

Evaluación de estirpes bacterianas para la formación de consorcio probiótico para uso en el cultivo de camarones marinos: *Litopenaeus vannamei***Evaluation of bacterial strains for the formation of a probiotic consortium for use in the cultivation of marine shrimps: *Litopenaeus vannamei***

DOI:10.34117/bjdv6n10-662

Recebimento dos originais:01/10/2020

Aceitação para publicação:29/10/2020

Marina Teresa Torres Rodríguez

Doutora em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará

Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, Secretaria de Desenvolvimento Econômico y Trabalho (SEDET) .

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil

E-mail: marinatorresrodriguez@gmail.com

Jéssica Lucinda Saldanha da Silva

Doutora em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)- UFC, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-FUNCAP, Secretaria de Desenvolvimento Econômico y Trabalho (SEDET) .

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil

E-mail: jessicalucinda@hotmail.com

Jade Oliveira Abreu

Mestre em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará.

Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)- UFC.

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil

E-mail: jadeoabreu@gmail.com

Sandra Rebeca Martins

Bacharelato em Ciências Ambientais Universidade Federal do Ceará

Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)- UFC.

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil

E-mail: becamartins@yahoo.com

Francisco Sylvanio F. da Silva

Mestre em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará

Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)- UFC.

Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil

E-mail: franciscosylvaniofs@gmail.com

Fátima Cristiane Teles de Carvalho

Doutora em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará
 Instituição: Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC
 Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil
 E-mail: fctcarvalho@yahoo.com.br

Regine Helena S.F. Vieira

Doutora em Ciências Biológicas/ Microbiologia pela Universidade de São Paulo
 Instituição: Docente do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará.
 Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil
 E-mail: reginevieira@terra.com.br

Oscarina Viana de Sousa

Doutora em Ciências/ Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
 Instituição: Docente do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará
 Endereço: Av. da Abolição, 3207 - Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza-CE, Brasil
 E-mail: oscarinaviana@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar estirpes bacterianas con características probióticas, aisladas del tracto intestinal de camarones marinos (*Litopenaeus vannamei*). Ciento noventa y una (191) estirpes fueron evaluadas para su selección basada en pruebas fenotípicas y genotípicas incluyendo: factores de virulencia (elastasa, gelatinasa, caseinasa, lípasa e fosfolipasa), tolerancia a diferentes temperaturas (4°C e 40°C) y pHs (5 e 9), prueba de susceptibilidad a antimicrobianos, prueba de agregación, antagonismo y prueba de identificación molecular (secuenciamiento-gen 16S rRNA). Las estirpes identificadas fueron agrupadas en diferentes géneros: *Bacillus*, *Vibrios*, *Staphylococcus* y un grupo con representantes de diferentes géneros bacterianos. Fueron formados tres grupos bacterianos prioritarios atendiendo a la respuesta de las estirpes frente a las diferentes pruebas analizadas. La mayoría de las estirpes (66,45%) presentó resistencia frente a la oxitetraciclina. Todas las estirpes presentaron susceptibilidad frente al cloranfenicol y la tetraciclina. Ninguna estirpe presentó antagonismo frente al patógeno *Vibrio parahaemolyticus*. De las 70 estirpes que formaron parte de los tres grupos prioritarios, 16 estirpes (22,85%) resultaron antagónicas frente a *Vibrio harvey*. Doce estirpes bacterianas mostraron resultados satisfactorios en la técnica de antagonismo cruzado. Fueron formados tres consorcios bacterianos con aquellas estirpes que cumplieron los requisitos como probiótico potencial.

Palabras clave: Factores de virulencia, secuenciamiento, oxitetraciclina, agregación, antagonismo.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate bacterial strains with probiotic characteristics, isolated from the intestinal tract of marine shrimps (*Litopenaeus vannamei*). One hundred ninety-one (191) strains were evaluated for selection based on phenotypic and genotypic tests including: (elastase, gelatinase, caseinase, lipase e fosfolipase), tolerance to different temperatures (4 ° C and 40 ° C) and pHs (5 and 9), antimicrobial susceptibility test, aggregation, antagonism test and molecular identification test (sequencing-gen 16S rRNA). The identified strains were grouped into different genera: *Bacillus*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, and a group with representatives of different bacterial genera. Three priority groups were formed based on the response of the strains to the

different tests analyzed. Most of the strains (66.45%) presented resistance against oxytetracycline. All the strains were susceptible to chloramphenicol and tetracycline. None of the strains showed antagonism against the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. Of the 70 strains that were part of the three priority groups, 16 strains (22.85%) were antagonistic against *Vibrio harvey*. Twelve bacterial strains showed satisfactory results in the cross antagonism technique. Three bacterial consortia were formed with those strains that met the requirements as a potential probiotic.

Key words: Virulence factors, sequencing, oxitetracycline, aggregation, antagonism.

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de organismos acuáticos constituye un sector de gran importancia económica y alimentaria en diferentes países. La producción de alimentos a partir de la acuicultura presenta las mayores tasas de crecimiento en los últimos años (FAO, 2018).

Tradicionalmente y durante mucho tiempo, el control de las enfermedades en los sistemas de cultivo de organismos acuáticos fue fundamentado en el uso de sustancias químicas y antibióticos, por esa razón, el desarrollo de agentes antimicrobianos con menor efecto negativo sobre el ambiente constituye un elemento esencial para el manejo sustentable de la acuicultura (BIDHAM et al., 2014).

Una de las alternativas para una acuicultura económica y ambientalmente sustentable es el uso de probióticos (LAZADO y CAIPANG, 2014). De acuerdo con la “Organización para la Agricultura y la Alimentación” los probióticos son organismos vivos que mejoran la salud de los humanos y de los animales y deben ser seguros y en cantidades suficientes para las funciones en el organismo y son alternativas viables para combatir eventos epidémicos de enfermedades bacterianas como la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, sigla en inglés) (REANTASO, 2016).

La selección de bacterias probióticas tiene como basamento los siguientes criterios: el género al cual pertenece la bacteria, la estabilidad frente al ácido gástrico, la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, la capacidad de colonizar al menos temporalmente el tracto gastrointestinal, la capacidad de producir compuestos antimicrobianos y ser metabólicamente activo en el intestino (VERSCHUERE et al., 2000).

Entre los organismos empleados como probióticos se destacan las bacterias gran- negativas pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (LAKSHMI, VISWANATH y SAI GOPAL, 2013; HAI, 2015) y entre las bacterias gran-positivas, el género *Bacillus* se destaca como el de mayor potencial para el uso principalmente en la carcinicultura (NEWAJ-FYZUL, AL-HARBI y AUSTIN, 2014). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar estirpes bacterianas para la formación de consorcio probiótico para uso en el cultivo de camarones marinos *L. vannamei*.

2 MATERIAL y MÉTODOS

2.1 SELECCIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

Fueron evaluadas 191 estirpes bacterianas que hacen parte de la bacterioteca del Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP), del Instituto de Ciencias del Mar (LABOMAR) de la Universidad Federal de Ceará (UFC) aisladas del tracto intestinal y hemolinfa de camarones marinos (*L. vannamei*). La selección de las estirpes se basó en la diversidad funcional de las bacterias, su capacidad de colonización y producción de componentes extracelulares relacionados al favorecimiento del desempeño zootécnico y la estimulación de las respuestas inmunológicas frente a patógenos bacterianos y virales.

Importante destacar que todos los medios de cultivo utilizados fueron elaborados con agua de mar con salinidad ajustada para 10ppm.

2.2 PURIFICACIÓN DE LAS ESTIRPES

Las estirpes seleccionadas fueron reactivadas en caldo Luria Bertani (LB), Difco e incubación en estufa a 35° C por 24 h. Después de ese período, asadas del material crecido fueron replicadas en la superficie del medio agar PCA (Plate Count Agar, Difco). Una vez verificado el crecimiento, las estirpes fueron sometidas a la coloración de Gram para la confirmación de la morfología, agrupamiento celular y verificación de la pureza de las mismas. Las estirpes fueron divididas en Gram-positivas y Gram-negativas.

2.3 VERIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA (F.V.) (SOTO-RODRÍGUEZ ET AL., 2012).

Fue verificada la presencia de las siguientes enzimas extracelulares: elastasa, gelatinasa, caseinasa, lipasa y fosfolipasa. La visualización de un halo transparente en el lugar del inóculo indicó la positividad en las pruebas. Importante destacar que aquellas bacterias que presentaron tres o más factores de virulencia fueron excluidas de los restantes análisis por ser consideradas con mayor potencial de virulencia.

2.4 Estudio de la tolerancia a diferentes temperaturas (Zokaeifar et al., 2012).

Las estirpes fueron inoculadas en caldo LB (Difco). Diferentes temperaturas fueron probadas (4°C e 40°C). El resultado fue verificado hasta 48h, a través del crecimiento bacteriano en el medio utilizado.

2.5 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD BAJO DIFERENTES VALORES DE PH (CAI ET AL.,1999).

Caldo LB (Difco), con diferentes valores de pH (5,0 e 9,0) fueron inoculados e incubados en estufa a 35°C por hasta 48h. Fue verificada la viabilidad de las estirpes por turbidez en el medio de cultivo.

2.6 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESTIRPES SELECCIONADAS PARA LA FORMACIÓN DEL CONSORCIO PROBIÓTICO

Fue realizada la extracción de DNA genómico de las cepas bacterianas, previamente crecidas en caldo LB, con la utilización de un kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Para la realización del PCR, fue elaborado un mix para cada muestra (1× tampón, 1,5mM de MgCl₂, 200 μM de dNTP, 0,2 μM de Primer L1401, 0,2 μM de Primer U968, 2,5U de Taq DNA polimerasa y 100 ng de DNA),

Las amplificaciones fueron realizadas en termociclador AmpliTherm modelo Veriti® con las siguientes condiciones de termociclaje: un ciclo a 94°C/2min; un ciclo a 94°C/1min; un ciclo 52°C/1min; un ciclo a 72°C/1min y por último un ciclo a 72°C/8min. El volumen final de la reacción final de PCR fue de 25μL.

Los productos de la extracción de DNA y de la reacción de PCR fueron visualizados a través de la electroforesis en gel de agarosa (1%) más colorante GelRed para auxiliar en la visualización de las bandas con aplicación de luz ultravioleta en un transluminador (Espectroline-UV). Fue utilizado un marcador molecular de 1kb DNA ladder (Sigma) para visualizar el tamaño de los amplicones generados. Los geles fueron documentados en sistema KODAK (EDAS290).

Después de la amplificación de la subunidad 16S rDNA, las muestras fueron encaminadas al Centro de Diagnóstico para las Enfermedades de Organismos Acuáticos (CEDECAM), del Instituto de Ciencias del Mar (LABOMAR –UFC) para el secuenciamiento del DNA bacteriano utilizando BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit en microplaca de PCR conteniendo 96 pozos. El volumen final de la reacción fue de 10μL: 0,5 X de Big Dye; 3,2 pmol de cada primer (primer 141L y primer U968); 0,5X de tampón 5X; 0,8μL de muestra PCR. Las condiciones de termociclaje fueron: un ciclo de 96°C / 15s; 40 ciclos de 96°C/15s, 50°C/15s; un ciclo de 50°C/15s; un ciclo de 60°C/4 min y enfriamiento a 4°C. Fue utilizado el secuenciador automático capilar ABI PRISM® 3500 (AppliedBiosystems), conforme metodología descrita por Sanger, Nicklen y Coulson (1977). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados a través del análisis de las secuencias obtenidas en cuanto a la calidad de los nucleótidos y la similitud, utilizando el programa MEGA (TAMURA et al., 2013) versión 6 con posterior comparación con las secuencias depositadas en el GenBank

(BENSON et al., 2002) utilizando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ((ALTSCHUN et al., 1997).

2.7 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

El antibiograma fue realizado a través del método de difusión en discos (BAUER; KIRBY; SHERRIN, 1966).

Los antimicrobianos y los valores de corte fueron seleccionados e interpretados (respectivamente) según a orientación técnica dictada por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2013). Fueron utilizados los siguientes antimicrobianos: Cloranfenicol 30 μ g (CLO), Florfenicol 30 μ g (FLO) y Oxitetraciclina 30 μ g (OXI), usados en la acuicultura. Los resultados fueron visualizados después de 24 horas de incubación a 35°C. Después de ese periodo, fue medido el diámetro de los halos de inhibición con el auxilio de un parquímetro digital y los resultados clasificados en resistentes (R), sensibles (S) o intermedios (I).

2.8 PRUEBA DE AGREGACIÓN (CHRISTENSEN ET AL.,1985)

Fue utilizado caldo LB con incubación a 35°C por 48h. Después de ese período, 200 μ l de células en suspensión fueron inoculadas en triplicado en microplacas de poliestireno estériles e incubadas en estufa a 35°C por 48h. Pasado ese tiempo, el inóculo fue descartado y los pozos fueron lavados por tres veces con agua destilada y secados en estufa a 60°C por 1h. Después de este procedimiento, los pozos fueron coloreados con una solución de cristal violeta 1% por 1min y lavados sucesivamente con agua destilada y dejar a temperatura ambiente para su secado. La positividad fue indicada por la visualización de un halo con residuo de cristal violeta alrededor de los pozos.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, fueron formados grupos prioritarios de estirpes para la confirmación de las actividades antagónicas y antibacterianas.

2.9 PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTAGONISTA (CHAPMAN, GIBSON Y ROWLAND, 2012)

2.9.1 Prueba de antagonismo con patógenos a través de la técnica de estrías cruzadas

Fueron probados los patógenos *V. harvey* (ATCC 14126) y *V. parahaemolyticus* (IOC 17082), los cuales fueron diseminados en una estría central en placas conteniendo agar PCA (Difco). Enseguida, estrías perpendiculares y distantes 5 mm del inóculo central fueron hechas con las diferentes estirpes a ser probadas. El resultado fue observado después de 24-48h de incubación en estufa a 35°C. La actividad antagónica fue verificada a través de una zona de inhibición entre la estría central con cada patógeno y la estría de cada estirpe probada.

2.9.2 Prueba de antagonismo entre las estirpes probadas a través de la técnica de estrías cruzadas

Las estirpes con resultados positivos en la prueba de antagonismo frente a patógenos fueron sometidas a la prueba por estrías cruzadas. Fue realizado el mismo procedimiento descrito en el ítem anterior (2.9.1) solo entre las estirpes seleccionadas.

3 RESULTADOS y DISCUSIÓN

Del total de estirpes (191) sometidas a la técnica de coloración de Gram, 115 (60,20%) resultaron ser Gram-positivas en cuanto 76 (39,79%) resultaron como Gram-negativas.

Estirpes bacterianas G(+) y G(-) aisladas y caracterizadas de camarones marinos han sido utilizadas como probióticos por diferentes autores (FAR et al. 2013; MIRBAKHSH et al. 2013). Específicamente, aislamientos bacterianos de *Litopennaeus vannamei* pueden ser utilizados en el mantenimiento de la salud de estos organismos (LUIS-VILLASEÑOR; CAMPA-CÓRDOVA y ASCENCIO-VALLE, 2012) y en el control de patógenos bacterianos (FERREIRA et al., 2017).

3.1 FACTORES DE VIRULENCIA

Una vez realizadas las pruebas de virulencia, 64 estirpes presentaron tres o más factores de virulencia por lo que no fueron tomadas en cuenta para sus análisis en las restantes pruebas. No en tanto, 66,49% de las estirpes fueron evaluadas para la formación del probiótico (Tabla 1).

3.2 TOLERANCIA A LA TEMPERATURA

En relación a la temperatura, la mayor cantidad de estirpes fue capaz de crecer a 40°C. La temperatura de 4°C fue probada buscando la factibilidad en la aplicación de la liofilización como forma de almacenamiento de las estirpes bacterianas en el laboratorio (Tabla 1).

3.3 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD BAJO DIFERENTES VALORES DE PH

La variación del pH evaluado (5 y 9) mostró una amplia respuesta positiva por parte de las estirpes bacterianas (Tabla 1).

Tabla 1. Respuestas de las estirpes frente a las diferentes pruebas evaluadas

	Factores de virulencia (F.V.)			Temperatura			pHs probados			
	Ausencia	1 F.V.	2 F.V.	≥3 F.V.	40°C + 4°C +	40°C + 4°C -	40°C - 4°C +	9 + 5 +	9 + 5 -	9 - 5 +
No. de estirpes	39	42	46	64	57	120	2	168	12	11
Por ciento (%)	20,40	21,98	24,08	33,50	29,84	62,82	1,04	87,96	6,28	5,75

Los productos extracelulares tales como: proteasa, elastasa, fosfatasa, lipasa, gelatinasa entre otros, han sido estudiados por diferentes autores en la determinación de la patogenicidad de diferentes estirpes bacterianas (KUMARAN y CITARASU, 2016).

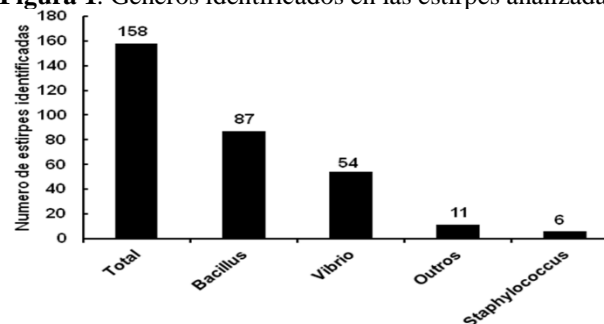
De la misma forma que otros parámetros como la salinidad (ANAND et al., 2014) la temperatura y el pH del agua (VINATEA et al., 2010) pueden variar de acuerdo a diferentes condiciones de cultivo por lo que las cepas seleccionadas como posibles probióticos deben resistir a una amplia variación de estos parámetros (VIEIRA et al., 2013).

3.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Importante destacar que la identificación molecular de las estirpes mostró una alta similitud (99%-100%) para todos los géneros y especies identificadas.

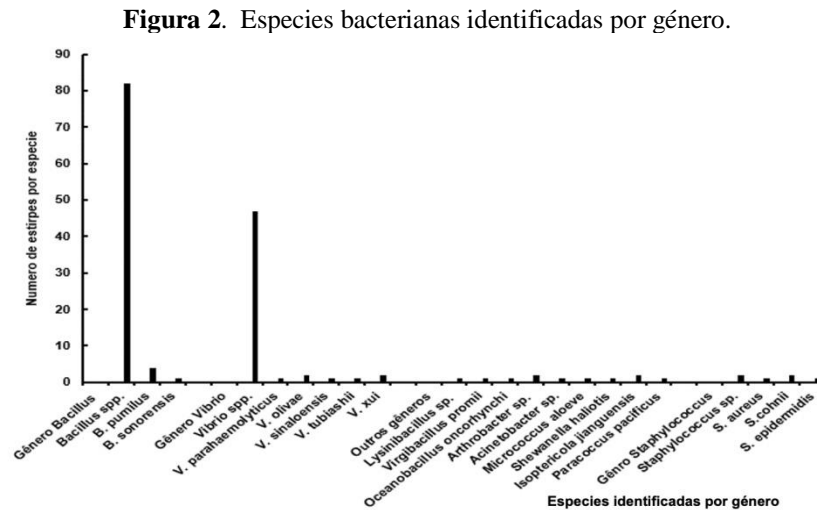
Una vez realizadas los análisis, de un total de 191 estirpes fueron identificadas 158 para 82,72%. De las cepas identificadas 55,06% pertenecían al género *Bacillus*, 34,17% al género *Vibrio*, 6,96% al género *Staphylococcus* y 3,79% a otros géneros bacterianos (figura 1). Las 33 estirpes restantes no fueron identificadas por ausencia de similitud con cualquiera de los grupos bacterianos con los que fueron comparados.

Figura 1. Géneros identificados en las estirpes analizadas



De los géneros identificados, encabeza la lista el género *Bacillus* con 78 estirpes identificadas como *Bacillus* sp., cinco estirpes (*B. pumilus*) y una especie (*B. sonorensis*). Del género *Vibrio* fueron identificadas 47 estirpes como *Vibrio* spp., dos estirpes (*V. olivae*), dos estirpes (*V. xui*) y una estirpe

de cada una de las siguientes especies: *V. parahaemolyticus*, *V. sinaloensis* y *V. tubiashii* (Figura 2). Dentro de las estirpes bacterianas consideradas como otros géneros fueron identificadas dos estirpes como *Arthrobacter* sp. y dos estirpes como *Isopterícola jianguisensis*. Una cepa de cada género género fue identificada. Ningún miembro de la familia Enterobacteriaceae fue identificado. El género bacteriano con menor número de representantes fue *Staphylococcus* con seis estirpes bacterianas (Figura 2).



Bacterias del género *Bacillus* han sido utilizadas como probióticos en ambiente de carcinicultura (FERREIRA *et al.*, 2015; FRANCO *et al.*, 2016)

Vibrios spp. patogénicos han estado relacionados como agentes causales de diferentes enfermedades en ambiente de carcinicultura (CHEN *et al.*, 2016; CHUMPOL *et al.*, 2017).

Bacterias del género *Lysinibacillus* han sido aisladas e identificadas en diferentes fuentes ambientales (GÓMEZ-GARZÓN, HERNÁNDEZ-SANTANA y DUSÁN, 2016; ZOTHANPUIA *et al.*, 2016).

Aunque para pez, Hamza *et al.*, 2016 confirmaron la acción de *Virgibacillus promii* y *Bacillus mojavensis* como probióticos para la mejoría de las condiciones del microambiente intestinal del huésped así como, el rendimiento de su crecimiento y sobrevivencia.

Este estudio permitió la identificación de una estirpe bacteriana como *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis*. Bacterias del género *Oceanobacillus* han sido aisladas e identificadas en diferentes fuentes ambientales (NAMWONG *et al.*, 2009; LIU y YANG, 2014).

Arthrobacter sp. como probiótico único o en consorcio con otras estirpes bacterianas han sido probadas en diferentes organismos marinos: pez-Bacalao Ártico (*Gadus morhua* L.) (LAUZON *et al.*,

2010) y camarones marinos (*Litopennaeus vannamei*) (RAMACHANDRAN et al., 2016; XIA, ZHU y ZHANG, 2013).

Acinetobacter sp. fue encontrada entre las cinco especies bacterianas patógenas aisladas de los apéndices torácicos de camarones enfermos (PURIVIROJKUL, 2013).

La acción antagónica de bacterias del género *Micrococcus* contra patógenos en ambiente de acuicultura ha sido reportada en diferentes estudios (AKAYLI et al., 2016; BARCENAL, TRAI FALGAR y CORRE, 2015)

Los efectos del uso combinado y simple de *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 y *Aeromonas bivalvium* D15 aisladas del intestino del camarón *Litopennaeus vannamei* y suministradas en la dieta, fueron evaluados por Hao et al., 2014. Los resultados de este estudio indicaron que las tres cepas únicas o combinadas podrían tener un rol importante como probióticos para ser utilizadas en ambientes de carcinicultura.

El género *Isoptericola* fue descrito por Stackebrandt, Schumann y Cui, 2004. Actualmente la colección germánica de micro-organismos (DSMZ) presenta siete especies conocidas pertenecientes a ese género (DSMZ, 2020).

Bacterias del género *Paracoccus* han sido aisladas y estudiadas para su uso como potencial probiótico (WANKA et al., 2018).

Bacterias del género *Staphylococcus* han sido aisladas en ambiente de acuicultura: *Staphylococcus cohnii* - pez garopa-tigre (*Epinephelus fuscoguttatus*) (NURHIDAYU et al., 2012); *Staphylococcus aureus* - camarones capturados en los mares del Golfo Pérsico, Mar de Omán y Océano Índico (ARFATAHERY et al., 2015); *Staphylococcus epidermidis* – camarón *Penaeus indicus* (ESAKKIRAJ et al., 2010).

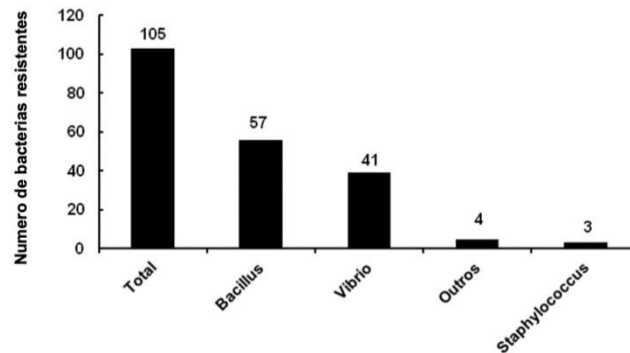
3.5 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

En relación a los antimicrobianos, todas las estirpes (191) presentaron susceptibilidad al cloranfenicol y florfenicol (100%). En este estudio las estirpes bacterianas mostraron alta resistencia (>50%) a la oxitetraciclina.

De las 158 estirpes identificadas, 105 estirpes (66,45%) presentaron resistencia frente a la oxitetraciclina y nueve estirpes (5,08%) presentaron respuesta intermedia frente a la oxitetraciclina (tres estirpes pertenecientes al género *Vibrio* y tres estirpes pertenecientes a otros géneros bacterianos, dos estirpes del género *Bacillus* y una estirpe perteneciente al género *Staphylococcus*). Las restantes estirpes identificadas resultaron sensibles a los antimicrobianos evaluados.

El orden de los géneros bacterianos de mayor a menor frecuencia de la resistencia fue la siguiente: *Bacillus* > *Vibrio* > Otros géneros > *Staphylococcus* (figura 3).

Figura 3. No. de estirpes resistentes por género bacteriano.



La oxitetraciclina, antimicrobiano de la clase de las tetraciclinas es de amplio espectro que además de ser utilizado en la clínica ha sido utilizado en la veterinaria y la acuicultura para el control de las enfermedades y como promotor del crecimiento (GHOUSE, 2015). Es el antimicrobiano más utilizado en el alimento de camarones y en combinación con otros antimicrobianos (cloranfenicol, ácido oxonílico y formalina) (LAKSHIMI, VISWANATH y SAI GOPAL, 2013).

La presión selectiva ejercida por el uso de este antimicrobiano en diferentes ambientes ha resultado en la diseminación de la resistencia en organismos gram-positivos y gram-negativos a través de la transferencia conjugativa de transposones o plásmidos (CHOPRA y ROBERTS, 2001).

Rebouças et al., 2011 evaluaron los perfiles de resistencia fenotípica de bacterias del género *Vibrio* en muestras de agua de ambiente de carcinicultura y de hepatopáncreas de camarón marino cultivado en dos granjas de cultivo del Estado de Ceará, NE de Brasil. Similar a los resultados encontrados en este estudio, las bacterias del género *Vibrio* resultaron susceptibles al florfenicol y presentaron resistencia a la oxitetraciclina.

Bacterias del género *Vibrio* fueron aisladas de agua y sedimento del estuario de Acaraú (granja de carcinicultura) en Ceará, Brasil y evaluadas para el perfil de resistencia a los antimicrobianos seleccionados por su uso en la industria del camarón y mecanismos de acción. Tetraciclina y oxitetraciclina fueron antibióticos probados como inhibidores de la síntesis proteica. Fue verificado en los aislamientos bacterianos del agua y los sedimentos la presencia de cepas resistentes a la oxitetraciclina y tetraciclina (ROCHA, SOUSA y VIEIRA, 2016).

Diferentes géneros bacterianos aislados de ambiente de carcinicultura han sido identificados y evaluados con resistencia a la tetraciclina/oxitetraciclina: *Bacillus* (SUNDARAMANICKAM et al., 2015) y *Aeromonas-Shewanella-Vibrio-Lactococcus* (YANO et al., 2011) entre otros géneros.

Importante destacar que de las cepas identificadas, nueve estirpes (5,08%) presentaron respuesta intermedia frente a la oxitetraciclina, el resto de las estirpes resultaron sensibles. De las nueve estirpes, dos estirpes pertenecían al género *Bacillus*, tres estirpes del género *Vibrio*, una estirpe al género *Staphylococcus* y tres estirpes pertenecientes a otros géneros bacterianos. Aunque considerado un porcentaje bajo de estirpes (<25%) con valores intermedios, este resultado puede ser considerado como una alerta por la posible transferencia a otras bacterias en el ambiente además de indicar una tendencia de la población bacteriana a tornarse resistente a la acción del antimicrobiano, siendo, por tanto, un indicativo de resistencia futura.

3.6 PRUEBA DE AGREGACIÓN

La mayoría de las estirpes (113) para un 59,16% resultó con agregación negativa y 40,83% presentaron resultados de agregación positiva (78 cepas).

Tres grupos de estirpes fueron priorizados (70 estirpes) tomando en cuenta los resultados positivos obtenidos en las pruebas precedentes.

Las estirpes bacterianas de estos tres grupos fueron evaluadas en las pruebas de antagonismo frente a patógenos.

Como es conocido, estirpes evaluadas con potencial probiótico poseen propiedades características de cada estirpe y no de un género o aún de una determinada especie (JANKOVIĆ et al., 2012). La agregación es una característica necesaria para la adhesión, pre-requisito para la colonización de las células adherentes en el tracto gastrointestinal (KOS et al., 2003; RE et al., 2000) por lo que el probar la capacidad de agregación de una estirpe bacteriana es una característica importante y prioritaria para su evaluación como probiótico (JANKOVIĆ et al., 2012).

3.7 PRUEBA DE ANTAGONISMO

Ninguna estirpe bacteriana resultó antagónica frente a *Vibrio parahaemolyticus*. De las 70 estirpes bacterianas que formaron parte de los tres grupos prioritarios, 16 estirpes (22,85%) resultaron antagónicas frente a *Vibrio harvey*. Doce estirpes bacterianas presentaron resultados satisfactorios en la técnica de antagonismo cruzado.

Una de las propiedades más importante de un candidato probiótico es su habilidad de inhibición o antagonismo (BANERJEE y RAY, 2017). El antagonismo es un fenómeno natural que constituye una

herramienta aplicable para reducir o eliminar patógenos oportunistas (IBRAHEM, 2015). Los ensayos de antagonismo bacteriano *in vitro*, son utilizados en la selección de probióticos para camarón y así verificar la eficiencia o habilidad para excluir competitivamente al patógeno indeseado (KNIPE et al., 2020).

Fueron formados tres consorcios con representantes bacterianos de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Isoptricola* y *Shewanella*. Fue verificado para cada estirpe el cumplimiento de los siguientes requisitos:

- a. Pertenecer a uno de los tres grupos prioritarios formados (según los resultados obtenidos en las pruebas de virulencia, tolerancia a diferentes temperaturas, viabilidad bajo diferentes valores de pH y agregación).
- b. No pertenecer al género *Vibrio*
- c. No poseer resistencia frente a los antimicrobianos probados
- d. Mostrar actividad antagonica (inhibitoria) frente al patógeno *V. harvey*
- e. No presentar antagonismo (inhibición) cruzado entre las estirpes evaluadas

4 CONCLUSIÓN

Bacterias gram-negativas y gram-positivas mostraron características potenciales de probióticos en el camarón, teniendo al género *Bacillus* como principal competidor entre los diferentes géneros evaluados, más otros géneros bacterianos también mostraron características de potencial probiótico para la formación del consorcio.

No existe un protocolo general para la elaboración y aplicación de los probióticos en el camarón marino, más es conocido a nivel internacional que su desarrollo es considerado un procedimiento de múltiples pasos que valora como etapas claves, el aislamiento, identificación y caracterización de las estirpes que serán utilizadas con ese fin (test *in vitro*). Si bien, es importante este primer paso, las pruebas de las estirpes *in vivo*, cierra el ciclo de pruebas para el establecimiento y aplicación del probiótico para su uso en el camarón marino cultivado por lo que futuros estudios precisan ser realizados para evaluar la eficacia tanto en el organismo cultivado como en su ambiente de cría

REFERENCIAS

- AKAYLI, T.; ALBAYRAK, G.; ÜRKÜ, Ç.; CANAK, Ö.; YÖRÜ, E. **Characterization of *Micrococcus luteus* and *Bacillus marisflavi* recovered from Common Dentex (*Dentex dentex*) larviculture system.** Mediterranean Marine Science, v. 17, n.1, p. 163-169, 2016.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANAND, P.S.H.; PILLAI, S.M.; KUMAR, S.; PANIGRAHI, A.; RAVICHANDRAN, P.; PONNIAH, A.G.; GHOSHAL, T.K. Growth, survival and length weight relationship of *Fenneropenaeus merguensis* at two different stocking densities in low saline zero water exchange brackishwater ponds. Indian Journal of Geo-Marine Science, v. 43, n.10, p. 1955-1966, 2014.
- ARFATAHERY, N., MIRSHAFIEY, A.; ABEDIMOHTASAB, T.P.; ZEINOLABEDINIZAMANI, M. Study of the prevalence of *Staphylococcus aureus* in marine and farmed shrimps in Iran aiming the future development of a prophylactic vaccine. Procedia in Vaccinology, v. 9, p. 44-49, 2015.
- BANERJEE, G.; RAY, A.K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Research in Veterinary Science, v. 115, p.66-77, 2017.
- BARCENAL, A.R.B.; TRAI FALGAR, R.F.M.; CORRE, V.L.Jr. Anti-*Vibrio harveyi* Property of *Micrococcus luteus* Isolated from Rearing Water under Biofloc Technology Culture System. Current Research in Bacteriology, v. 8, n. 2, p. 26-33, 2015.
- BAUER, A. W.; KIRBY, M. M.; SHERRIN, J. D. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. American Journal of Pathology, v.45, p.493-496, 1966.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.L. GenBank. Nucleic Acids Research, v. 30, n. 1, p.17-20, 2002.
- BIDHAM, C. De; MEENA, D.K.; BEHERA, B.K.; PRANO B DAS, P.K.; MOHAPATRA, D.; SHARMA, A.P. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. Fish Physiology and Biochemistry, 51 p.,2014.
- CAI, Y.; SUYANANDANA, P.; SAMAND, P.; BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General and Applied Microbiology, v. 45, p. 177-184, 1999.
- CHAPMAN, C.M.C., GIBSON, G.R., ROWLAND, I. In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. Anaerobe, v.18, p. 405-413, 2012.
- CHEN, Y-Y.; KITIKIEW, S.; YEH, S-T.; CHEN, J-CH. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received fucoidan exhibit a defense against *Vibrio alginolyticus* and WSSV despite their recovery of immune parameters to background levels. Fish & Shellfish Immunology, v. 59, 414e426, 2016.

CHOPRA, I; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 232-260, 2001.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L.; BEACHEY, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity*, Washington, v. 37, n. 1, p. 318-326, 1985. CHUMPOL, S.; KANTACHOTE, D.; NITODA, T.; KANZAKI, H. The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation. *Aquaculture*, v. 473, p. 327-338, 2017.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-third Informational Supplement: Supplement M100-S20, v. 33, n.1, 205 p., Wayne, PA, USA, 2013.

DSMZ- DEUTSCHE SAMMLUNG von MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN. Disponível em: <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html#searchResult>. Access: 19 de Mayo 2020.

ESAKKIRAJ, P.; RAJKUMARBHARATI, M.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp *Penaeus indicus*. *Annals of Microbiology*, v.60, p. 37-42, 2010.

FAR, H.Z.; SAAD, Ch. R.B.; DAUD, H.M.;KAMARUDIN, M.S.; RAMEZANI-FARD, E. Isolation and Identification of bacteria micro flora of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, with antagonistic properties against *Vibrio* species. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.8, n.2, p. 293-300, 2013.

FERREIRA, G.S.; BOLIVAR, N.C.; PEREIRA, S.A.; GUERTLER, C.; VIEIRA, F.N.; MOURIÑO, J.L.P.; SEIFFERT, W.Q. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 448,p. 273–279, 2015.

FERREIRA, M.G.P.; MELO, F.P.; LIMA, J.P.V.; ANDRADE, H.A.; SEVERI, W.; CORREIA, E.S. Bioremediation and biocontrol of commercial probiotic in marine shrimp culture with biofloc. *Latin American Journal of Aquatic Research.*, v.45, n.1, p. 167-176, 2017.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018*. Meeting the sustainable development goals. Rome. 227 p, 2018.

FRANCO R.; MARTÍN L.; ARENAL A.; SANTIESTEBAN D.; SOTOLONGO J.; CABRERA H.; MEJIAS J.; RODRÍGUEZ G.; MORENO A.G.; PIMENTEL E.; CASTILLO N.M. Evaluation of two probiotics used during farm production of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture Research*, v. 2016, p. 1-15, 2016.

GHOUSE, M. Use of probiotics as biological control agents in aquaculture for sustainable development. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, v. 5, n.1. p. 112-119, 2015.

GÓMEZ-GARZÓN, C.; HERNÁNDEZ-SANTANA, A. DUSSÁN, J. Comparative genomics reveals *Lysinibacillus sphaericus* group comprises a novel species. BMC Genomics, v.17, 709-718, 2016.

HAI, N.V. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology, v. 119, p. 917-935, 2015.

HAMZA, A.; FDHILA, K.; ZOUITEN, D.; MASMOUDI, A.S. *Virgibacillus proomii* and *Bacillus mojavensis* as probiotics in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Fish Physiology and Biochemistry, v. 42, p. 495–507, 2016.

HAO, K.; LIU, J-Y.; LING, F.; LIU, X-L.; LU, L.; XIA, L.; WANG, G-X. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, v. 428-429, p. 141-149, 2014.

IBRAHEM, D.I. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. Journal of Advanced Research, v. 6, p. 765-791, 2015.

JANKOVIĆ, T.; FRECE, J.; ABRAM, M.; GOBIN, I. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. International Journal of Sanitary Engineering Research, v. 6, n.1, p. 19-24, 2012.

KNIPE, H.; TEMPERTON, B.; LANGE, A.; BASS, D.; TYLER, Ch. Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. Reviews in Aquaculture, p. 1-29, 2020.

KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; ŠIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOŠIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal of Applied Microbiology, v. 94, p. 981-987, 2003.

KUMARAN, T.; CITARASU, T.; Isolation and characterization of *Vibrio* Species from shrimp and artemia culture and evaluation of the potential virulence factor. Intellectual Property Rights, vol. 4, issue 1, 5 p. 2016.

LAKSHMI, B.; VISWANATH, B.; SAI GOPAL, D.V.R. Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. Journal of Pathogens, v.2013, 13 p., 2013.

LAUZON, H.L.; GUDMUNSDOTTIR, S.; STEINARSSON, A.; ODDGEIRSSON, M.; MARTINSDOTTIR, E.; GUDMUNSDOTTIR, B.K. Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. Aquaculture, v. 310, p. 139–144, 2010.

LAZADO, C.C.; CAIPANG, C.M.A. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. Aquaculture, v. 424–425, p. 53-62, 2014.

LIU, W.; YANG, S.Sh. *Oceanobacillus aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium. Antonie van Leeuwenhoek, v. 105, p. 801–808, 2014.

LUIS-VILLASEÑOR, E.I.; CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; ASCENCIO-VALLE, F.J. Probiotics in Larvae and Juvenile Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Chapter 27, Intech. Open Access Publisher, p. 601-622, 2012.

MIRBAKHS, M.; AKHAVANSEPAHY, A.; AFSHARNASAB, M.; KHANAFARI, A.; RAZAVI, M.R. Screening and evaluation of indigenous bacteria from the Persian Gulf as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae. Iranian Journal of Fisheries Sciences, v.12, n.4, p. 873- 886, 2013. NAMWONG, S.; TANASUPAWAT, S.; LEE, K. CH.; LEE, J-S. *Oceanobacillus kapiialis* sp. nov., from fermented shrimp paste in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 59, p. 2254–2259, 2009.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBI, A.H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, v. 31, p. 1-11, 2014. NURHIDAYU, A.; INA-SALWANY, M.Y.; DAUD, H.M.; HARMIN, S.A. Isolation, screening and characterization of potential probiotics from farmed tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 9, p. 1924-1933, 2012.

PURIVIROJKUL, W. Application of Probiotic Bacteria for Controlling Pathogenic Bacteria in Fairy Shrimp *Branchinella thailandensis* culture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v.13, p.187-196, 2013.

RAMACHANDRAN, K.; ELAYAPERUMAL, G.; MISHRA, S.; RAMALINGAM, K.; VANITHA, M.C. Beneficial microbes as probiotics on aquaculture to bring sustainability in blue revolution. International Journal of Recent Scientific Research, v. 7, p. 14606-14612, 2016.

RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology, v. 31, p. 438-442, 2000.

REANTASO, M.B. *FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): A Game Changer in Aquaculture. FAO Aquaculture Newsletter, no. 55, p. 50-51, 2016.*

REBOUÇAS, R.H.; SOUSA, O.V.; LIMA, A.S.; VASCONCELOS, F.R.; CARVALHO, P.B.; VIEIRA, R.H.S.F. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. Environmental Research, v. 111, p. 21–24, 2011.

ROCHA, R.S.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. Marine Pollution Bulletin, v.105, p. 337-340, 2016.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SOTO-RODRIGUEZ, S.A.; GOMEZ-GIL, B.; LOZANO, R.; RIO-RODRÍGUEZ, R.; DIÉGUEZ, A.L.; ROMALDE, J.L. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 109, p. 307–317, 2012.

STACKEBRANDT, E., SCHUMANN, P.; CUI, X-L. Reclassification of *Cellulosimicrobium variable* Bakalidou *et al.* 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 54, p. 685–688, 2004.

SUNDARAMANICKAM, A.; KUMAR, P.S.; KUMARESAN, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant halophilic bacteria from shrimp farm effluents of Parangipettai coastal waters. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, p. 11700-11707, 2015. TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis; version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v.30,n.12 p. 2725-2729, 2013.

VERSCHUERE, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos P.*et al.* Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n.4, p. 655-671, 2000.

VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, E.A.; SOARES, M.; SILVA, B.C.; SEIFFER, W.Q.; MARTINS, M.L.; VINATEA, L.A. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasília, v.48, n.8, p. 998-1004, 2013.

VINATEA, L.; GÁLVEZ, A.O.; BROWDY, C.L.; STOKES, A.; VENERO, J.; HAVEMAN, J.; LEWIS, B.L.; LAWSON, A.; SHULER, A.; LEFFLER, J.W. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering*, v. 42, p. 17-24, 2010.

WANKA, K.M.; DAMERAU, T.; COSTA, B.; KRUEGER, A.; SCHULZ, C.; WUERTZ, S. Isolation and characterization of native probiotics for fish farming. *BMC Microbiology*, v. 18, 13 p., 2018.

XIA, Z.; ZHU, M.; ZHANG, Y. Effects of the probiotic *Arthrobacter* sp. CW9 on the survival and immune status of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Letters in Applied Microbiology*, v. 58, p. 60-64, 2013.

YANO, Y.; HAMANO, K.; SATOMI, M.; TSUTSUI, I.; AUE-UMNEOY, D. Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, p. 713-722, 2011.

ZOKAEIFAR, H.; BALCÁZAR, J.L.; KAMARUDIN, M.S.; SIJAM, K.; ARSHAD, A.; SAAD, Ch.R. Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. *The Journal of Antibiotics*, v.65, p. 289-294, 2012.

ZOTHANPUIA, PASSARI, A.K.; GUPTA, V.K.; SINGH, B.P. Detection of antibiotic-resistant bacteria endowed with antimicrobial activity from a freshwater lake and their phylogenetic affiliation. *PeerJ*, v. 4, e2103, 2016.