

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**FELIPE CARNEIRO DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
VIBRIO EM ÁGUA DE CULTIVO DE CAMARÃO *Penaeus vannamei* (Boone,  
1931)**

**PALOTINA**

**2023**

**FELIPE CARNEIRO DOS SANTOS**

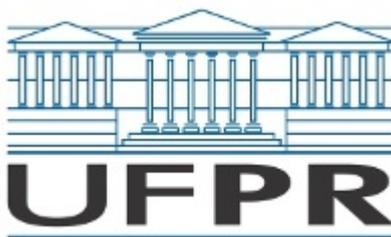
**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
VIBRIO EM ÁGUA DE CULTIVO DE CAMARÃO *Penaeus vannamei* (Boone,  
1931)**

Artigo apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fiorini Rosado.

**PALOTINA**

**2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS  
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

## Ata de Reunião

Aos trinta e um dias do mês de novembro do ano de 2023, às dezenove horas, na sala 13 do Bloco Seminário da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "**Caracterização fenotípica e molecular de bactérias do gênero *Vibrio* em água de cultivo de camarão *Penaeus vannamei***" apresentado pelo discente **Felipe Carneiro dos Santos**, orientado pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Defesa Oral, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Defesa Oral, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, nota 95 (noventa e cinco), Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota 95: (noventa e cinco), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 100 (cem). A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 97 (noventa e sete). Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:30, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:58, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6245983** e o código CRC **76CFC248**.

# CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÊNERO VIBRIO EM ÁGUA DE CULTIVO DE CAMARÃO *PENAEUS VANNAMEI* (BOONE, 1931)

Felipe Carneiro dos Santos

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo identificar as espécies de *Vibrio* presentes na água de cultivo de camarões *Penaeus vannamei*. As análises empregadas incluíram o isolamento em meios seletivos, provas bioquímicas, teste de susceptibilidade a antibióticos e identificação molecular. Os resultados mostraram que os meios de cultura seletivos e diferenciais para a identificação de *Vibrio* spp., são muito úteis na rápida caracterização desses agentes, com o isolamento de *Vibrio* spp. nas amostras de água, confirmando-se, por via molecular, da espécie *V. alginolyticus* e a confirmação de outras 4 amostras para o gênero *Vibrio*. Para o antibiograma, há um isolado sugestivo de *V. cholerae*, apresentando maior resistência aos antibióticos, comparado com o perfil da outra amostra. Nota-se também que norfloxacin mostra-se eficaz contra ambos os isolados e oxacilina e penicilina, os menos eficazes. Nas provas bioquímicas, apenas uma amostra foi capaz de liquefazer a gelatina, quatro fermentaram a lactose, três foram positivas para uso do citrato, três apresentaram motilidade, duas foram indol positivo, quatro não produziram H<sub>2</sub>S e todas as cepas mostraram-se negativas para a presença de urease. As provas bioquímicas tiveram alguns resultados como o esperado para as amostras indicativas de espécies específicas, assim como alguns resultados divergiram do esperado.

Palavras-chave: *Vibrio* spp. Camarão. Caracterização.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de camarão em cativeiro cresceu de forma acentuada nos últimos anos. De acordo com dados da FAO (2022), entre 2016 e 2020, a pesca mundial de camarão tem reduzido a uma taxa de -1,82% ao ano, enquanto a carcinicultura cresceu 8,99% ao ano. Atualmente a aquicultura atende a maior parte

da demanda mundial por camarão e a espécie *P. vannamei* é a mais criada no mundo (XIMENES e VIDAL, 2023). O camarão é considerado uma das principais *commodities*, dentre os produtos aquícolas (BALLESTER et al., 2017).

Como resultado deste crescimento, surge a preocupação com as questões sanitárias durante a criação dos camarões, destacando-se a ocorrência de vibrioses em camarões de cultivo, já que as bactérias do gênero *Vibrio* são patógenos oportunistas e são habitantes marinhos naturais (MARTINS et al., 2022). Estas doenças podem afetar todos os estágios de desenvolvimento do camarão, podendo ser letais, principalmente na fase larval dos peneídeos, causando grande impacto na carcinicultura. Não só estes crustáceos, como o homem também pode ser acometido por infecções causadas por *Vibrio* (TRINANES e MARTINEZ-URTAZA, 2021) caso o alimento contaminado seja ingerido cru ou malcozido. Posto isso, o manejo sanitário controlado se faz imprescindível para a garantia da saúde e qualidade dos crustáceos e o conhecimento da microbiota, bem como a rapidez do diagnóstico laboratorial são essenciais para esta manutenção.

A pesquisa das espécies de *Vibrio* presentes no cultivo, na forma livre presente nas águas dos criadouros, é de suma importância, auxiliando nas tomadas de decisões necessárias, para a manutenção das condições sanitárias adequadas, na atividade de criação. As infecções de origem alimentar causadas por espécies de *Vibrio* mostraram uma tendência ascendente. A espécie *Vibrio parahaemolyticus* é responsável pela maioria das infecções associadas ao gênero *Vibrio* (YEUNG e BOOR, 2012). Assim, a diferenciação precisa entre as espécies é extremamente importante para garantir a segurança alimentar. Os métodos para identificação de *Vibrio*, dependentes da cultura microbiológica ainda são realizados rotineiramente e são considerados métodos padrão em determinadas circunstâncias. No entanto, a utilização de técnicas moleculares é cada vez mais comum e permite um melhor diagnóstico das espécies (LOO et al., 2022).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo identificar, através de análises microbiológicas e moleculares, espécies de *Vibrio* isoladas de água de sistema experimental de criação do camarão marinho *P.vannamei*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os alimentos de origem aquática estão cada vez mais sendo reconhecidos pela importância nutricional, seja ela proteica ou como fonte diversificada de ácidos graxos ômega-3 essenciais e micronutrientes biodisponíveis (FAO, 2022). Os crustáceos possuem destaque, dentre estes produtos, por serem considerados uma iguaria e pelo alto valor agregado, trazendo rentabilidade ao mercado da carcinicultura. A criação de camarões vem crescendo de forma acentuada. De acordo com FAO (2022), a carcinicultura expandiu 36% entre os anos de 2015 e 2019, sendo o *Penaeus vannamei* a espécie mais cultivada em 2020, correspondendo a 51,7% do total de crustáceos produzidos mundialmente. A China ocupa o primeiro lugar, com 1,86 mil toneladas produzidas em 2020, seguida da Índia e do Equador (XIMENES et al., 2023).

No Brasil, em 2020 a produção correspondeu a 1% do volume mundial total. Mesmo possuindo grande potencial para a aquicultura, a métrica foi inversa à dos grandes produtores, com redução de aproximadamente 23% entre os anos de 2016 e 2020 (XIMENES et al., 2023). O Nordeste possui características climáticas que beneficiam a cultura de camarões, com temperaturas elevadas e períodos curtos de chuva, fazendo com que esta região responda por 99,71% da carcinicultura do Brasil. Em 2022, a produção foi de aproximadamente 113,3 mil toneladas no Nordeste, tendo o Ceará como maior estado produtor com 61,3 mil toneladas de camarão, seguido pelo Rio Grande do Norte com 25,1 mil toneladas e Paraíba, 7,2 mil toneladas (IBGE, 2023).

Considerando as condições sanitárias das criações, a carcinicultura mundial vem experimentando grandes perdas na produção, provocadas por patógenos do gênero *Vibrio*, especialmente na larvicultura e na engorda de camarões, na fase juvenil (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004). O crescimento rápido na criação de camarões é ameaçado por doenças provocadas por vibrios, que afetam seu crescimento e sua sobrevivência, estes patógenos oportunistas são naturais da microbiota dos camarões, provocando doenças quando ocorrem condições desfavoráveis no sistema de cultivo (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2001).

De acordo com Murray et al (2022), o gênero *Vibrio* é constituído por bacilos pequenos (0,5 a 3  $\mu\text{m}$ ), curvos, com flagelos polares, Gram-negativos, anaeróbios

facultativos, fermentadores e oxidase positiva. São encontrados naturalmente em ambientes marinhos e de estuários, são halofílicos, necessitando de cloreto de sódio (NaCl) para seu crescimento, com exceção do *Vibrio cholerae* que cresce em meios sem a adição de sal. Baker-Austin e al. (2018), citam que os vibrios se originam de ambientes aquáticos e marinhos, preferindo água salobra e ambientes quentes. Mais de 150 espécies compõem o gênero *Vibrio* (MURRAY, 2022), dentre estas ao menos 12 são capazes de causar infecções em humanos (RYDER et al., 2014), sendo *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *V. cholerae* as principais espécies causadoras de doenças transmitidas pelo consumo de frutos do mar (FAO/WHO, 2003).

Dentre os agentes frequentemente isolados causadores de Vibrioses em camarões, destacam-se *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio costicola*, *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus* (VIEIRA, 2009). Nunes e Martins (2002) afirmam que as principais espécies causadoras de prejuízos na carcinicultura são *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus*, também destacam que as Vibrioses são infecções oportunistas, causadas principalmente quando há estresse no sistema de cultivo, citando, queda de oxigênio; superpovoamento; manuseio inapropriado; lesões na cutícula dos camarões; subalimentação; e concentrações elevadas de compostos nitrogenados no ambiente. Alguns fatores de estresse podem ser, alteração do pH, a temperatura da água, o fotoperíodo e a alta densidade de peixes em viveiros (REHMAN et al., 2017). A infecção causada por essas bactérias acarreta sintomas nos camarões, como desorientação, hemolinfa turva, tempo de coagulação alterado, aglomeração nas margens do viveiro, opacidade da musculatura, coloração avermelhada dos apêndices, curvatura do músculo abdominal, melanização das brânquias, cutícula e apêndices, anorexia e apatia (MENDES et al., 2005).

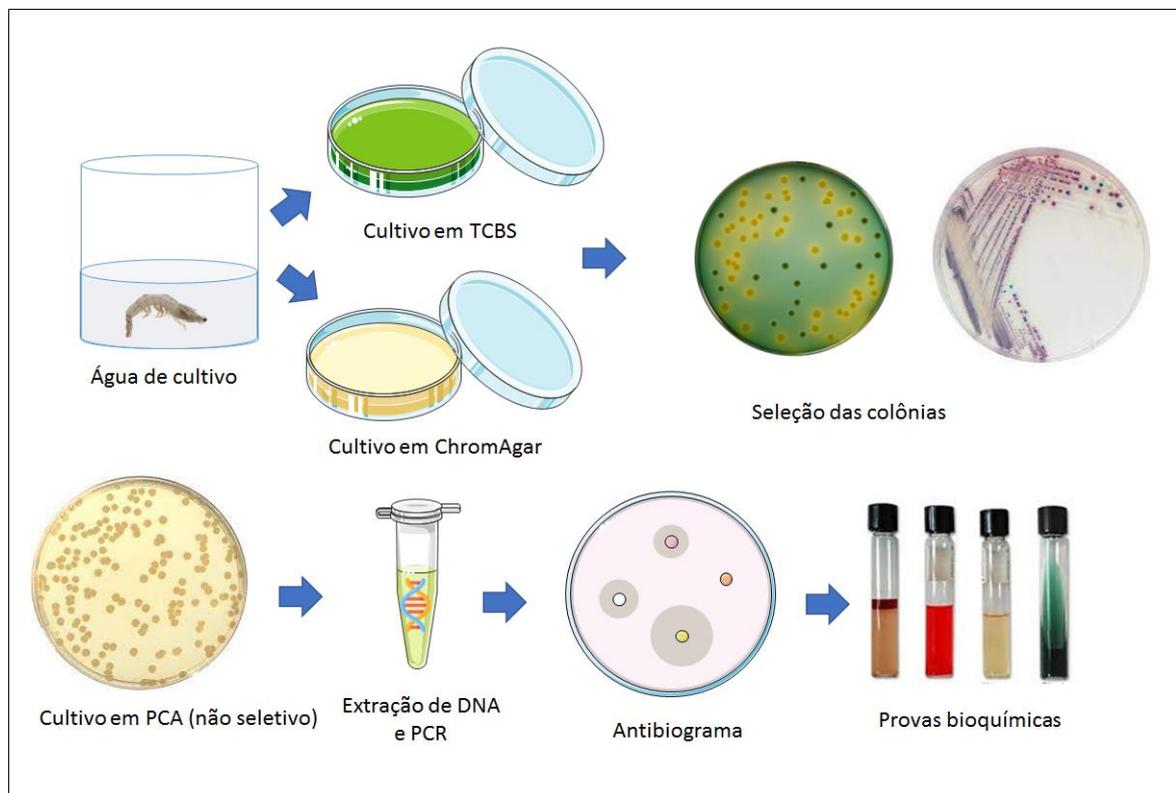
Em um estudo conduzido por Vandenberghe et al. (1999), *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* foram isolados em grande parte das amostras, sendo o primeiro encontrado em larvas de camarões saudáveis e quando observado o estágio pós larval, *V. alginolyticus* estava associado a camarões doentes, enquanto *V. parahaemolyticus*, foi encontrado com mais frequência em juvenis e adultos. *V. parahaemolyticus* podem causar mortalidade de até 100%, em viveiros (SUDHEESH e XU, 2001). A espécie *V. vulnificus* é fenotipicamente similar ao *V. parahaemolyticus*, podendo ser diferenciado pela capacidade de fermentar a lactose (COSTA, 2006).

Para Baker-Austin et al. (2017), as Vibrioses podem ser adquiridas por duas formas, exposição à água e consumo de alimentos contaminados, sendo as espécies *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* as que mais aparecem em relatos de infecções. Em outro estudo, Baker-Austin et al. (2018), citam que as doenças causadas por *Vibrio* podem ser divididas em dois grupos, cólera, que desencadeia gastroenterites graves, e Vibrioses, sendo que os sintomas dependem da espécie do patógeno, forma de infecção e suscetibilidade da pessoa, podendo levar a gastroenterites leves, septicemia primária e também septicemia secundária, causando infecções subcutâneas e nos músculos, oriundas de ferimentos (BREHM et al., 2020; CHOCHLAKIS et al., 2019).

### 3. METODOLOGIA

As etapas do procedimento experimental estão sumarizadas na Figura 1.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



Fonte: O Autor (2023).

### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

As análises foram realizadas no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), setor Palotina.

### 3.2 AMOSTRAGEM

As amostras foram constituídas de água de sistema experimental de criação de camarão (*P. vannamei*), coletada no mês de outubro de 2023, na região Oeste do Paraná.

### 3.3 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

Foi coletado 100µL da água de cultivo e semeado por “*spread plate*” com utilização da alça de Drigalski em placas de TCBS e CHROMAgar™ Vibrio, incubado a 37°C por 24 horas. As culturas em placas em meio TCBS foram analisadas conforme coloração do meio, como sacarose positivas e negativas. Já as placas de CHROMAgar™ Vibrio foram analisadas baseando-se nas colorações das colônias. As colônias foram também isoladas em meio não seletivo, ágar PCA (*Plate Counting Agar*), com incubação a 37°C por 24 horas.

### 3.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA

As colônias isoladas em CHROMAgar™ foram transferidas para um tubo contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), com incubação em estufa a 37°C por 24 horas, para identificação das espécies de *Vibrio* através de testes bioquímicos. Foram realizadas as provas de gelatinase, fermentação da lactose, citrato, urease, motilidade, produção de indol e produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S).

#### 3.4.1 Gelatinase e Lactose

Do crescimento em caldo BHI, foi retirada uma alíquota, com o auxílio de agulha de níquel-cromo e semeado no meio lactose gelatina, com incubação a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a leitura dos tubos, sendo considerados positivos para gelatinase aqueles que apresentaram liquefação do meio, e para a fermentação da lactose, os que apresentaram a mudança de coloração do meio, passando de vermelho para amarelo.

#### 3.4.2 Citrato

Do caldo BHI, contendo as amostras de *Vibrio*, foi retirada uma alíquota com o auxílio de agulha de níquel-cromo e transferida para um tubo contendo meio Citrato Simmons, com incubação em estufa por 24 horas a 37°C. Após este intervalo de tempo foi realizada a leitura dos tubos, considerando positivos os meios que passaram da coloração verde original para a azul e negativos os que mantiveram a coloração original.

#### 3.4.3 Urease

Do crescimento em caldo BHI, foi retirada uma alíquota com o auxílio de agulha de níquel-cromo e transferida para um micro tubo, contendo caldo de teste de urease, com incubação em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura dos tubos, considerando como resultado positivo, os meios que apresentaram alteração da cor, tornando-se rosa.

#### 3.4.4 Sulfeto, Indol e Motilidade

Utilizando uma agulha de níquel-cromo, foi colhida uma amostra do caldo BHI e inoculada em tubos contendo Ágar Sulfeto, Indol, Motilidade (SIM), realizando uma picada no centro do tubo, os tubos permaneceram em estufa a 37°C por 24 horas, para então realizar a leitura, sendo considerado positivo para sulfeto quando o meio adquire coloração preta. Para o teste de indol, foi adicionado ao meio 3 gotas de reativo de Kovacs, o surgimento de coloração vermelha indica a positividade. Para o teste de motilidade, a positividade se dá quando o meio apresenta crescimento difuso, a partir da picada, tornando-se turvo.

### 3.5 ANTIBIOGRAMA

O teste de susceptibilidade a antibióticos foi realizado pelo método de difusão em ágar, para tal, a concentração de cada amostra foi ajustada à escala McFarland 0,5, através da diluição com solução salina estéril (NaCl 0,85%). Um swab foi umedecido na solução e semeado em toda a placa contendo meio ágar Müller-Hinton (MH). Com o auxílio de uma pinça foi colocado discos de antibióticos, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C, após este período foi realizada a medição do diâmetro do halo de inibição. Os antibióticos utilizados foram Amicacina (AMI) 30µg, Clindamicina (CLI) 2 µg, Oxacilina (OXA) 1 µg, Eritromicina (ERI) 15 µg, Penicilina (PEN) 10 µg, Amoxicilina (AMO) 10 µg, Cefaclor (CFC) 30 µg, Gentamicina (GEN) 10 µg, Norfloxacin (NOR) 10 µg e Ácido Nalidíxico (NAL) 30 µg.

### 3.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS

A extração do DNA dos isolados bacterianos foi realizada a partir de uma colônia previamente isolada e cultivada em 5 mL de meio BHI por até 24 horas a 37°C, utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante para bactérias Gram-negativas. Uma alíquota de 2 µL do DNA extraído foi quantificado com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop2000 (ThermoScientific) e o grau de pureza determinado pela relação A260/280 e A260/230. O protocolo de PCR utilizado foi igual para as quatro reações, variando apenas nas concentrações de cada *primer* (TABELA 1). Os *primers* utilizados foram baseados na publicação de Kim et al. (2015). Foi utilizado o kit da Promega (GoTaq G2) e a reação foi realizada em 25 µl contendo 50 ng do DNA genômico, concentrações padronizadas para cada iniciador, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM do mix de dNTP, 1 U de GoTaq DNA Polimerase no tampão apropriado da enzima e água ultra pura para completar a reação.

As condições de amplificação foram: 5 minutos iniciais a 94 °C, e 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C, como extensão final de 10 minutos a 72 °C. A confirmação da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 3%, em tampão TAE 1x (Tris-base 90 mM, ácido

acético, EDTA 2 mM pH 8,0), corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, utilizando o padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) e fotodocumentado utilizando o equipamento Locus Biotecnologia L.PIX.

TABELA 1 - PARES DE *Primers* UTILIZADOS NA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

Espécie alvo	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração final na PCR (µM)	Sequência <i>Forward</i> e <i>Reverse</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	297	0,24	5'-AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCCG-3' 5'-CKCAAGACCAAGAAAAGCCGTC-3'
<i>Vibrio vulnificus</i>	484	0,4	5'-CAGCCGGACGTCGTCCATTTTG-3' 5'-ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT-3'
<i>Vibrio alginolyticus</i>	199	0,1	5'-ACGGCATTGGAAATTGCGACTG-3' 5'-TACCCGTCTCACGAGCCCAAG-3'
Gênero <i>Vibrio</i>	689	1	5'- GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG-3' 5'-ACYTTRATRCGNGTTTCRTRCC-3'

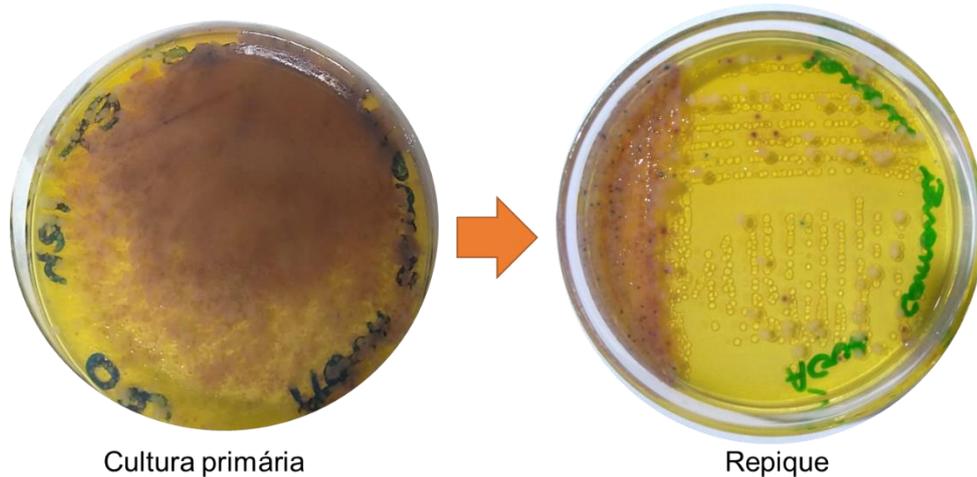
FONTE: O autor (2023).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO DOS ISOLADOS BACTERIANOS EM MEIO TCBS E CHROMAgar™ E IDENTIFICAÇÃO POR PCR

Após semeadura da água de cultivo de *P. vannamei* em meio seletivo e diferencial CHROMAgar™ *Vibrio* (FIGURA 2), foram selecionadas colônias de diferentes colorações (malva, azul e creme), indicativas das espécies *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ou *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* (CHROMAGARTM, 2021).

FIGURA 2 – ISOLAMENTO DE *Vibrio* spp. A PARTIR DE AMOSTRA DE ÁGUA DE CULTIVO DE *P.vannamei*.

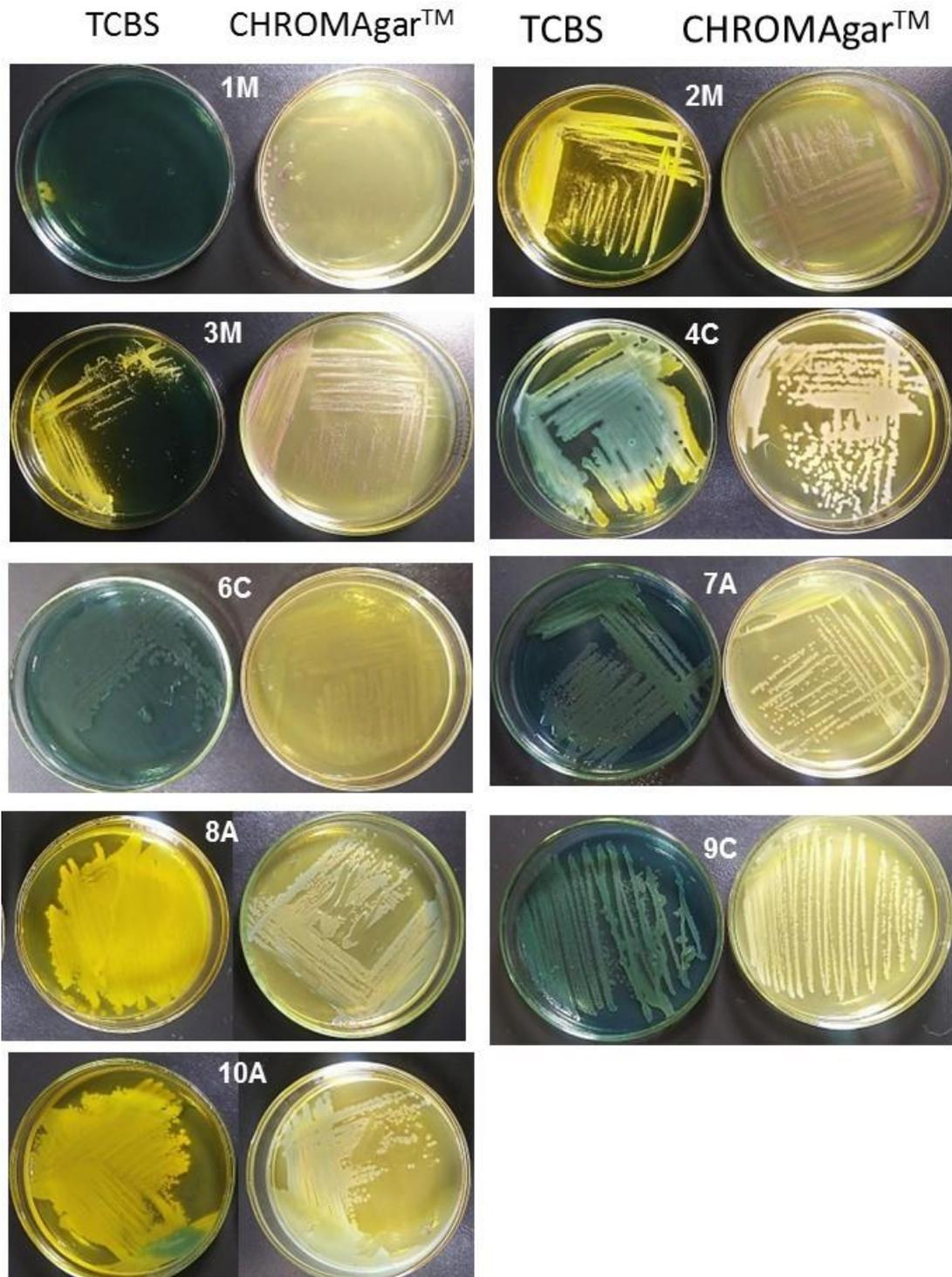


LEGENDA: Aspecto da cultura, em CHROMAgar™, de *Vibrio* spp. isolados da água de cultivo de *P.vannamei* (cultura primária) e repique, para o isolamento de colônias. FONTE (O Autor, 2023).

Foram isoladas três colônias que apresentaram, no CHROMAgar™ coloração cor malva (A, B e C) três colônias de cor creme (D, E e H) e três colônias de cor azul (F, G e I). Esses isolados foram cultivados em TCBS e novamente em CHROMAgar™, através de sementeira por esgotamento, para obtenção de colônias isoladas. Os resultados esperados de coloração e aspecto das colônias nesses meios estão ilustrados na Figura 3.

O ágar TCBS (ágar de tiosulfato, citrato, biliar e sacarose) é um meio seletivo para diferenciação e isolamento de *V. cholerae* e de outras espécies *Vibrio* existentes em amostras clínicas e outros materiais. O ágar CHOMAgar™ *Vibrio* é um meio de cultivo cromogênico para isolamento e diferenciação de *V. parahaemolyticus*, *V.vulnificus* e *V. cholerae* (FIGURA 4).

FIGURA 3 – ASPECTO DAS CULTURAS EM TCBS E CHROMAgar™



LEGENDA: (M) colônias com coloração malva. (C) coloração creme. (A) coloração azul, isoladas previamente em meio seletivo e diferencial CHROMAgar™. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS ESPERADAS DE CULTIVO DE *Vibrio* spp. em TCBS e CROMAgar™

TCBS	Estirpes	Resultados de Crescimento
	<i>V. cholerae</i> NCTC 8021 ou ATCC 9459	Crescimento razoável a excelente; colônias circundadas por zonas amarelas
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Crescimento razoável a excelente; colônias verdes a verdes-azuladas; meio praticamente inalterado
	<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	Crescimento razoável a excelente; colônias circundadas por zonas amarelas
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Inibição parcial a completa; colônias amarelas de pequena dimensão
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Inibição parcial a completa; colônias de pequena dimensão, translúcidas
Cor típica da colônia		Microrganismo
Malva		<i>V. parahaemolyticus</i>
Verde azulado a Azul turquesa		<i>V. cholerae/V. vulnificus</i>
Incolor		<i>V. alginolyticus</i>
CHROMAgar™		

Fonte: Becton Dickinson e Probac Brasil.

As características de colônias nesses dois meios, juntamente com os resultados da amplificação por PCR, estão sumarizadas na Tabela 2.

Seis amostras analisadas foram escolhidas para a análise molecular (em negrito na Tabela 2). Cinco apresentaram resultado positivo de amplificação, por PCR, do gênero *Vibrio* (amplicon de 689 pb) e uma foi negativa. Das positivas, uma delas foi positiva para a espécie *V. alginolyticus* (amplicon de 199 pb). Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* (FIGURA 5).

Colônias que apresentaram coloração malva no CHROMAgar™ (1M, 2M e 3M), indicativa de *V. parahaemolyticus*, deveriam apresentar coloração verde no TCBS, pois esta espécie não é fermentadora da sacarose, presente no meio TCBS, e todos os isolados apresentaram coloração amarela nesse meio de cultura. A identificação

molecular, por PCR foi realizada somente para o isolado 1M (2M e 3M não foram incluídos na análise) e o resultado indicou que esse isolado pertence ao gênero *Vibrio*. No entanto não houve amplificação do fragmento de 297 pb, referente à espécie *V. parahaemolyticus*. Com base na literatura, a espécie *Vibrio fluvialis* apresenta coloração amarela no TCBS e poderia ser investigada, além da confirmação de *V. parahaemolyticus*, por sequenciamento.

Dentre as colônias que apresentaram coloração creme no CRHOMAgar™, (4C, 6C e 9C), apenas 4C apresentou colônias variando de amarelo e verde, no TCBS. Colônias cremes são indicativos de *V. alginolyticus*, o que deveria apresentar coloração amarela no TCBS. A identificação por PCR, utilizando primers espécie específicos, foi realizada para as amostras 4C e 6C (9C não foi incluída na análise) e foi possível confirmar que o isolado 4C pertence à espécie *V. alginolyticus* e o isolado 6C, apresentou amplificação apenas com o primer de gênero.

Quanto às colônias que apresentaram coloração azul no CRHOMAgar™, (7A, 8A e 10A), 7A apresentou coloração verde no TCBS e 8A e 10A, coloração amarela. A amostra 7A não apresentou amplificação para gênero, na PCR. Essa amostra será analisada posteriormente através de amplificação da região do rDNA 16S (específico para bactérias) e bactéria e sequenciamento genético para confirmação da espécie. No entanto, mesmo não apresentando amplificação para o gênero *Vibrio*, a espécie *Vibrio mimicus* poderá ser investigada, pois, de acordo com Hara-Kudo et al. (2001), essa espécie apresenta coloração azul pálido no CHROMAgar™ e verde, no TCBS. As amostras 8A e 10A podem corresponder à espécie *V. cholerae*, e não à *V. vulnificus*, pois não apresentou amplificação com o primer para essa segunda espécie.

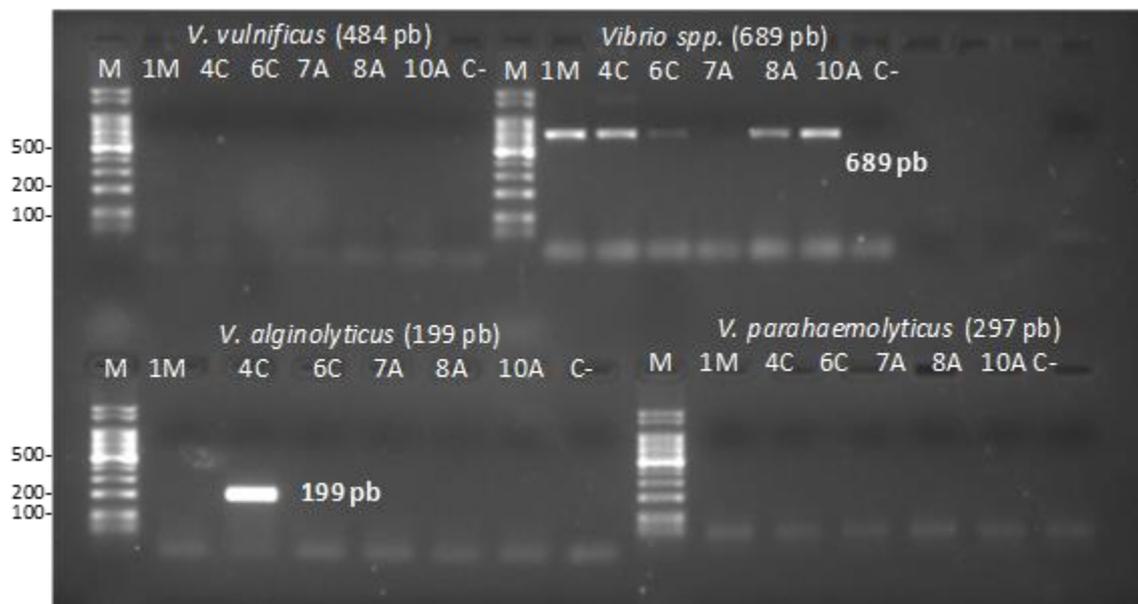
O TCBS tem sido usado rotineiramente para diferenciar espécies do gênero *Vibrio* de acordo com sua capacidade de fermentar sacarose. A reação de fermentação positiva é acompanhada por uma mudança de cor do indicador de pH Azul de bromotimol. As colônias de *V. parahaemolyticus* são bastante distintas no TCBS, exibindo cor azul a verde. Contudo, este meio não consegue diferenciar facilmente *V. alginolyticus* e *V. cholerae* (YEUNG e THORSEN, 2016).

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DE CULTURA EM MEIOS SELETIVOS E RESULTADOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Amostra	TCBS observado	CHROMAgar observado	Identificação	PCR vuln.	PCR Vibrio	PCR algin.	PCR parah.	Verificar
<b>1M</b>	Amarela	Malva	<i>Vibrio</i> sp.	Negativo	<u>Positivo</u>	Negativo	Negativo	<i>V. parahaemolyticus</i> ou <i>V. fluvialis</i> .
2M	Amarela	Malva						
3M	Amarela	Malva						
<b>4C</b>	Verde/amarela	Creme	<i>V. alginolyticus</i>	Negativo	<u>Positivo</u>	Positivo	Negativo	
<b>6C</b>	Verde	Creme	<i>Vibrio</i> sp.	Negativo	<u>Positivo</u>	Negativo	Negativo	
<b>7A</b>	Verde	Azul claro	<i>Vibrio</i> sp.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>V. cholerae</i> ou <i>V. mimicus</i>
<b>8A</b>	Amarela	Azul	<i>Vibrio</i> sp.	Negativo	<u>Positivo</u>	Negativo	Negativo	<i>V. cholerae</i>
9C	Verde	Creme						
<b>10A</b>	Amarela	Azul	<i>Vibrio</i> sp.	Negativo	<u>Positivo</u>	Negativo	Negativo	<i>V. cholerae</i>

LEGENDA: (M) malva, (C) creme, (A) azul. As amostras destacadas em negrito foram utilizadas para a identificação molecular, por PCR. A linha em cinza destaca o único isolado que teve a confirmação da espécie, por PCR. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 5 – ELETROFORESE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR DOS ISOLADOS BACTERIANOS

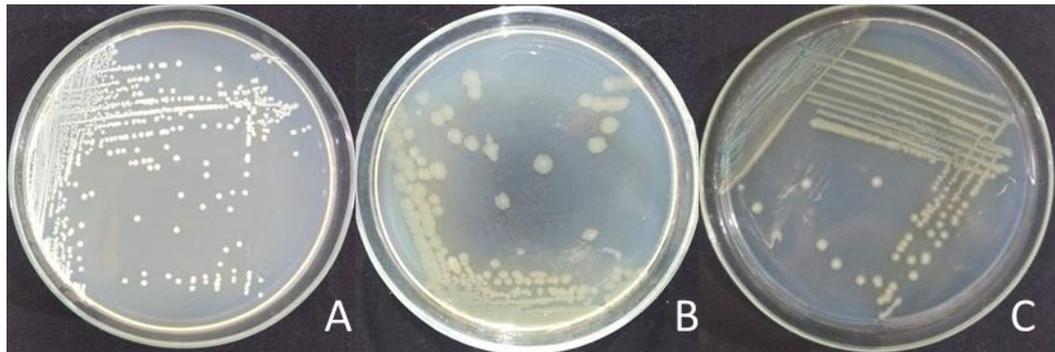


LEGENDA: M. Marcador de tamanho molecular (100pb). 1M, 4C, 6C, 7A, 8A, 10A: amostras analisadas. C- (controle negativo da reação). PCR positiva foi observada pela presença de um amplicon de 689 pb, utilizando primers para o gênero *Vibrio* em todas as amostras, exceto a 7A e

apenas para a amostra 4C, utilizando primers específicos para *V. alginolyticus*, amplicon de 199 pb.  
Fonte: O Autor (2023)

Na Figura 6 é possível observar o aspecto das colônias em ágar não seletivo (PCA) representativas dos isolados que apresentaram coloração de colônia malva, creme e azul (A, B e C), respectivamente, em CHROMAgar™.

FIGURA 6 – ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS EM PCA, DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM CORES DIFERENTES NO CHROMAgar™.



LEGENDA: Colônias, em PCA, que apresentaram coloração malva (A), creme (B) e azul no CHROMAgar™. FONTE: O Autor (2023).

#### 4.2 ENSAIOS BIOQUÍMICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Os testes bioquímicos Gelatinase, Lactose, Citrato, Motilidade, Indol, H<sub>2</sub>S e Urease foram realizados para contribuir com a identificação dos isolados e os resultados observados estão apresentados na Tabela 3 e Figura 7.

TABELA 3 – TESTES BIOQUÍMICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE ALGUNS ISOLADOS

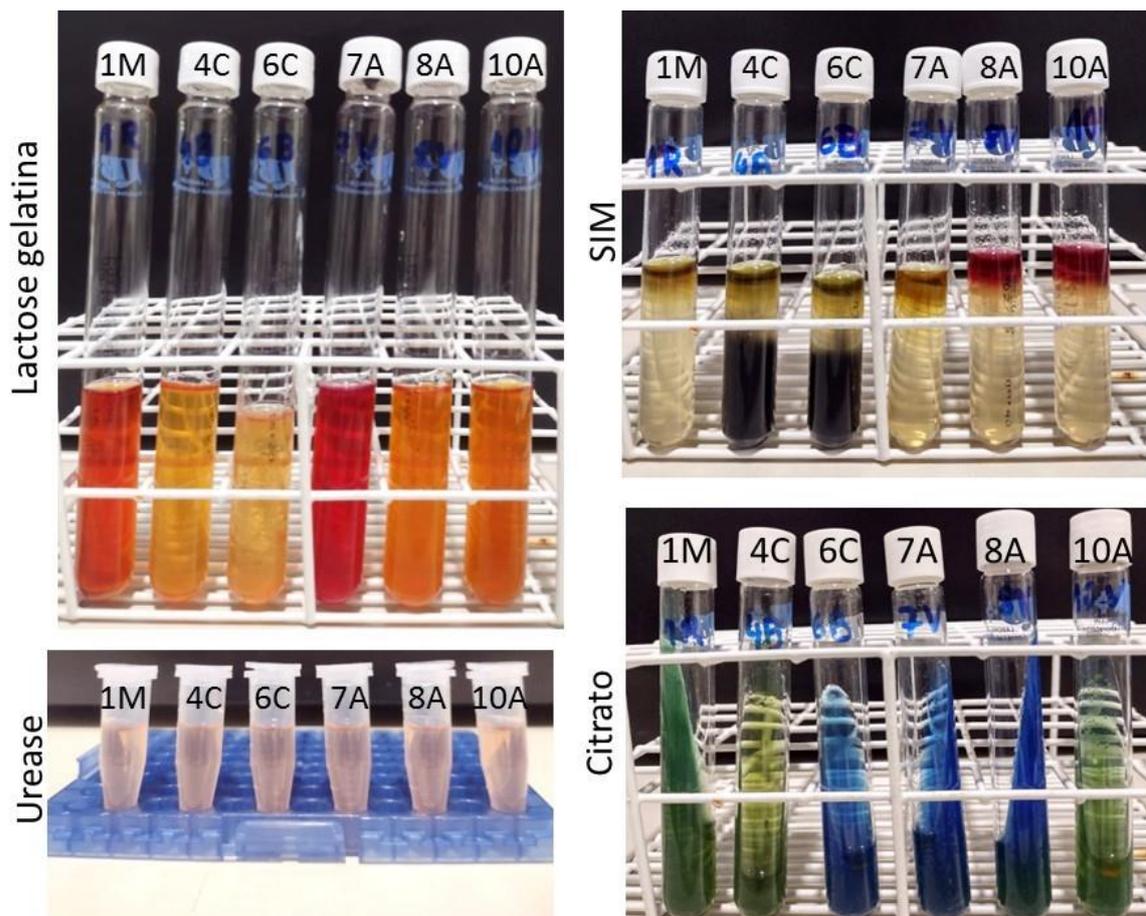
Amostra	Gelatinase	Lactose	Citrato	Motilidade	Indol	H <sub>2</sub> S	Urease
1M	+	-	-	+	-	-	-
4C <i>V. alginolyticus</i>	-	+	-	+	-	+	-
6C	-	+	+	+	-	+	-
7A	-	-	+	-	-	-	-
8A	-	+	+	-	+	-	-
10A	-	+	-	-	+	-	-

LEGENDA: (M) malva, (C) creme, (A) azul. As amostras analisadas através dos testes bioquímicos correspondem somente aos isolados analisados por PCR. Resultado positivo (+). Resultado negativo (-). FONTE: O autor (2023).

Foi possível observar que apenas o isolado 1M foi capaz de liquefazer a gelatina, no teste da gelatinase. Os demais isolados apresentaram resultado negativo.

No teste da lactose, realizado no mesmo tubo utilizado no teste da gelatinase, os isolados 4C, 6C (ambos de cor creme e 4C confirmado como *V. alginolyticus* na PCR), foram capazes de fermentar a lactose, observado pela alteração da coloração do meio de vermelho para amarelo, assim como os isolados 8A e 10A. Os isolados 6C, 7A e 8A usam foram capazes de usar citrato como única fonte de carbono, observado pela alteração da coloração verde para azul, no tubo teste. A motilidade, observada pela maior turvação do meio SIM, no local de inóculo, foi observada para os isolados 1M, 4C e 6C, produção de indol (anel vermelho após adição do reativo de Kovacs) foi positivo para 8A e 10A e produção de sulfeto de hidrogênio (enegrecimento do meio SIM), foi positivo para 4C e 6C. Nenhum dos isolados produzem urease, pois não houve alteração do meio ureia de rosa claro para rosa forte.

FIGURA 7 – ENSAIOS BIOQUÍMICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE *Vibrio* spp.



FONTE: O autor (2023)

Em um trabalho recente, Zhou et al. (2021) reportou que um total de 85% dos isolados de *V. alginolyticus* apresentava reação positiva para indol, 99% apresentavam motilidade, 90% eram capazes de hidrolisar a gelatina. Esses dados não corroboram com os resultados encontrados para o isolado 4C, confirmado como *V. alginolyticus* na PCR, o qual apresentou reação negativa para indol e hidrólise da gelatina. O único resultado compatível foi a motilidade positiva. Estes resultados podem ter diferido devido a reações atípicas, ou até mesmo variações nas cepas isoladas. De acordo com Yang et al. (2022), *V. cholerae* não apresenta motilidade, o que é compatível com as colônias azuis em CHORMAgar™ (7A, 8A e 10A) isoladas nesse trabalho. As amostras 8A e 10A podem ser indicativas de *V. cholerae*, já que não houve amplificação com primers para *V. vulnificus*, mas apresentaram reação de indol positiva, como observado por alguns autores. Recentemente, o indol foi proposto como um novo sinal envolvido na detecção de *quorum sensing* e demonstrou ser uma molécula sinalizadora extracelular de *V. cholerae* que ativa os genes envolvidos na produção de polissacarídeos e aumenta a formação de biofilme (LEE e LEE, 2010). As amostras 7A e 8A foram positivas para o teste de citrato. O metabolismo de citrato é altamente conservado entre linhagens de *V. cholerae* (REGMI e BOYD, 2019) e contribui para sua competitividade com outras bactérias. Kostiuk et al. (2023) observaram que quando algumas cepas de *V. cholerae* foram cultivadas em meio com citrato, a composição química do meio se transformou em um ambiente alcalino hostil para bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Shigella flexneri*. Hosen et al. (2021) observaram teste positivo para citrato para várias linhas de *V. cholerae*. Indol foi positivo para os isolados 8A e 10A, como também observado por Hosen et al. (2021).

Com relação aos resultados observados para a colônia malva (sugestivo de *V. parahaemolyticus*, foi observada motilidade, o que é compatível com o observado por Gu et al. (2021). Produção de sulfeto de hidrogênio e utilização de citrato foram negativas, como observado por Jones et al. (2012). Reação de gelatinase foi positiva, apenas para esse isolado, o que é compatível para os isolados de *V. parahaemolyticus* analisados por Costa et al. (2013).

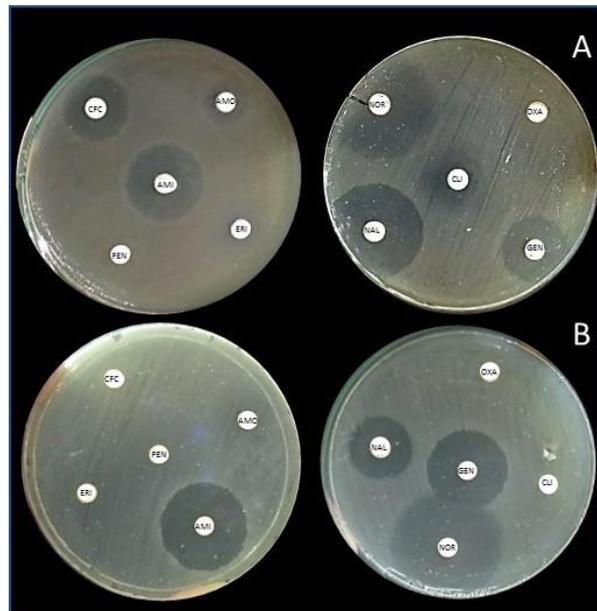
Como reportado por Khouadja et al. (2022), certas linhagens ambientais podem apresentar reações atípicas que gerarão perfis bioquímicos inaceitáveis. A

abordagem molecular permite aos pesquisadores superar as desvantagens dos métodos bioquímicos tradicionais porque estes podem ser distorcidos por reações atípicas ou pela subestimação do número de células viáveis. Dileep et al. (2003), reportaram que alguns isolados de *Vibrio* exibiram variações em um ou dois testes bioquímicos. A realização do sequenciamento genético, etapa que será realizada posteriormente, poderá contribuir para a identificação das espécies.

#### 4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Na Figura 8 e a Tabela 4 pode-se observar os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos de dois isolados, que apresentaram coloração malva e azul, em CHROMAgar™.

FIGURA 8 – ANTIBIOGRAMA, EM PLACA DE CULTIVO, DE DOIS ISOLADOS SUGESTIVOS DE *Vibrio sp.*



LEGENDA: (A) Perfil de suscetibilidade de um isolado de coloração Malva e (B) coloração Azul, no CHROMAgar™. FONTE: O Autor (2023).

Foi possível observar uma variação entre os isolados, em relação ao perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados. A amostra B (isolado azul) apresentou uma maior resistência aos antibióticos (ausência de halo de inibição do crescimento bacteriano), comparando com o perfil da amostra A (colônia malva). Nota-se também que o antibiótico norfloxacina mostra-se bastante eficaz contra ambos os isolados

(maiores halos de inibição) e oxacilina e penicilina, os menos eficazes (menores halos). O resultado observado na ação do norfloxacina é condizente com a publicação de (RAVIKUMAR e VIJAYAKUMAR, 2017), que mostraram que esse antibiótico é recomendado em casos de infecção média, moderada e severa por espécies de *Vibrio*.

O isolado azul (FIGURA 8A) é supostamente pertencente à espécie *V. cholerae*. Apresentou resistência a clindamicina, oxacilina, eritromicina, penicilina, amoxicilina e cefaclor e sensibilidade a amicacina, gentamicina, norfloxacina e ácido nalidíxico. Hosen et al. (2021) observaram que todos os isolados de *V. cholerae* analisados foram sensíveis à gentamicina e resistentes à penicilina, o que corrobora com os resultados apresentados nesse trabalho. Porém, diferentemente deste estudo, seus isolados também apresentaram maior sensibilidade à eritromicina e resistência ao ácido nalidíxico.

O antibiograma pode ser realizado para se determinar a conduta terapêutica em casos de infecção por *Vibrio* spp. No entanto, nesse trabalho, o objetivo principal foi utilizar o ensaio como um método adicional de identificação dos isolados. Entretanto, como o teste foi realizado no início dos ensaios, não foi possível identificar a identidade dos isolados, para fins de comparação com outros resultados.

TABELA 4 – SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE DOIS ISOLADOS SUGESTIVOS DE *Vibrio* sp.

Antibiótico	Concentração microgramas	Zona de inibição (diâmetro do halo)	
		Amostra A Malva (CHROMAgar™)	Amostra B Azul CHROMAgar™
Amicacina	30	25 mm	30 mm
Clindamicina	02	18 mm	--
Oxacilina	01	--	--
Eritromicina	15	13 mm	--
Penicilina	10	--	--
Amoxicilina	10	13 mm	--
Cefaclor	30	20 mm	--
Gentamicina	10	20 mm	27 mm
Norfloxacina	10	30 mm	38 mm

Ácido	30	30 mm	20 mm
Nalidíxico			

---

FONTE: O Autor (2023).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos dados apresentados nesse trabalho foi possível concluir que meios de cultura seletivos e diferenciais para a identificação de *Vibrio* spp., são muito úteis na rápida caracterização desses agentes. A sequência de testes permitiu caracterizar o isolado com coloração creme, a partir do meio CHROMAgar™, correlacionando com o meio TCBS, provas bioquímicas e PCR, confirmando a Com base nos dados apresentados nesse trabalho foi possível concluir que meios de cultura seletivos e diferenciais para a identificação de *Vibrio* spp., são muito úteis na rápida caracterização desses agentes. A sequência de testes permitiu caracterizar o isolado com coloração creme, a partir do meio CHROMAgar™, correlacionando com o meio TCBS, provas bioquímicas e PCR, confirmando a assertividade destes meios para a identificação da espécie *V. alginolyticus*, assim como, o indicativo de *V. cholerae* no meio CHROMAgar™, também foi sugestivo, para a mesma espécie, no meio TCBS e as provas bioquímica e antibiograma forneceram resultados que corroboram com as análises anteriores. Alguns resultados foram diferentes do esperado, como já citado anteriormente, podendo ser causado por reações atípicas ou pelas diferenças nas cepas isoladas. A amplificação por PCR, com primers espécie-específicos é um método adicional de identificação correta das espécies, sendo uma confirmação para as etapas anteriores. A realização do antibiograma para isolados do gênero *Vibrio* é importante para condução da terapêutica, em casos de infecção bacteriana, no entanto, como evidenciado neste estudo, também pode ser utilizado como guia para discriminar algumas espécies, quando associados à resultados obtidos através de outras metodologias. Apesar desses testes terem sido importantes nesse trabalho, o sequenciamento genético será realizado para caracterizar os isolados em nível de espécie futuramente, para trabalhos posteriores.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VAZQUEZ-JUAREZ, R. & ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 4, p. 215-219, 2001.
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; RUÍZ, H. M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research**, v. 35, n. 15, p. 1395-1404, 2004.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change, **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 76 - 84, 2017.
- BAKER-AUSTIN, C. et al. *Vibrio* spp. infections. **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 4, p. 1-19, 2018.
- BALLESTER, E. P.C. et al. Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 9, p. 4748-4755, 2017.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2023. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Produção da Aquicultura, por tipo de produto (Quilogramas). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela>. Acesso em: 29 out. 2023.
- BREHM, T.T.; BERNEKING, L.; ROHDE H.; et al. Wound infection with *Vibrio harveyi* following a traumatic leg amputation after a motorboat propeller injury in Mallorca, Spain: a case report and review of literature. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1 p. 104, 2020.
- CHOCHLAKIS, D.; VARVERAKI, S. P.; KOSTALAS, D. M., et al. Infection Due to *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* Following Injury into a Marine Environment. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 22, n. 2, p. 16462-16466, 2019.
- COSTA, R. A. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará**. Orientador: D.Sc. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira. 2006. 102 p. Dissertação (Mestre em Ciência Marinhas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- COSTA, R. A.; CONDE AMORIM, P.M.; ARAÚJO, R. L.; DOS FERNANDES, V. R. H. Multiple enzymatic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from oysters. **Argentine Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 267-270, 2013.
- CHROMAGARTM. CHROMAgarTM *Vibrio*: Instructions for use. V. 8, p. 2, 2021.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Towards Blue Transformation.

FAO/WHO. Risk Assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood. **FAO Food and Nutrition Paper**, n. 75, p. 57, 2003.

GU, D.; WANG, K.; LU, T., et al. *Vibrio parahaemolyticus* CadC regulates acid tolerance response to enhance bacterial motility and cytotoxicity. **The Journal of Fish Disease**, v. 44, n. 8, p. 1155-1168, 2021.

HARA-KUDO, Y.; NISHINA, T.; NAKAGAWA, H., et al. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5819-5823, 2001.

HOSEN, M. A.; OVI, F. K.; RASHID, H.; HASAN, M. H., et al. Characterization of *Vibrio* spp. in environmental water samples collected from flood prone areas of Bangladesh and their antibiotic resistance profile. **AIMS Microbiology**, v. 19; n. 7, p. 471-480, 2021.

JONES, J. L.; LÜDEKE, C. H.; BOWERS, J. C., et al. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2343-2352, 2012.

KHOUADJA, S. et al. Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated during Tunisian fish farm outbreaks. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 3, 2012.

KHOUADJA, S. et al. *Vibrio* pathogenicity island and phage CTX genes in *Vibrio alginolyticus* isolated from different aquatic environments. **Journal of Water and Health**, v. 20, n. 10, p. 1469-147, 2022.

KIM, H. J.; RYU, J. O.; LEE, S. Y.; et al. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. **BMC Microbiology**, v. 26, n. 15, p. 239, 2015.

KOSTIUK, B. et al. *Vibrio cholerae* Alkalizes Its Environment via Citrate Metabolism to Inhibit Enteric Growth In Vitro. **Microbiology Spectrum**, v. 11 n. 2, 2023.

LEE, J. H.; LEE, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 34, p. 426–444, 2010.

LOO, KE-YAN; LAW, J. W. F.; TAN, P.T. H., et al. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio* species. **Aquaculture**, v. 561, 2022.

MARTINS, F. M. DA SILVA; CEOTTO. V. H. Vibriosis and its impact on microbiological food safety. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.

MENDES, E. S.; MENDES, P. P.; GÓES, P.M. N. de B., et al. Os *Vibrios* na carcinicultura. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 91. ed., 2005. Disponível

em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/os-Vibrios-na-carcinicultura/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2022. E-book. ISBN 9788595159662. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595159662/>. Acesso em: 11 nov. 2023.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 72. ed., 2002. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/avaliando-o-estado-de-saude-de-camaroes-marinhos-na-engorda/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

RAVIKUMAR, V., VIJAYAKUMAR, R. *Vibrio alginolyticus* emerging food born pathogen. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 08, n. 06, p. 4887-4892, 2017.

REGMI, A.; BOYD, E. F. Carbohydrate metabolic systems present on genomic islands are lost and gained in *Vibrio parahaemolyticus*. **BMC Microbiology**, v. 19, p. 112, 2019.

REHMAN, S.; GORA, A. H.; AHMAD, I.; RASOOL, S. I. Stress in Aquaculture Hatcheries: Source, Impact and Mitigation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 6, n. 10, p. 3030-3045, 2017.

RYDER, J., KARUNASAGAR, I. & ABABOUCHE, P. Assessment and management of seafood safety and quality: current practices and emerging issues. **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper** No. 574. Rome, FAO. 432 pp. 2014.

SUDHEESH, P. S.; XU, H. S. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. **Aquaculture**, v. 196, p. 37 - 46, 2001.

TRINANES, J.; MARTINEZ-URTAZA, J. Future scenarios of risk of *Vibrio* infections in a warming planet: a global mapping study. *Lancet Planet Health*, v. 5, p. 426-435, 2021.

VANDENBERGHE, J., et al. *Vibriosis* Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2592 - 2597, 1999.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. *Vibrioses em camarão cultivado*. **Labomar: Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n. 1, p. 112 - 120, 2009.

XIE, Z. Y.; HU, C. Q.; CHEN, C., et al. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 202-207, 2005.

XIMENES, P.F.; VIDAL, M. de F. **Pesca e Aquicultura: Carcinicultura. Fortaleza:** BNB, ano 8, n. 274, mar. 2023. Disponível em <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/1736>. Acesso em: 02 nov. 2023.

YANG, Y.; ZHU, X.; ZHANG, H.; et al. *Vibrio cholerae* was found in cultured bullfrog. **Epidemiology and Infection**, v. 8; n. 30, p. 150, 2022.

YEUNG, M.; THORSEN, T. Development of a More Sensitive and Specific Chromogenic Agar Medium for the Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and Other *Vibrio* Species. **Journal of Visualized Experiments**, v. 8, n. 117, p. 54493, 2016.

YEUNG, P. S. M.; BOOR, K. J. Epidemiology, molecular biology, and detection of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. **Foodborne and Waterborne Bacterial pathogens: Epidemiology, Evolution and Molecular Biology**, p.153-184, 2012.

ZHANG, X-H. & AUSTIN, B. Haemolysis in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 5, p. 1011-1019, 2005.

ZHOU et al. Characteristic and Otopathogenic Analysis of a *Vibrio alginolyticus* Strain Responsible for Chronic Otitis Externa in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12:750642, 2021.