, as well as to discard the occurrence of bacterial contamination. Then, yeasts were identified by performing specific morphological and biochemical tests and, when necessary, through VITEK 2 (bioMérieux™, USA) (Brilhante et al., 2010).

Briefly, identification of *Candida* species was based on phenotypical characteristics, such as macromorphology, through colony observation, and micromorphology, after growth on Cornmeal-Tween 80 agar. Additionally, biochemical tests were performed, such as carbohydrate and nitrogen assimilation and urease production (De Hoog et al., 2002). Besides, all *Candida* spp. isolates were grown onto chromogenic medium (HiCrome Candida Differential Agar - HiMedia Laboratories, India), for the identification of mixed colonies (Brilhante et al., 2010).

Cryptococcus spp. isolates were initially grown onto cornmeal Tween-80 agar and onto Christensen's urea agar for microscopic and biochemical evaluation, which suggested the genus. Afterwards, an automated analysis was performed using VITEK 2 (bioMérieux®, USA) in order to determine the species.

For *Rhodotorula* spp., colonies were initially identified based on their color. Then, the microorganism was submitted to urease production tests and it was grown onto 2% malt extract agar for morphologic evaluation. Sugar assimilation tests were performed for each isolate and they were crucial for species identification (De Hoog et al., 2000).

Identification of fungi from cultivation water

In order to identify filamentous fungi obtained from cultivation water, slide cultures on Potato Dextrose Agar were performed. Micromorphological analysis was interpreted according to the identification keys (De Hoog et al., 2000). Additionally, yeasts that were obtained from water were identified as described above.

***In vitro* Antifungal Susceptibility Test**

Twenty-four isolates of *Candida* spp. were tested: 3 *C. albicans* (one from larvae, one from digestive tract of captive adults and another from digestive tract of wild-harvested adults), 3 *C. tropicalis* (one from digestive tract of captive adults and two from digestive tract of wild-harvested adults), 4 *C. parapsilosis* (three from digestive tract of captive adults and one from digestive tract of wild-harvested adults), 10 *C. famata* (two from digestive tract of captive adults, two from cultivation water and six from digestive tract of wild-harvested adults) and 4 *C. guilliermondii* (one from cultivation water and three from digestive tract of wild-harvested adults).

The MIC for these microorganisms was determined by a broth microdilution method as described by Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2002) and in other researches of our group (Brito et al., 2009; Sidrim et al., 2010). As quality control for each test performed, *C. parapsilosis* ATCC 22019 was included. The criteria for resistance and sensitivity were established according some authors (CLSI, 2002; Pfaller et al., 2006). Isolates with MICs >1 , ≥ 1 , ≥ 1 and ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ were considered resistant to amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole, respectively.

Inocula of all tested isolates were prepared from one day-old cultures grown on Potato Dextrose agar at 37 °C. Sterile 0.9% saline (5 mL) was added to sterile glass slants and a sample of the colony was added to the saline solution, adjusting its concentration to 0.5 on McFarland Scale (CLSI, 2002). Afterwards, inocula were diluted 1:100 and then 1:20, in RPMI 1640 medium, with L-glutamine (HiMedia, Mumbai, India), buffered to pH 7 with 0.165M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). The final concentration of the inocula was $0.5 - 2.5 \times 10^3$ cells/mL (CLSI, 2002; Brito et al., 2009).

Final concentrations of drugs (amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole) were obtained according to some studies (CLSI, 2002; Pfaller et al., 2006; Brito et al., 2009). All drugs were diluted and resuspended in RPMI 1640 (HiMedia, Mumbai, India). The concentration range tested for amphotericin B, caspofungin and itraconazole was 0.03125-16 $\mu\text{g/mL}$ and for fluconazole was 0.125-64 $\mu\text{g/mL}$ (Pfaller et al., 2006; Brito et al., 2009).

Susceptibility testing was performed on 96-well microdilution trays, which were properly prepared and incubated at 37 °C, for 48 hours (Brito et al., 2009). For each isolate drug-free and yeast-free controls were included and all the isolates were tested in duplicate.

For the azole derivatives and caspofungin, the MIC was defined as the lowest drug concentration inhibiting 80% of growth, when compared to the well of growth control, and for amphotericin B the MIC was the lowest concentration at which no growth was observed (CLSI, 2002, Brito et al., 2009, Sidrim et al., 2010).

Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

After obtaining MIC values, microdilution trays were agitated in order to homogenize the inocula and 100 μ L aliquots of each isolate, from three consecutive wells with increasing drug concentration, starting at the MIC, were subcultured into slants containing 2% Sabouraud Dextrose agar, which were incubated for 48 hours at 37 °C. The minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as the lowest drug concentration at which subcultures presented negative results or produced less than three colonies, indicating the death of more than 99% of the original inoculum (Tawara et al., 2000).

Phospholipase Production

The same isolates that were tested for antifungal susceptibility were evaluated for phospholipase activity. The test was performed according to the previously described methodology (Price et al., 1982), with some modifications. Briefly, the medium used was 2% Sabouraud Dextrose agar, to which 1 mol/L sodium chloride, 0.05 mol/L calcium chloride and 8% sterile egg yolk emulsion, at a concentration of 30%, were added. The emulsion was heated up to 40 °C and incorporated into the sterile medium, after it reached a temperature of 50 °C. Then, the medium was poured into 90 mm Petri dishes, forming a 4 mm film. Yeast inocula were prepared in sterile saline with a final concentration of 4 on McFarland scale. A 5 μ L drop of each inoculum was placed onto a 5 mm sterilized filter paper disk, which was, then, placed onto the agar. The plates were incubated at 35 °C, for seven days (Sidrim et al., 2010).

Phospholipase activity (Pz) was determined by calculating the ratio between the diameter of the fungal colony and the total diameter, including the colony and the precipitation zone. Thus, when $Pz = 1$, the isolate is phospholipase negative; when $1 > Pz \geq 0.64$ the isolate is positive for phospholipase activity; and when $Pz < 0.64$, the isolate is strongly positive for this enzyme (Sidrim et al., 2010).

Protease Production

The 24 isolates of *Candida* spp. were also screened for protease production. The protease test was performed according to a previously described methodology (Charney & Tomarely, 1947; Cenci et al., 2008) with modifications. Briefly, yeast inocula were prepared from one-day-old cultures, in sterile saline solution, reaching a final concentration of 4 on McFarland scale. Then, the inocula were cultured in RPMI medium in a 1:1 dilution, by adding 2 mL of each inoculum to 2 mL of RPMI. After 48 h of incubation, in shaker at 150 rpm, the inocula were centrifuged at 3000 rpm, for 15 minutes and the supernatant was divided into three slants containing 1 mL each. The content from one of the slants was considered the reference substance (blank) and the content from the other two slants was used for testing in duplicate. To the blank content, 1 mL of trichloroacetic acid and 1 mL of azoalbumine were added, while only 1 mL of azoalbumine was added to the other slants. All slants were incubated in 37 °C bath, for 48 hours, after which the reaction was stopped by adding 1 mL of trichloroacetic acid to the tested slants. Then, the tubes were centrifuged for 30 minutes, at 3000 rpm and 2 mL of the supernatant were added to 2 mL of NAOH 5%, for posterior spectrophotometric analysis, at absorbance of 530 nm.

Statistical Analysis

In order to compare yeast prevalence, Fisher's exact test was applied. Pearson's correlation coefficient was used to calculate the correlation between MICs and MFCs. Paired-samples Student's T-test was used to compare MICs to MFCs. For all cases, a significance level of 5% was adopted for significant conclusions.

RESULTS

Eighteen collections of wild-harvested adults and captive animals and water (three during larviculture and 15 during grow-out), for each tank were performed, with a total of 126 samples. Overall, 26 isolates belonging to three genera and seven species were recovered. Fourteen (54%), eight (31%), and 4 (15%) isolates were obtained from wild-harvested prawns, captive prawns and cultivation water, respectively (Table 1).

From the digestive tract of wild-harvested adult prawns, 14 (14/26; 53.85%) yeast isolates were recovered: 01 *C. albicans*, 06 *C. famata*, 02 *C. tropicalis*, 01 *C. parapsilosis*, 03 *C. guilliermondii* and 01 *Cryptococcus laurentii* (Table 1).

Out of eight yeast isolates from captive prawns, one was obtained from larvae (1/26; 3.85% - *C. albicans*) and no isolates were recovered from postlarvae. On the other hand, seven isolates were obtained from digestive tract of adult prawns (7/26; 26.92% - 01 *C. albicans*, 02 *C. famata*, 01 *C. tropicalis*, 03 *C. parapsilosis*) (Table 1). *C. famata* (P=0.0311) and *C. guilliermondii* (P=0.0599) were more frequently isolated from wild-harvested prawns, when compared to those from captivity.

No yeast isolates were recovered from larviculture water with salinity of 2 and 6 mg/L (T1 and T3, respectively), nor from grow-out tanks T4 and T5. Three isolates (3/26; 11.54% - 01 *C. famata*, 01 *C. guilliermondii* and 01 *Rhodotorula mucilaginosa*) were obtained from water with salinity of 4 mg/L (T2) and one water sample from grow-out tank T6 was positive for yeast growth (1/26; 3.85% - *C. famata*) (Table 1).

It was possible to recover filamentous fungi from 42.6% (23/54) of cultivation water samples. These fungi belonged to five genera, with a total of 28 isolates (Table 2). Four (4/28; 14.29%) and two (2/28; 7.14%) isolates were obtained from larviculture tanks T2 and T3, respectively. No filamentous fungi were recovered from larviculture tank with salinity of 2 mg/L (T1). Nine (9/28; 32%), six (6/28; 21.43%) and seven (7/28; 25%) isolates were obtained from water samples from grow-out tanks T4, T5 and T6, respectively.

Penicillium sp. was the most isolated genus (13/28; 46.42%), followed by *Cladosporium* sp. (7/28; 25%) and *Aspergillus* sp. (4/28; 14.29%). Other obtained isolates were *Hortaea werneckii* (3/28; 10.71%) and *Mucor* sp. (1/28; 3.57%) (Table 2).

Concerning *in vitro* antifungal susceptibility tests of *Candida* spp., the MIC values for all tested isolates are described in Table 3. Briefly, for *C. famata* (10/24), MIC for amphotericin B varied from 0.03125 to 0.5 µg/mL and, for caspofungin, itraconazole and fluconazole, it ranged from 0.03125 to 0.5 µg/mL, 0.03125 to ≥16 µg/mL and 0.5 to ≥64 µg/mL, respectively. For *C. parapsilosis* (4/24), MIC for amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole ranged from 0.0625 to 0.25 µg/mL, 0.25 to 1 µg/mL, 0.03125 to ≥16 µg/mL and 4 to 8 µg/mL, respectively. For *C. guilliermondii* (4/24), MICs varied from 0.03125 to 0.25 µg/mL, 0.03125 to 1 µg/mL, 0.03125 to ≥16 µg/mL and 0.5 to 8 µg/mL for amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole, respectively. For *C. tropicalis* (3/24) MIC value for amphotericin B was 0.125 µg/mL while, those for caspofungin, itraconazole and fluconazole ranged from 0.125 to 0.5 µg/mL, 0.03125 to 4 µg/mL and 8 to ≥64 µg/mL, respectively. Finally, for *C. albicans* (3/24), MIC values for amphotericin B and caspofungin varied from 0.125 to 0.5 µg/mL and 0.03125 to 0.0625 µg/mL, respectively,

while those for itraconazole and fluconazole were ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ and ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, respectively. A positive correlation was observed when comparing MICs for amphotericin B and itraconazole ($P=0.0005$), amphotericin B and fluconazole ($P=0.0020$) and fluconazole and itraconazole ($P=0.0007$), but not for caspofungin, when compared to the other tested drugs.

MFC values for all *Candida* spp. isolates varied from 0.03125 to 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.03125 to 8 $\mu\text{g/mL}$, 0.03125 to ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ and 2 to ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ for amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole, respectively (Table 3). A positive correlation was also observed, when comparing MFCs for amphotericin B and itraconazole ($P=0.0001$), amphotericin B and fluconazole ($P=0.0104$) and fluconazole and itraconazole ($P=0.0013$), but not for caspofungin, when compared to the other tested drugs. When comparing MIC and MFC, a positive correlation was observed for caspofungin ($P=0.0000$), fluconazole ($P=0.0000$) and itraconazole ($P=0.0000$). For amphotericin B, MICs were equal to MFCs; for itraconazole, MICs and MFCs were not statistically different ($P=0.1108$) and, for caspofungin ($P=0.0007$) and fluconazole ($P=0.0013$), MICs and MFCs were statistically different.

Concerning phospholipase activity, only three (12.5%) isolates presented positive results ($P_z < 1$). The obtained P_z values were 0.64, 0.67 and 0.71 for *C. famata*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, respectively. *C. famata* was isolated from larviculture water (T1) and *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* were isolated from the digestive tract of captive adults (T5).

As for protease production, eight isolates presented positive results (8/24; 33.3%), which ranged from 1.0 to 27.0 U/mL. These isolates were four *C. famata* (4/10; 40%; 01 from T3 water, 03 from wild-harvested adults), two *C. albicans* (2/3; 66.7%; 01 from wild-harvested adults and 01 from captive adult from T5), one *C. parapsilosis* (1/4; 25%; from captive adult from T5) and one *C. guilliermondii* (1/4; 25%; from wild-harvested adult).

DISCUSSION

Larval health index was satisfactory for all analyzed tanks, during this experiment, with values greater than one (Tayamen & Brown, 1999). Water temperature varied from 28 to 30 °C and ammonia and nitrite concentrations were maintained at zero throughout the research, within ideal management conditions for *M. amazonicum* (Morais-Valenti & Valenti, 2010).

Candida was the most isolated genus and *C. famata* the most frequently isolated species from different samples, with 10 isolates (38.46%), followed by *C. guilliermondii*

(15.4%) and *C. parapsilosis* (15.4%). Other recovered species were *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. laurentii* and *R. mucilaginosa*.

C. famata was the most commonly isolated species from wild-harvested adult prawns and cultivation water (42 and 50%, respectively). From digestive tract of cultivated prawns, *C. tropicalis* and *C. famata* were the most frequently recovered species (28.6% each). The digestive tract of wild-harvested adult *M. amazonicum* from Catu Lake represented the type of sample where the highest number of species was found, followed by digestive tracts of cultivated animals, cultivation water and larvae.

In a study with *M. rosenbergii* cultivated in Taiwan, five species, belonging to three genera, were recovered (Lu et al., 1998). The greatest percentage of the isolates (86%) were represented by *Candida* species, out of which 70% were *C. sake* and 16% were *C. famata*. However, 61% of the animals presented signs of clinical alterations, which may explain the high prevalence of *C. sake*, a well-known pathogen of fresh water prawns. *C. sake* was not recovered during our research and *C. famata* was the most frequently isolated species from digestive tract samples of cultivated and wild-harvested *M. amazonicum*, which suggests the presence of this yeast species in healthy prawns kept in captivity, as well as in those from the natural environment.

By monitoring the quality of prawn cultivation water, four species, belonging to three genera, were isolated. *C. sake* (86%) was also the most frequently isolated species, followed by *C. famata* (8%) (Lu et al., 1998). In our study, although the number of recovered yeasts from water was small, 02 isolates of *C. famata*, 01 *C. guilliermondii* and 01 *R. mucilaginosa* were found. *Candida* spp. was also predominantly isolated from the water where tiger prawns were cultivated, representing 40% of the isolates (Leaño et al., 2005).

Aquatic invertebrates reflect the water where they live in, but they present a greater population density of yeasts, when compared to the water or to the sediment (Hagler et al., 1995, Kutty & Philip, 2008). Thus, yeasts isolated from the digestive tract of wild-harvested *M. amazonicum* may reflect the environmental conditions of Catu Lake. The obtained results might suggest the presence of potentially pathogenic yeasts to human beings and other animals in the water of this lake.

The three predominant genera of filamentous fungi found in cultivation water of this study, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*, were also found in an investigation of filamentous fungi in cultivation water of tilapia and tiger prawns by (Leaño et al., 2005). *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. were the predominant genera found by these authors, but

Cladosporium sp. was isolated from only one sample of tiger prawn cultivation. Differently, in our study *Cladosporium* sp. represented 25% of the isolates.

In our study, the fungus *H. werneckii* (3/28) was isolated from water samples from tanks T2 and T3 (salinity of 4 and 6 mg/L, respectively). This species is a dematiaceous fungus that causes the superficial mycosis known as *tinea nigra*, which is characterized by the development of a brownish macule that preferentially affects the palms, but occasionally affects other body parts. *H. werneckii* has been isolated from human beings before, but this was the first time that our group recovered this fungus from environmental sources. This fungus inhabits tropical and subtropical regions and it used to be misclassified within other genera, such as *Cladosporium*, *Exophiala* and *Phaeoannellomyces* (De Hoog et al., 2000, Varga & Godoy, 2004). *H. werneckii* is the predominant species in hypersaline waters, acting as a saprobic microorganism in these environments. In a study performed in the Dead Sea, it was possible to isolate this fungus from 13.2% of a total of 68 water samples (Gunde-Cimerman, 2000; Mbata, 2008). *H. werneckii* can inhabit a wide range of salinity, varying from zero to 25 mg/L, but optimal growth occurs between 3 and 7.5 mg/L of NaCl (Petrovic et al., 2002), which includes the salinity of the samples from which this fungus was isolated in our study.

Although some filamentous fungi are identified as pathogens for prawns, such as *Aspergillus* sp., in this study, their isolation was not harmful to the health of cultivated prawns, considering that no clinical alterations were observed. Most pathogenic fungi for prawns and shrimps belong to the microbiota of cultivation water and are secondary or opportunistic invaders. These microorganisms cause cultivation problems only when the animals are submitted to inadequate management conditions, which favor the dissemination of other diseases (Bueno & Gastelú, 1998; Leño et al., 2005).

In this study, all strains were susceptible to amphotericin B, as observed in other researches performed by our group (Brito et al., 2009; Sidrim et al., 2010). Eight out of 24 *Candida* spp. isolates (33.3%) were resistant to itraconazole and/or fluconazole, with particular attention given to the isolates of *C. albicans*, which were resistant to both drugs simultaneously. In a research on yeasts from lakes in Southeastern Brazil, strains of *Candida* spp. showed to be resistant to these azole derivatives, as well as amphotericin B (Medeiros et al., 2008) The MFC results obtained in our study were similar to those for clinical isolates of non-*albicans* *Candida* species (Tawara et al., 2000).

Additionally, it was observed that 28.6% (4/14) of the isolates of *Candida* spp. obtained from the digestive tract of wild-harvested *M. amazonicum* were resistant to these azole derivatives. The observed resistance phenomenon to this class of drugs arose the curiosity to seek the causes that may be associated with this phenomenon in the environment. Catu Lake is a fresh-water source that has been used for human consumption and supply, animal consumption, agriculture, industries and leisure activities. Probably, the occurrence of resistance phenomenon is related to anthropic activities, such as pollution with industrial wastes, agrotoxic and oil from boats and jetskis, which are present in this area.

There are several researches concerning phospholipase activity of fungi isolated from humans (Fotedar & Al-Hedaithy, 2005; Zeng et al., 2008). However, researches with yeasts isolated from animals are scarce (Sidrim et al., 2010) and no reports have been found for yeasts from prawns or shrimps. For many years, it was believed that only *C. albicans* was able to produce phospholipase, however, now, it is known that other species of *Candida* also produce this enzyme, usually in smaller amounts (Ghannoum, 2000), as demonstrated by our research. Paradoxically, the isolates of *C. albicans* obtained in this study did not present phospholipase activity and 14.29% (3/21) of the non-*albicans* *Candida* species were positive for this enzyme. In another study performed by our group, 100% of the *C. albicans* isolates, obtained from the gastrointestinal tract of cockatiels, were positive for phospholipase production (Sidrim et al., 2010).

Some studies have evaluated the protease activity of *Candida* species, however, in those researches the strains were obtained from humans with candidiasis (Kantarcioğlu & Yucel, 2002; Ombrella et al., 2008; Mohan & Ballal, 2008). In a study that aimed at explaining the virulence profile of *Candida* spp. isolates from different anatomical sites of healthy human patients, protease activity was observed in 52.4% of the isolates (Oksuz et al., 2007). In our study, it was demonstrated, for the first time, the production of protease by *Candida* spp. strains isolated from wild-harvested and captive crustaceans.

Finally, this work represented the first study on yeast microbiota of *M. amazonicum*, comparing wild and captive populations. Additionally, the most relevant finding was the isolation of azole resistant *Candida* spp. from wild-harvested animals, which suggests the occurrence of an environmental imbalance in the area.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the financial support of FUNCAP (Ceará State Research Funding; Proc. 071.02.00/09) and CNPq (National Counsel for Technological and Scientific Development; Brazil, Proc. 473881/2008-0).

REFERENCES

- Brilhante RS, Castelo-Branco DSCM, Soares GD, Astete-Medrano DJ, Monteiro AJ, Cordeiro RA, Sidrim JJ & Rocha MF (2010) Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *J Med Microbiol* **59**: 718-723.
- Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC & Rocha MFG (2009) The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The Veterinary Journal* **182**: 320-326.
- Bueno SLS & Gastelú JCG (1998) Doenças em camarões de água doce. *Carcinicultura de água doce: Tecnologia para Produção de Camarões, vol. 1* (Valenti WC, ed.), pp. 115-143.. São Paulo: FAPESP, Brasília: IBAMA.
- Charney J & Tomarelli RM (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic of duodenal juice. *J Biol Chem* **23**: 501-505.
- Cenci E, Francisci D, Belfiori B, Pierucci S, Baldelli F, Bistoni F & Vecchiarelli A (2008) Tipranavir exhibits different effects on opportunistic pathogenic fungi. *British Infection Society* **56**: 58-64.
- Colorni A (1989) Fusariosis in the shrimp *Penaeus semisulcatus* cultured in Israel. *Mycopathologia* **108**: 145-147.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J & Figueiras MJ (eds) (2000) Atlas of Clinical Fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures.
- De Hoog GS, Guarro J & Gené J (eds) (2002) Atlas of Clinical Fungi. Delf: Centraalbureau voor Schimmelculture/Universitat Rovira i Virgili.
- Fotedar R & Al-Hedaithy SSA (2005) Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* **48**: 62-67.
- Gatesoupe FJ (2007) Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* **267**: 20-30.
- Ghannoum MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microb Rev* **13**: 122-143.

- Gunde-Cimerman N, Zalar P, De Hoog S & Plemenitas A (2000) Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* **32**: 235-240.
- Hagler AN, Mendonça-Hagler LC, Rosa CA & Morais PP (1995) Yeast as an example of microbial diversity in Brazilian ecosystems. *Oecologia brasiliensis* **1**: 225-244.
- Holthuis LB (1952) A general revision of the Palemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. *Allan Hancock Foundation* **12**: 1-396.
- Johnson SK & Bueno SLS (2000) Health Management. Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Vol. 1 (New MB & Valenti WC, eds) pp. 18-40. London: Blackwell Science.
- Kantarcioğlu, AS & Yücel A (2002) Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* **45**: 160-165.
- Kutty SN & Philip R (2008) Marine yeasts — a review. *Yeast* **25**: 465-483.
- Leaño EM, Lio-Po GD, Nadong LA, Tirado AC, Sadaba RB & Guanzon Jr NG (2005) Mycoflora of the 'green water' culture system of tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture Research* **36**: 1581-1587.
- Lobão VL & Rojas NET (1991) Camarões de água doce. Da coleta ao cultivo, à comercialização. *Ícone* **1**: 1-112.
- Lu CC, Tang KFJ & Chen SN (1998) Identification and genetic characterization of yeasts isolated from freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* **21**: 185-192.
- Martin JW & Davis GE (2001) An update classification of the recent Crustacea. *Nat Hist Mus Los Angeles* **39**: 1-124.
- Mbata TI (2008) Isolation of fungi in hyper saline Dead Sea water. *Sudanese Journal of Public Health* **3**: 170-172.
- Medeiros AO, Kohler LM, Hamdan JS, Missagia BS, Barbosa FAR & ROSA CA (2008) Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research* **42**: 3921-3929.
- Mohan V & Ballal M (2008) Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* **25**: 208-210.

- Moraes-Valenti P & Valenti WC (2010) Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Freshwater prawns: biology and farming* (New MB, Valenti WC, Tidwell JH, D'abramo LR & Kutty MN, eds) pp. 485-501. Oxford, Wiley-Blackwell.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. NCCLS, document M27-A2.
- Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D & Koc AN (2007) Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis* **60**: 280-283.
- Ombrella AM, Racca L & Ramos L (2008) Atividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Rev Iberoam Micol* **25**: 12-16.
- Petrovic U, Gunde-Cimerman N & Plemenitas A (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular Microbiology* **45**: 665–672.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S & Diekema DJ (2006) In vitro susceptibilities of *Candida* spp. To caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* **44**: 760–763.
- Price MF, Wilkinson ID & Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **22**: 201-207.
- Sidrim JJC, Castelo-Branco DSCM, Brilhante RSN, Soares GDP, Cordeiro RA, Monteiro AJ & Rocha MFG (2010) *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology* in Press.
- Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matsumoto F & Kuwahara S (2000) In Vitro Activities of a New Lipopeptide Antifungal Agent, FK463, against a Variety of Clinically Important Fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 57-62.
- Tayamen M & Brown JH (1999) A condition index for evaluating larval quality of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquaculture Research* **30**: 917-922.
- Valenti WC, Mallasen M & Silva CA (1998) Larvicultura em sistema fechado dinâmico. *Carcinicultura de água doce: Tecnologia para Produção de Camarões, vol. 1* (Valenti WC, ed) pp. 115-143. São Paulo: FAPESP, Brasília: IBAMA.

- Varga VES & Godoy P (2004) *Tinea Nigra. Micologia médica à luz de autores contemporâneos, vol. 1* (Sidrim JJC & Rocha MFG, eds) pp. 124 – 128. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Zeng X, Hou X, Wang Z, Jiang L, Xiong C, Zhou M & Chen Q (2008) Carriage rate and virulence attributes of oral *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Mycoses* **52**: 161-165.
- Zimmermann S & Sampaio CMS (1998) Sistema de berçário: caracterização e manejo. *Carcinicultura de água doce: Tecnologia para Produção de Camarões, vol. 1* (Valenti WC, ed.), pp. 95-113. São Paulo: FAPESP, Brasília: IBAMA.

TABLE 1: Yeast species isolated from *M. amazonicum* and water from cultivation

Yeast Species	Collection Site												Total	
	Wild Prawns		Captive Prawns						Water					
			Larvae		Juvenile and Adult				Larviculture		Grow-Out			
	N	%	N	%	T2	T4	T5	T2	T6	N	%	N	%	
<i>C. albicans</i>	1	3.85	1	3.85	-	-	1	3.85	-	-	-	-	3	11.54
<i>C. famata</i>	6	23.08	-	-	1	3.85	1	3.85	1	3.85	1	3.85	10	38.46
<i>C. guilliermondii</i>	3	11.54	-	-	-	-	-	-	1	3.85	-	-	4	15.38
<i>C. parapsilosis</i>	1	3.85	-	-	-	-	3	11.54	-	-	-	-	4	15.38
<i>C. tropicalis</i>	2	7.69	-	-	-	-	1	3.85	-	-	-	-	3	11.54
<i>C. laurentii</i>	1	3.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.85
<i>R. mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.85	-	-	1	3.85
Total	14	53.84	1	3.85	1	3.85	6	23.07	3	11.54	1	3.85	26	100

T2- Larviculture tank (salinity 4 mg/L); T4- Grow-out tank (fresh water) corresponding to T1 (salinity 2 mg/L); T5- Grow-out tank (fresh water) corresponding to T2 (salinity 4 mg/L); T6- Grow-out tank (fresh water) corresponding to T3 (salinity 6 mg/L).

TABLE 2: Filamentous fungus species isolated from cultivation tanks of *M. amazonicum*.

Species	Collection Site										Total	
	Larviculture Water				Grow-out Water							
	T2		T3		T4		T5		T6		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
<i>Penicillium</i> sp.	1	3.57	1	3.57	2	7.15	-	-	3	10.71	7	25.00
<i>P. decumbens</i>	-	-	-	-	1	3.57	1	3.57	1	3.57	3	10.71
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-	-	1	3.57	-	-	-	-	1	3.57
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	-	1	3.57	1	3.57	-	-	2	7.15
<i>Cladosporium</i> sp.	1	3.57	-	-	2	7.15	1	3.57	-	-	4	14.29
<i>C. sphaerospermum</i>	-	-	-	-	-	-	1	3.57	-	-	1	3.57
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-	-	1	3.57	-	-	1	3.57	2	7.15
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-	1	3.57	1	3.57	1	3.57	3	10.71
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	1	3.57	-	-	1	3.57
<i>Hortae werneckii</i>	2	7.14	1	3.57	-	-	-	-	-	-	3	10.71
<i>Mucor racemosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.57	1	3.57
Total	4	14.28	2	7.15	9	32.15	6	21.42	7	25.00	28	100

T2- Larviculture tank (salinity 4 mg/L)

T3- Larviculture tank (salinity 6 mg/L)

T4- Grow-out tank (fresh water) corresponding to T1 (salinity 2 mg/L)

T5- Grow-out tank (fresh water) corresponding to T2 (salinity 4 mg/L)

T6- Grow-out tank (fresh water) corresponding to T3 (salinity 6 mg/L)

TABLE 3: Minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration distribution of amphotericin B, caspofungin, itraconazole and fluconazole against 24 isolates of *Candida* spp.

<i>Candida</i> spp.	<i>n</i>	Amphotericin B (µg/mL)		Caspofungin (µg/mL)		Itraconazole (µg/mL)		Fluconazole (µg/mL)	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i>	3	0.125 (1) ^a	0.125 (1)	0.03125 (2)	0.03125 (1)	≥16 (3)	≥16 (3)	≥64 (3)	≥64 (3)
		0.5 (2)	0.5 (2)	0.0625 (1)	0.0625 (1)				
					0.25 (1)				
<i>C. famata</i>	10	0.03125 (5)	0.03125 (5)	0.03125 (1)	0.03125 (1)	0.03125 (2)	0.03125 (1)	0.5 (2)	2 (2)
		0.0625 (3)	0.0625 (3)	0.0625 (2)	0.0625 (2)	0.0625 (3)	0.0625 (1)	2 (3)	4 (1)
		0.125 (1)	0.125 (1)	0.125 (1)	0.125 (1)	0.125 (2)	0.125 (2)	4 (1)	16 (2)
		0.5 (1)	0.5 (1)	0.25 (2)	0.25 (1)	0.5 (1)	0.25 (1)	8 (1)	32 (2)
				0.5 (4)	1 (1)	≥16 (2)	0.5 (3)	32 (1)	≥64 (3)
			2 (3)		≥16 (2)	≥64 (2)			
			4 (1)						
<i>C. parapsilosis</i>	4	0.0625 (1)	0.0625 (1)	0.25 (1)	2 (2)	0.03125 (1)	0.625 (1)	8 (2)	4 (1)
		0.125 (2)	0.125 (2)	0.5 (1)	4 (1)	0.0625 (1)	0.5 (1)	4 (2)	8 (2)
		0.25 (1)	0.25 (1)	1 (2)	8 (1)	0.5 (1)	2 (1)		32 (1)
					≥16 (1)	≥16 (1)			
<i>C. tropicalis</i>	3	0.125 (3)	0.125 (3)	0.125 (2)	0.5 (1)	0.03125 (2)	0.0625 (2)	8 (2)	8 (1)
				0.5 (1)	1 (1)	4 (1)	≥16 (1)	≥64 (1)	32 (1)
				2 (1)				≥64 (1)	
<i>C. guilliermondii</i>	4	0.03125 (1)	0.03125 (1)	0.03125 (2)	0.03125 (1)	0.03125 (3)	0.03125 (1)	0.5 (1)	4 (1)
		0.0625 (2)	0.625 (2)	0.0625 (1)	0.25 (1)	≥16 (1)	0.0625 (1)	1 (1)	8 (2)
		0.25 (1)	0.25 (1)	1 (1)	1 (1)		0.125 (1)	2 (1)	16 (1)
			4 (1)		≥16 (1)	8 (1)			

^a Represents the number of isolates for each indicated MIC and MFC.

7. CONCLUSÕES

1 – A principal espécie de *Candida* componente da microbiota por leveduras de *M. amazonicum* é *C. famata*;

2 – O fenômeno de resistência frente ao itraconazol e fluconazol está presente em *Candida* spp. isoladas de *M. amazonicum*, principalmente em *C. albicans*.

3 – A produção de fosfolipase e de protease por cepas de *Candida* spp. isoladas de *M. amazonicum*, apesar de baixa, pode ser observada;

4 – Os fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, são os mais comumente isolados da água de cultivo.

8. PERSPECTIVAS

1. O conhecimento da microbiota do trato gastrointestinal de *M. amazonicum* é de grande importância, por auxiliar na compreensão da dinâmica microbiana, o que é essencial para a prevenção de doenças, elaboração de dietas adequadas, utilização de microorganismos como probióticos, otimização dos sistemas de produção e investigação das condições ambientais onde estes animais estão inseridos. Este trabalho foi pioneiro para a espécie estudada e forneceu dados importantes sobre a composição da microbiota.

2. O monitoramento do perfil de sensibilidade de cepas de *Candida* spp. de origem animal é bastante escasso, sendo limitado o número de trabalhos nessa área. Este trabalho constatou a ocorrência do fenômeno de resistência a derivados azólicos em cepas de *Candida* spp. O fenômeno de resistência particularmente nos isolados oriundos de *M. amazonicum* de vida livre pode sugerir um desequilíbrio ambiental na área onde esses camarões estão inseridos. Sendo, portanto, de suma importância investigar os possíveis fatores envolvidos neste fenômeno.

3. O conhecimento e a compreensão dos fatores de virulência de um microorganismo contribuem tanto para a prevenção das doenças, como também para a elaboração de novas alternativas terapêuticas que visam à supressão desses fatores. Isolados de *Candida* spp. oriundos de *M. amazonicum*, de vida livre e de cativeiro, foram avaliados quanto à produção de fosfolipase e de proteases. Foi constatada a produção desses fatores de virulência em cepas de *Candida* spp., porém não ficou claro o papel da produção desses fatores de virulência por isolados de animais de cativeiro e de vida livre. Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para avaliar a importância de tais fatores.

9. REFERÊNCIAS

ABCC. Cenário mundial da carcinicultura marinha. In: Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado. p. 17-38, 2001.

AMMAR, D.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 2, p. 523-528, 2001.

ANDLID, T., JUÁREZ, R.V., GUSTAFSSON, L. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology*, v.30. p. 321–334. 1995.

ANDLID, T., VÁZQUEZ-JUÁREZ, R., GUSTAFSSON, L. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v. 7, p. 115–126, 1998.

BEARD, K. H.; O'NEILL, E. M. Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biological Conservation*, v. 126, p. 591–595, 2005.

BELL, B.D., CARVER, S., MITCHELL, N.J., PLEDGER, S. The recent decline of a New Zealand endemic: how and why did populations of Archey's frog *Leiopelma archeyi* crash over 1996–2001?. *Biological Conservation*, v. 120, p. 189–199, 2004.

BOGUSLAWSKA-WAS, E.; DABROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 203, p. 451–458, 2001.

BRILHANTE, R.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SOARES, G.D.; ASTETE-MEDRANO, D.J.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *Journal of Medical Microbiology*, v.59, p.718-723, 2010.

BRITO, E.H.S., FONTENELLE, R.O.S., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The Veterinary Journal*, 182, 320-326, 2009.

BROCK, J.A., LEAMASTER, B. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: Wyban, J. _Ed., Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, p. 212–226, 1992.

BRUCE, J.; MORRIS, E.O. Psychrophilic yeasts isolated from marine fish. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 39, p. 331–339, 1973.

BUCK, J.D. Distribution of aquatic yeasts - effect of incubation temperature and chloramphenicol concentration on isolation. *Mycopathologia*, v. 56, n. 2, p. 73-79, 1975.

BUENO, S. L. S.; GASTELÚ J. C. G. Doenças em camarões de água doce. In: VALENTI, W. C. (Ed.), Carcinicultura de água doce: Tecnologia para Produção de Camarões, 383p., São Paulo: FAPESP, Brasília: IBAMA. p. 115-143, 1998.

BUTINAR, L.; SANTOS, S. SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, v. 244, p. 229-234, 2005.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology*, v. 44, p. 485-492, set. 2006.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, C.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human diseases. *Medical Mycology*, v. 46, p. 1-6, 2008.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 550-563, 2002.

CHEN, S.C.; CHEN, T.H.; WANG, P.C.; CHEN, Y.C.; HUANG, J.P.; LIN, Y.D; CHAUNG, H.C.; LIAW, L.L. Metschnikowia bicuspidate and Enterococcus faecium co-infection in the giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii. *Diseases of aquatic organisms*, v. 55, p. 161-167, 2003.

COELHO, P. A.; RAMOS-PORTO, M. A.; SOARES, C. M. A. Cultivo de camarão do gênero *Macrobrachium* Bate (Decapoda Palaemonidae) no Brasil. Natal: *EMPARN*, n. 6, p. 66, 1981.

COLORNI, A. Fusariosis in the shrimp *Penaeus semisulcatus* cultured in Israel. *Mycopathologia*, v. 108. p. 145-147. 1989.

COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; REGINA CELIA CANDIDO, R. C. Candida albicans and Candida tropicalis in Oral Candidosis: Quantitative Analysis, Exoenzyme Activity, and Antifungal Drug Sensitivity, *Mycopathologia*, v. 167, p. 73-79, 2009.

CZECZUGA, B.; KOZŁOWSKA, M.; GODLEWSKA, A. Zoosporic Fungus Species Growing on Dead Benthos Crustaceans. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 8, n. 6, p. 377-382, 1999.

DASZAK, P.; STRIEBY, A.; CUNNINGHAM, A. A.; LONGCORE, J. E.; BROWN, C. C.; PORTER, D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier

of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, v. 14, p. 201-207, 2004.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. Atlas of Clinical Fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures, 2^a ed. Baarn, p. 130 – 143, 156 – 160, 164 – 174, 2000.

DYNOWSKA, M. Yeast-like fungi possessing bio-indicator properties isolated from the Lyna river. *Acta Mycologica*, v. 32, p.279–286, 1997.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 809–818, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (www.fao.org, accessed on 27 June 2009).

FISHER, W. S. Eggs of palaemon macrodactylus: iii. Infection by The fungus, *lagenidium callinectes*. *Biological Bulletin*, v. 164, p. 214-226,1983.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, v. 48, p. 62-67, 2005.

GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. *Yeast Research*, v. 5, p. 253–261, 2004.

GATESOUBE, F.J. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*, v. 267, p. 20–30, 2007.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p.122-143, 2000.

GOMES, M. L.; PEREIRA, E. C. G.; MORAIS, J. O. 2008. Degradação Socioambiental no Baixo Curso do Rio Catú, Aquiraz-Ceará: Comprometimento da mata ciliar e recursos hídricos. In: IV Encontro Nacional da Anppas. Brasília, Distrito Federal, 2008.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 173-178, 1981.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A.; MORAIS, P. P. Yeast as an example of microbial diversity in Brazilian ecosystems, *Oecologia brasiliensis*, v. 1, p. 225-244, 1995.

- HIPOLITO, M.; BACH, E.E. Patologias em rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). Primeira revisão da bibliografia brasileira. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.69, n.2, p.113-120, 2002.
- HOLTHUIS., L. B. A general revision of the Palaemonidae (Crustacea, Decapoda, Natantia) of the Americas. *Allan Hancock Foundation Publications*, v. 12, p. 55, 1952.
- HOLTHUIS, L. B. FAO species catalogue. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO Fish. Synopses*, v. 125, n. 1, p. 1-261, 1980.
- HOLTHUIS, L.B. Nomenclature and Taxonomy. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.), *Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii**, 443p. London: Blackwell Science, p. 12-17, 2000.
- HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 48, p.153-160, 2004.
- IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS JR., J. E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 5, p. 1993-1998, mai. 1995.
- ISMAEL, D.; NEW, M.B. Biology. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.), *Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii**, 443p. London: Blackwell Science, p. 18-40, 2000.
- JALIHAI, D. R.; SANKOLLI, K. N.; SHENOY, S. Evolution of larval developmental patterns and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* (BATE, 1968) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, v. 5, n.3, p. 365-376, 1993.
- JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. il3-il8, 2008.
- JOHNSON, S.K.; BUENO, S.L.S. Health Management. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.), *Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii**, 443p. London: Blackwell Science, p. 18-40, 2000.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 120-128, jan. 2008.
- KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, v. 45, p. 160–165, 2002.
- KUTTY, S. N.; PHILIP, R. Marine yeasts — a review, *Yeast*; v. 25, p. 465–483, 2008.

KUTTY, M. N.; VALENTI, W. C. Culture of other freshwater prawn species. p. 502-523. In: NEW; M. B.; VALENTI; W. C.; TIDWELL; J. H.; D'ABRAMO, L. R.; KUTTY, M. N. (eds). Freshwater prawns: biology and farming. Oxford, Wiley-Blackwell. 2010.

LAGROU, K.; VAN ELDERE, J.; KEULEERS, S.; HAGEN, F.; MERCKX, R.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W. E.; BOEKHOUT, T. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *Journal of Internal Medicine*, v. 257, p. 385-388, 2005.

LEAÑO, E. M.; LIO-PO, G. D.; NADONG, L. A.; TIRADO, A. C.; SADABA, R. B.; GUANZON Jr., N. G. Mycoflora of the 'green water' culture system of tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, *Aquaculture Research*, v. 36, p. 1581-1587, 2005.

LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In. MCVEY, J. (ed) CRC handbook of mariculture, 2nd edn, Vol 1, *Crustacean aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, p 393-486, 1993.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, v. 164, p. 201-220, 1998.

LIPS, K. R.; MENDELSON, J. R. III.; MUÑOZ-ALONSO, A.; CANSECO-MARQUEZ, L.; MULCAHY, D. G. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, v. 119, p. 555-564, 2004.

LOBÃO, V. L.; ROJAS, N. E. T. Camarões de água doce. Da coleta ao cultivo, à comercialização. *Ícone*, p. 112, 1991.

LOMBARDI, J. V. ; LOBÃO, V. L. . Enfermidades e fatores condicionantes de mortalidade na larvicultura de camarões do gênero *Macrobrachium*. In: III SBCC - Simpósio Brasileiro Sobre Cultivo de Camarão, 1989, João Pessoa - PB. III Simpósio Brasileiro Sobre Cultivo de Camarão. João Pessoa - PB: MCR Aquacultura Ltda, v. II. p. 401-408, 1989a.

LOMBARDI, J. V. ; LOBÃO, V. L. . Doenças e demais fatores causadores de mortalidade em camarões jovens e adultos pertencentes ao gênero *Macrobrachium*. In: III SBCC - Simpósio Brasileiro Sobre Cultivo de Camarões, 1989, João Pessoa - PB. III Simpósio Brasileiro Sobre Cultivo de Camarões. João Pessoa - PB : MCR Aquacultura Ltda, v. 2, p. 409-419, 1989b.

LU C.C.; TANG F.J.; YOICHIRO U.; KOU G.H.; CHEN S.N. Yeast infection in prawns (*Macrobrachium rosenbergii* de Mann) in Taiwan. *Acta Zoologica Taiwanica*, v. 8, n.1, p. 34-46, 1997.

LU, C. C.; TANG, K. F. J.; CHEN, S. N. Identification and genetic characterization of yeasts isolated from freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, v. 21, p. 185-192, 1998.

MARTIN, J. W., DAVIS, G. E. An update classification of the recent Crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles*, v. 39, p. 1-124, 2001.

MEDEIROS, A.O.; KOHLER, L.M.; HAMDAN, J.S.; MISSAGIA, FRANCISCO B.S.; BARBOSA, A.R.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research*, v. 42, p. 3921-3929, 2008.

MELO, G. A. S. Famílias Atyidae, Palaemonidae e Sergestidae, In: MELO, G. A. S. (ed.), Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil, 425p., São Paulo: Loyola, p. 289-415, 2003.

MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 208-210, 2008.

MONOD, M. Secreted Proteases from Dermatophytes. *Mycopathologia*, v. 166, p. 285–294, 2008.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LE-CHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 292, p. 405 – 419, 2002.

MOORE, M.M.; STROM, M.S. Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture*, v. 220, p. 43–57, 2003.

MORAES-RIODADES, P. M. C.; VALENTI, W. C. Morphotypes in male Amazon River Prawns, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture*, v. 236, p. 297-307, 2004.

MORAES-VALENTI, P.; VALENTI, W. C. Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: NEW, M. B.; VALENTI, W. C.; TIDWELL, J. H.; D'ABRAMO, L. R.; KUTTY, M. N., (eds). *Freshwater prawns: biology and farming*. Oxford, Wiley-Blackwell, p. 485-501, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Métodos de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS, documento M27-A2, 2002.

NAGAHAMA, T. Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments In ROSA, C.; PÉTER, G. ed. lit. – “Biodiversity and ecophysiology of yeasts”. Berlin : Springer, cap. 12, p. 241-262, 2006.

NEW, M. B. Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *FAO Fisheries Technical Paper*, n.428, p.212, 2002.

NEW, M. B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research*, v. 36, p. 210-230, 2005.

NHA, V.V.; HOA, D.T.; KHOA, L.V. Black gill disease of cage-cultured ornate rock lobster *Panulirus ornatus* in central Vietnam caused by *Fusarium* species, v. 14, n. 4, p. 35-37, 2009.

ODINETZ-COLLART, O. Ecologia e potencial pesqueiro do camarão-canela, *Macrobrachium amazonicum*, na Bacia Amazônica. In Ferreira, E. J. G. Santos, G. M.; Leão, E. L. M. and Oliveira, L. A. Eds. Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia. Manaus, INPA, p. 147-166, 1993.

ODINETZ-COLLART, O.; MOREIRA, L. C. Potencial pesqueiro do camarão *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro). *Amazoniana*, v.12, n. 3, p. 399-413, 1993.

OMBRELLA, A. M.; RACCA, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 12-16, 2008.

PAGNOCCA, F.G; MENDONÇA-HAGLER, L.C; HAGLER, A.N. Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. *Yeast*, v. 5, p. 479–483, 1989.

PAUZA, M.; DRIESSEN, M. Distribution and potential spread of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Tasmanian Wilderness World Heritage Area. *Department of Primary Industries and Water*, p. 12-16, 2008.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis, a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 1, p. 133-163, jan. 2007.

PIEIDADE, R. K. NEVES, M.F & SANTOS, M. J. M – **Caracterização da Rede Produtiva do Camarão de Água Doce no Brasil** - Anais do XL Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural - SOBER, “Equidade e Eficiência na Agricultura Brasileira”, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo – Rio Grande do Sul, p. 177, 2002.

PRICE, M.F., WILKINSON, I.D., GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 22, p. 201-207, 1982.

RAGHUKUMAR, C. Fungal parasites of marine algae from Mandapam (South India). *Diseases of aquatic organisms*, v. 3. p. 137-145. 1987a.

RAGHUKUMAR, C. Fungal parasites of the green alga *Chaetomorpha Media*. *Diseases of aquatic organisms*, v. 3, p. 147-150, 1987b.

RAMAIAH, N. A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. *Indian Journal of Marine Sciences*, v. 35, n. 4, p. 380-387, 2006.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. 982-989, 2002.

RODRÍGUEZ, B.; LODEIROS, C.; CONROY, G.; CONROY, D.; GRAZIANI, C. Pathobiological studies on cultures populations of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879) margarita island, Venezuela. *FCV-LUZ*, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2001.

ROSA, C. A.; RESENDE, M. A.; BARBOSA, F. A. R.; MORAIS, P. B.; FRANZOT, S. P. Yeast diversity in a mesotrophic lake on the karstic plateau of Lagoa Santa, MG-Brazil, *Hydrobiologia*, v. 308, p. 103-108, 1995.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; JAYATILAKE, J. A. M. S.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes of *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 583-593, 2005.

SANTOS, J. A.; SAMPAIO, C. M. S.; SOARES FILHO, A. A. Male population structure of the Amazon River Prawn (*Macrobrachium amazonicum*) in a natural environment. *Nauplius*, v.14, n.2, p. 55-63, 2006.

SHORT, J. W. A revision of Australian river prawn, *Macrobrachium* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Hydrobiologia*, p. 1-110, 2004.

SIDRIM, J.J.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BRILHANTE, R. S. N.; SOARES, G.D.P.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. Candida species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. *Veterinary Microbiology*, 2010.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 287, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 25, p. 265-274, 2004.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. Yeasts and yeast-like organisms isolated from fish-pond waters. *Acta Microbiologica Polonica*, v. 44, p:181–189, 1995.

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R.; KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Yeast isolated from artificial lake water, *Canadian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 1206-1209, 1992.

SYMOENS, F.; NOLARD, N. Biodiversité des microorganismes: aspects legaux et role des collections. *Journal of Medical Mycology*, v. 9, p. 49-51, 1999.

VALENTI, W. C. Situação atual, perspectivas e novas tecnologias para produção de camarões de água. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12, Goiânia. Anais... Goiânia [s.n.], p. 99-106, 2002.

VIEIRA, R. G.; ACQUA-COUTINHO, S. D. Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 6, p. 452-456, jun. 2009.

VOGEL, C.; ROGERSON, A.; SCHATZ, S.; LAUBACH, H.; TALLMAN, A.; FELL, J. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida, *Water research*, v. 41, p. 1915 – 1920, 2007.

ZENG, X.; HOU, X.; WANG, Z.; JIANG, L.; XIONG, C; ZHOU, M.; CHEN, Q. Carriage rate and virulence attributes of oral *Candida albicans* isolates from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Mycoses*, v. 52, p. 161-165, 2008.

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](#)