

CRISTIANE EVANGELISTA LIMA

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE
RAÇÃO DE PEIXE**

TERESINA, 2016

CRISTIANE EVANGELISTA LIMA

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE
RAÇÃO DE PEIXE**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Curso de Mestrado em Ciência Animal da
Universidade Federal do Piauí como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e
Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Christina Sanches Muratori

TERESINA, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

P654p Lima, Cristiane Evangelista
Potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de
ração de peixe / Cristiane Evangelista Lima - 2016.
41 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2016.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori

1. Aquicultura 2. BAL 3. *Enterococcus* spp. 4. *Lactobacillus* spp. 5. *Pediococcus* spp. I.Título

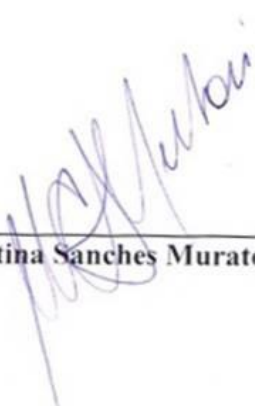
CDD 639.8

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS
DE RAÇÃO DE PEIXE**

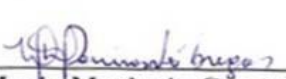
CRISTIANE EVANGELISTA LIMA

Dissertação aprovada em: 26/02/2016

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Christina Sanches Muratori (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria Marluccia Gomes Pereira (Interna) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet (Externo) / IFMA

DEDICO

À minha mãe, Maria Bernadete Evangelista Lima, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, por não medir esforços para me proporcionar educação de qualidade e pelo apoio em minhas escolhas.

À minha irmã, Tatiana Evangelista Lima, pelo amor, zelo e exemplo.

À minha madrinha, Janayna Pereira Mesquita, pelo amor, atenção e pela acolhida em sua família.

Ao meu namorado, Pedro Ilo Rebêlo de Azevedo, pelo amor, companheirismo, compreensão e por acreditar no meu potencial.

Aos os meus amigos pelo amor, por compartilharem as alegrias e por segurarem minha mão diante as dificuldades.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar com saúde e por ser a fé que me faz acreditar na plenitude do amanhã.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori pela orientação, confiança, paciência, oportunidades e por ser uma mãe.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da UFPI pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas da PPGCA/UFPI pelos momentos de aprendizado e descontração.

Aos funcionários da PPGCA/UFPI pela atenção.

Às propriedades piscicultoras e seus funcionários pela receptividade e por contribuírem com o fornecimento das amostras para que esta pesquisa fosse executada.

Aos meus amigos e parceiros de projeto de pesquisa, Aline Maria Dourado Rodrigues e José Humberto Santos Filho, pela amizade, apoio, aventuras durante as coletas das amostras, dedicação na execução das análises e conhecimentos compartilhados.

Às minhas amigas Juliana de Abreu Costa, Julliet Teixeira de Oliveira e Raizza Eveline Escórcio Pinheiro pela amizade, conselhos e incentivo.

A equipe do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA) da UFPI, em especial Aline Marques Monte, Rafael Gomes Abreu Bacelar e Rosana Martins Carneiro Pires, pela convivência, prestatividade e suporte.

Aos funcionários do NUEPPA/UFPI, em especial o técnico do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, George Emanuel Pereira da Silva, pelo auxílio nas atividades do laboratório.

À banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Maria Marlúcia Gomes Pereira e Prof^o. Dr^o. Rodrigo Maciel Calvet, por aceitarem o convite, contribuindo assim para o enriquecimento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Bactérias ácido-láticas.....	13
2.2 Probióticos.....	14
2.3 BAL como probióticos.....	16
2.4 Utilização de probióticos para animais de produção.....	18
2.5 Uso de probióticos na aquicultura.....	18
3. CAPÍTULO - Artigo Científico.....	21
ABSTRACT.....	22
RESUMO.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÕES.....	30
Agradecimentos.....	30
REFERÊNCIAS	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Espécies de <i>Lactobacillus</i> com <i>status</i> Presunção de Segurança Qualificada (QPS).....	17

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Identificação das bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI.....	27
Tabela 2. Inibição de crescimento de bactérias patogênicas frente as bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI.....	28
Tabela 3. Porcentagem de auto-agregação das bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI.....	28
Tabela 4. Porcentagem de co-agregação das bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI.....	28

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE RAÇÃO DE PEIXE

RESUMO

Na aquicultura, a prevenção e o controle de doenças podem propiciar o uso indiscriminado de antibióticos. Para substituir a administração de drogas antimicrobianas, têm-se investido na utilização de bactérias ácido-láticas (BAL) como probióticos. Deste modo, objetivou-se isolar e identificar BAL de rações para peixes, e avaliar o potencial probiótico das cepas por meio de ensaios *in vitro*. Foram analisadas 36 amostras de rações para peixes de diferentes propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI. Para isolamento das cepas foi utilizado o ágar Mann-Rogosa-Sharp (MRS), e para identificação das BAL foram realizadas provas metabólicas. O potencial probiótico foi avaliado por meio da atividade antibacteriana frente a patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*), além da capacidade de auto-agregação e co-agregação. Foram isoladas seis cepas de BAL: três do gênero *Lactobacillus* spp., duas de *Enterococcus* spp. e uma de *Pediococcus* spp. A cepa 6, pertencente ao gênero *Lactobacillus*, foi a única que apresentou inibição frente a todos os patógenos testados. As demais cepas apresentaram inibição apenas para *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as cepas pesquisadas possuem capacidade de auto-agregação, com a taxa auto-agregação variando de 16% a 35%. Todas cepas apresentaram taxas de co-agregação baixas, com uma variação de 9% a 22%. Logo, foram isoladas cepas de BAL de rações para peixes, as quais foram identificadas como cepas do gênero *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Pediococcus* spp. Os testes de auto-agregação e co-agregação demonstraram que as cepas isoladas não apresentaram potencial probiótico satisfatório. No teste *in vitro* de inibição aos patógenos, todas as cepas de BAL foram capazes de inibir *Pseudomonas aeruginosa*, e a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) foi a que apresentou melhor resultado já que inibiu todos os patógenos testados. Apesar dos resultados pouco satisfatórios nos testes probióticos executados, a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) pode ser promissora, sendo necessária a realização de mais ensaios *in vitro*, além de ensaios *in vivo*, para provar seu potencial probiótico completo.

Palavras-chave: Aquicultura; BAL; *Enterococcus* spp.; *Lactobacillus* spp.; *Pediococcus* spp.

PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FISH FEED

ABSTRACT

In aquaculture, prevention and disease control can induce the indiscriminate use of antibiotics. In order to replace the administration of antimicrobial drugs, the industry has been investing in using lactic acid bacteria (LAB) as probiotics. The objective of this study was to isolate and identify LAB of fish feed, and assess the probiotic potential of the strains found through *in vitro* assays. 36 samples of fish feed fish used in different fish farming properties of the countryside of Teresina, PI were analyzed. To isolate the strains it was used agar Mann-Rogosa-Sharp (MRS), and for identification of BAL metabolic tests were performed. The probiotic potential of the strains was evaluated by testing their antibacterial activity against organisms pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*), also by their auto-aggregation and co-aggregation capacities. Six strains of LAB were isolated: three of *Lactobacillus* spp., two of *Enterococcus* spp. and one of *Pediococcus* spp. The strain 6, which belongs to the genus *Lactobacillus*, was the only one that showed inhibition against all tested pathogens. The other strains only inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. All strains studied possess the capacity of auto-aggregation, and the rate of auto-aggregation ranged from 16% to 35%. All strains showed low co-aggregation rates, ranging from 9% to 22%. Thus, it was possible to isolate LAB from fish feed, which were identified as strains of the genera *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Pediococcus* spp. The LAB strains isolated did not present probiotic potential suitable in the auto-aggregation and co-aggregation assays. In the *in vitro* test of inhibition against pathogens, all strains showed satisfactory probiotic potential for *Pseudomonas aeruginosa*, being strain 6 (*Lactobacillus* spp.) the most promising one due to its capacity of inhibition against all tested pathogens. Despite the poor results achieved in probiotic evaluation, strain 6 (*Lactobacillus* spp.) may be promising, being necessary to carry out more *in vitro* and *in vivo* assays to prove its full probiotic potential.

Keywords: Aquaculture; *Enterococcus* spp.; LAB; *Lactobacillus* spp.; *Pediococcus* spp.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) formam um grupo de diferentes bactérias largamente encontradas na natureza. Podem estar presentes em meios que sejam ricos em nutrientes, a exemplo do trato gastrointestinal e urogenital de humanos e animais, em alimentos fermentados como leite e derivados, carne e grãos, além de esgotos e silagem. Produzem diversos compostos antimicrobianos, como enzimas bacteriolíticas, ácidos orgânicos (o principal é o ácido láctico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. As BAL são frequentemente utilizadas na indústria de alimentos para a elaboração de produtos alimentícios para humanos, e também são empregadas para a conservação de alimentos. Determinadas BAL podem ser utilizadas como probióticos ao serem adicionadas em alimentos para conferir benefícios a saúde dos consumidores.

Os probióticos são micro-organismos que, quando administrados na quantidade adequada a humanos e animais, promovem benefícios à saúde, visto que regulam o sistema digestório através da inibição de patógenos e do desenvolvimento da resposta imune. Vários micro-organismos têm sido utilizados como probióticos, dentre eles as BAL. A escolha por essas bactérias se dá diante a sua capacidade de atender a fatores que devem ser considerados, como ser segura, já que algumas BAL possuem o status “Presunção de Segurança Qualificada” (QPS), e também por serem capazes de competir por sítios de ligação e produzir substâncias antagonistas.

Nos animais de produção, os antibióticos são associados ao uso terapêutico, ao uso profilático e também como promotores de crescimento. No entanto, o uso indiscriminado pode ocasionar a seleção de genes de resistência às drogas, além da formação de resíduos no produto final. Portanto, os probióticos têm sido buscados como alternativa a substituição do uso de drogas antimicrobianas em animais de produção, pois devido as suas características, são capazes de garantir sanidade, melhoria no desempenho produtivo e segurança alimentar aos produtos.

A aquicultura é uma atividade com ampla expansão no cenário mundial. No entanto, as doenças são um grande obstáculo para o alcance das metas produtivas. A utilização de BAL na dieta ou na água de cultivo modifica a microbiota intestinal, podendo ser uma ferramenta preventiva ao aparecimento de enfermidades, visto que as BAL podem impedir a fixação de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal de organismos aquáticos pela competição por adesão às células intestinais ou produção de substâncias antimicrobianas.

Diante o exposto, objetivou-se isolar e identificar BAL de rações para peixes, e avaliar o potencial probiótico das cepas por meio de ensaios *in vitro*.

Os resultados obtidos foram apresentados em forma de artigo científico seguindo as normas de publicação da revista Pesquisa Veterinária Brasileira, o qual foi submetido à publicação. O artigo foi apresentado no capítulo intitulado: Potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias ácido-láticas

Bactérias lácticas ou bactérias ácido-láticas (BAL) denominam um grupo heterogêneo de micro-organismos com diferentes características morfológicas, metabólicas, fisiológicas e taxonômicas. São descritas como cocos ou bastonetes Gram positivos, catalase negativa, não esporuladas, geralmente sem motilidade (algumas possuem flagelos periféricos), não redutoras de nitrato a nitrito, desprovidas de citocromo e ácido tolerantes. Crescem em anaerobiose, entretanto a maioria não é sensível a oxigênio, podendo o crescimento ocorrer tanto na sua presença quanto em sua ausência, assim sendo classificadas como anaeróbias aerotolerantes (AXELSSON, 2004; LEROY; DE VUNYST, 2004; TORO, 2005; MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010). Podem ser classificadas como mesófilas ou termófilas, conforme a oscilação da temperatura ótima para crescimento entre 30 °C a 37 °C e entre 42°C a 50°C, respectivamente (SYBESMA et al., 2006).

As BAL possuem elevadas exigências nutricionais em relação ao substrato, visto que obtêm sua energia pela fermentação de carboidratos. Dependendo da via metabólica utilizada na fermentação da glicose e da concentração dos produtos formados, as bactérias podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas. As homofermentativas utilizam a via *Embden-Meyerhof Parnas*, e são capazes de produzir ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose (90% a 95%). Já as heterofermentativas utilizam a via das pentoses, e formam menos de 1,8 mol de ácido láctico/mol de glicose, além de quantidades significativas de dióxido de carbono, acetato, etanol, entre outros (GONÇALVES, 2009; LERAYER et al., 2009; STERR; WEISS; SCHMIDT, 2009).

Esses micro-organismos são amplamente dispersos na natureza e capazes de colonizar meios extremamente diferentes do ponto de vista físico-químico e biológico. São associadas a habitats ricos em nutrientes, sendo frequentemente isoladas de alimentos fermentados, a exemplo de leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas. Algumas dessas bactérias podem estar presentes naturalmente nos tratos respiratório e intestinal e em cavidades como boca e vagina de humanos e animais (LERAYER et al., 2009), além de serem encontradas no solo, água, água de esgoto e silagem (HOLZAPFEL et al., 2001; AXELSSON, 2004).

São conhecidos os seguintes gêneros de BAL: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*,

Streptococcus, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (COELHO, 2013). Os gêneros com maior importância são: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella* (DANIEL et al., 2011).

Essas bactérias destacam-se na indústria de alimentos e em Saúde Pública por apresentarem características transformadoras, deteriorantes, probióticas e bioconservadoras (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003). São empregadas como culturas iniciadoras (culturas *starter*), proporcionando transformações nas matérias-primas, pela produção de ácidos e outras substâncias que atribuem sabores e aromas específicos em produtos fermentados (LEROY; DE VUNYST, 2004, COTTER; HILL; ROSS et al., 2005, TEUSINK; SMID, 2006; ROUSE et al., 2007). Porém, a produção de ácidos e substâncias proteolíticas podem causar a deterioração precoce dos alimentos (GALIA et al., 2009). Determinadas BAL apresentam características probióticas, visto sua capacidade de colonizar o trato gastrointestinal e promover o balanço benéfico da microbiota natural nesse ambiente (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007). Elas também podem ser utilizadas na conservação de vários alimentos devido sua atividade antagonista contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos (POPPI, 2008; BELLO et al., 2010).

2.2 Probióticos

No final do século XIX, o microbiologista Eli Metchnikoff, relacionou saúde com o consumo regular de leites fermentados contendo *Lactobacillus*. A teoria do pesquisador baseou-se em que esses micro-organismos eram capazes de controlar as infecções causadas por patógenos entéricos, além de regular a toxicidade crônica natural que tem papel fundamental no envelhecimento e mortalidade. O nascimento dos alimentos probióticos, ou seja, micro-organismos consumidos com o objetivo de manter a boa saúde, pode ser atribuído a publicação *The prolongation of life*, de Metchnikoff. Anos depois, o pediatra Henry Tissier, avaliou que era insignificante o número de *Bifidobacterium* nas fezes de crianças que apresentavam quadro de diarreia, enquanto que o contrário acontecia nas crianças saudáveis, e então sugeriu que essa bactéria fosse administrada em pacientes com diarreia para restaurar a biota intestinal. Tissier acreditava que a atividade metabólica das BAL inibiria as bactérias intestinais (THAMER; PENNA, 2005; LERAYER et al., 2009).

O termo probiótico foi introduzido por Lilley e Stillwell, em 1965, sendo descrito como “substância produzida por um micro-organismo que estimula o crescimento de outro micro-

organismo”. Richard Parker, em 1974, definiu probiótico como “organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal”. Fuller, em 1989, modificou este conceito, introduzindo uma nova definição, que seria “suplemento alimentar constituído de micro-organismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal”. Essa definição foi ampliada para outras microbiotas do corpo, além da intestinal, ao considerar “probiótico é uma preparação com micro-organismos vivos que aplicado a homens ou animais, afeta benéficamente seu hospedeiro melhorando as propriedades da sua microbiota endógena” (SALMINEM et al., 1999). Atualmente, a definição de probiótico mais aceita é “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos agem como reguladores do sistema digestório, pois proporcionam benefícios aos homens e aos animais por meio da inibição de patógenos; da atuação como antígenos, potencializando a resposta imune do hospedeiro e da regulação da fisiologia digestiva, fornecendo vitaminas e fontes energéticas (FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO et al., 2006). Podem atuar no organismo por diferentes mecanismos de ação, como competição pelo sítio de adesão; produção de compostos com atividade antimicrobiana; neutralização dos compostos indesejáveis, a exemplo de enterotoxinas, amônia, aminas biogênicas tóxicas; alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; aumento da imunidade pelo aumento da atividade de linfócitos e macrófagos (ROSTAGNO et al., 2003; SAAD, 2006).

A escolha do micro-organismo a ser utilizado em determinado produto como probiótico depende de fatores como: segurança, o que implica no uso de linhagens não patogênicas e/ou toxigênicas, além de não possuírem plasmídeos de resistência a antibióticos e a vírus; ter resistência a pH ácido, enzimas pancreáticas e bile para manter-se viável durante o trânsito até o intestino; ter capacidade de multiplicação e adesão no intestino, colonizando-o e mantendo sua viabilidade e atividade; produzir ácidos orgânicos e outros compostos biologicamente ativos *in situ* para combater ou excluir patógenos; ser resistente aos processos industriais de produção em larga escala; manter a viabilidade sob condições normais de estocagem e estar ativo no alimento carreador antes do consumo para permanecer estável e viável até o final da vida comercial do produto (FULLER, 1989; SAARELA et al., 2000, FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO et al., 2006).

Espécies de *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e leveduras, a exemplo da *Saccharomyces*, têm sido

utilizadas como probióticos. Em relação as bactérias, as principais cepas utilizadas como probióticos são de *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus* spp. (HOLZAPFEL et al., 2001; SIMON; JADAMUS; VAHJEN, 2001).

As aplicações terapêuticas atribuídas ao uso de culturas probióticas são: promoção do crescimento; controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; redução dos efeitos colaterais causados por antibióticos; estímulo do sistema imunológico; aumento da resistência a infecções gastrointestinais; auxílio na digestão da lactose; prevenção da diarreia; auxílio na constipação; aumento na absorção de minerais; síntese de vitaminas; produção de fatores antimicrobianos e anticancerígenos; redução da incidência de tumores intestinais; estímulo da redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos; prevenção de infecções urogenitais (LERAYER et al., 2009).

2.3 BAL como probióticos

As BAL são cada vez mais empregadas como probióticos para humanos e animais, visto que acarretam variados benefícios para a saúde, a exemplo têm-se a prevenção a desordens intestinais, redução à intolerância a lactose, aumento da resposta imune, absorção de colesterol e prevenção de câncer (LIN et al., 2006). São importantes no controle de micro-organismos indesejáveis, pois interferem no desenvolvimento de bactérias patogênicas pela competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonistas (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003). As principais substâncias antagonistas com potencial antimicrobiano produzidas por essas bactérias são ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico); diacetil; dióxido de carbono; peróxido de hidrogênio; substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, como reuterina, reuteriциlina e ácido piroglutâmico; bacteriocinas (ALVES et al., 2006; DEEGAN et al., 2006; ROUSE et al., 2007).

Pode-se definir alimentos probióticos como alimentos que contêm ou são produzidos por BAL oriundas do trato gastrointestinal humano, se for o caso do produto ser destinado ao consumo humano ou do trato gastrointestinal de animais, caso o produto se destine à alimentação animal. Esses alimentos podem ser comercializados no mercado como rações para animais, produtos farmacêuticos, produtos de confeitaria e produtos fermentados (FERREIRA, 2003).

O isolamento e a identificação de micro-organismos probióticos, a partir de fontes não investigadas, podem ser uma ferramenta amplamente utilizada para a obtenção de linhagens úteis e geneticamente estáveis (ADNAN; TAN, 2007).

O *status* “Presunção de Segurança Qualificada” (QPS) é certificado pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) aos micro-organismos que foram submetidos a um sistema de avaliação para segurança pré-comercialização, onde foi estabelecido a identidade, a possível patogenicidade e o uso final do micro-organismo. Atualmente, o *status* QPS é conferido a 39 BAL: três espécies de *Pediococcus* (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus* e *Pediococcus pentosaceus*) e 35 espécies de *Lactobacillus* (EFSA, 2015).

Quadro 1. Espécies de *Lactobacillus* com *status* Presunção de Segurança Qualificada (QPS)

<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus panis</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	

É importante que seja estabelecida uma avaliação formal dos riscos relativos ao uso das BAL como probióticos, a fim de que elas possam ser utilizadas com segurança sem prejudicar a saúde dos consumidores e sem desrespeitar os requisitos legislativos estabelecidos pela EFSA (BADARÓ et al., 2009).

2.4 Utilização de probióticos para animais de produção

Nos animais de produção, os antibióticos são utilizados para o tratamento de doenças, para prevenir infecções e quando utilizados em doses subterapêuticas, melhoram o crescimento e a eficiência da produção (SINGER et al., 2003; FLEMMING, 2005).

A utilização de antibióticos na produção animal ocorre desde o princípio da década de 50. Tal prática resultou no desenvolvimento de populações bacterianas resistentes (FULLER, 1989), o que ocasionou a quebra no equilíbrio da simbiose entre a microbiota desejável e o animal. Em 1969, divulgou-se o Relatório de Swan que alertava sobre o potencial de transferência de bactérias resistentes a antibióticos pela cadeia alimentar (TEALE, 2002).

É crescente a procura por métodos alternativos no tratamento e na prevenção de infecções. Além disso, a comunidade científica preocupa-se com o surgimento de linhagens de micro-organismo resistentes devido ao uso excessivo de agentes antimicrobianos. Dessa forma, busca-se cada vez mais a utilização de probióticos como promotores de crescimento e de sanidade nos animais de produção, em substituição às doses subterapêuticas de antibióticos comumente utilizadas em rações de animais confinados (GUERRA et al., 2007). A utilização de probiótico como promotor de crescimento pode resultar em maior ganho de peso, melhor índice de conversão alimentar, maior rendimento de carcaça e melhor palatabilidade da carne (JIN et al., 1998).

Em ruminantes, estudos envolvendo a suplementação com probióticos resultaram na diminuição de gastroenterite e na melhoria dos índices de desempenho zootécnico (AGARWAL et al., 2002; ADAMS et al., 2008). Em suínos, observou-se a redução da morbidade e mortalidade de leitões desmamados, além da melhoria nos parâmetros zootécnicos e na qualidade da carcaça na fase de engorda (ALEXOPOULOS, 2004). Em aves, houve ganho de peso e aumento da conversão alimentar (KALAVATHY et al., 2003; MOUNTZOURI et al., 2007).

2.5 Uso de probióticos na aquicultura

A aquicultura, ou seja, a criação de organismos aquáticos, apresenta índices de crescimento satisfatórios dentre os ramos da produção animal. Mundialmente, no período de 2000 a 2012, a aquicultura cresceu 6,7%, enquanto no mesmo período a avicultura cresceu 3,3%, a bovinocultura 1,2%, a suinocultura 1% e a pesca decresceu 0,2% (BRASIL, 2015). No Brasil,

o crescimento em 2014 comparado a 2013, foi de 26,5% na aquicultura, 6,7% na avicultura, 3,2% na suinocultura e 0,3% na bovinocultura (BRASIL, 2014).

O fenômeno da globalização proporcionou o crescimento no comércio de peixes e frutos do mar, concomitante ao desenvolvimento da produção aquícola. A economia exige que os organismos aquáticos sejam cultivados em densidades elevadas, culminando em condições de estresse nos animais, o que implica em doenças e perdas econômicas (BONDAD-REANTASO et al., 2005). A prevenção e o controle de enfermidades têm levado ao aumento substancial no uso de medicamentos veterinários. No entanto, o uso de antibióticos tem sido questionado devido à resistência as bactérias patogênicas (NOMOTO, 2005), além de tal prática ser preocupante à saúde pública uma vez que o antibiótico residual pode permanecer no produto final.

Diante o exposto, para substituir o uso de drogas antimicrobianas, a indústria da aquicultura tem investido na utilização de probióticos comercialmente disponíveis que são introduzidos como aditivos na alimentação animal (WANG; XU; XIA, 2005).

Nos animais aquáticos ocorre uma interação contínua entre a microbiota intestinal e o ambiente aquático, onde as bactérias presentes no meio são constantemente ingeridas com a água e/ou alimento, resultando em uma influência tanto do meio sobre o animal, quanto do animal sobre o meio (GATESOUBE et al., 1999). Logo, o conceito de probiótico proposto por Fuller (1989) necessita de algumas considerações, sendo essa definição proposta de maneira mais abrangente por Verschuere et al. (2002): “vida microbiana adjunta que tem efeito benéfico na associação, modificando a comunidade microbiana associada ou ambiente, garantindo uma melhor utilização do alimento para os animais ou a reforçar o seu valor nutritivo, através do reforço da resposta a doença, ou através da melhoria da qualidade do seu meio ambiente”.

O uso de probióticos na aquicultura se dá por meio da adição na ração e/ou na água dos tanques de criação. Ao suplementar a dieta com probióticos, ocorre a modificação na microbiota intestinal pela competição com micro-organismos patogênicos por sítios de adesão e nutrientes, além da produção de substâncias antibacterianas e enzimas. Já a adição na água dos tanques promove modificações na microbiota ambiental, reduzindo a carga de patógenos (CYRINO et al., 2010).

As bactérias formadoras de esporos, principalmente as do gênero *Bacillus*, constituem a maior parte dos produtos probióticos (HONG et al., 2005). Wang (2007) observou o efeito de *Bacillus* spp. sobre o crescimento e a atividade de enzimas digestivas do camarão *Penaeus vannamei*, enquanto que Chu et al. (2010) isolaram *Bacillus* spp. do intestino do peixe *Carassius auratus gibelio*, com características de degradar moléculas produzidas por patógenos. Em

trabalhos realizados com *Bacillus subtilis*, Mohamed e Refat (2011) observaram atividade antagonista produzida frente a *Flavobacterium columnare* em tilápia (*Oreochromis niloticus*), e Powedchagun, Suzuki e Rengpipat (2011) constataram seu potencial probiótico para camarão, por aumentar a sobrevivência, crescimento e imunidade do *Penaeus monodon*, com a vantagem de ser inofensivo para animais e seres humanos.

Outro grupo de potenciais probióticos que tem sido bastante explorado é o das BAL. O efeito probiótico do *Lactococcus lactis* foi estudado, tanto como indutor da resposta imune de peixes (BALCÁZAR et al., 2007), como inibidor de patógenos, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* e *Vibrio anguillarum* (BALCÁZAR et al., 2008). Estudos realizados com *Lactobacillus plantarum*, outra BAL com propriedades probióticas, mostrou ação antagonista contra *Aeromonas hydrophila* (BALCÁZAR et al., 2008; PARTHASARATHY; RAVI, 2011), *Aeromonas salmonicida* em peixes (BALCÁZAR et al., 2008) e *Vibrio harveyi* em camarão (VIEIRA et al., 2010). Em pesquisa realizada por Son et al. (2009) houve maior ganho de peso e resistência à *Streptococcus* e iridovírus em peixes alimentados com *Lactobacillus plantarum*. A suplementação alimentar de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com *Lactobacillus rhamnosus* mostrou-se efetiva no controle da mortalidade frente a *Aeromonas salmonicida* (NIKOSKELAINEN et al., 2003). A utilização de BAL promoveu o controle da microbiota patogênica em linguado (*Solea solea*) (VÁSQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2005).

Dentre outros potenciais probióticos isolados de peixes estão: *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens* (KIM; AUSTIN, 2008), *Enterococcus faecium*, (WANG et al., 2008), *Pseudomonas chlororaphis* (GOBELI et al., 2009), *Enterobacter amnigenus* (BURBANK et al., 2011) e *Vagococcus fluvialis* (SORROZA et al., 2012).

3. CAPÍTULO
- Artigo Científico –

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE RAÇÕES PARA PEIXES¹

Cristiane E. Lima^{2*}, José H. Santos Filho², Aline M.D. Rodrigues², Raizza E.E. Pinheiro³,
Maria C.S. Muratori⁴

ABSTRACT.- Lima C.E., Santos Filho J.H., Rodrigues A.M.D., Pinheiro R.E.E. & Muratori M.C.S. 2016. **[Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fish feed.]** Potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Pós-Graduação em Ciência Animal, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus da Socopo, Teresina, PI 64049-550, Brasil. E-mail: criz_evangelista@hotmail.com

In aquaculture, prevention and disease control can induce the indiscriminate use of antibiotics. In order to replace the administration of antimicrobial drugs, the industry has been investing in using lactic acid bacteria (LAB) as probiotics. The objective of this study was to isolate and identify LAB of fish feed, and assess the probiotic potential of the strains found through *in vitro* assays. 36 samples of fish feed fish used in different fish farming properties of the countryside of Teresina, PI were analyzed. To isolate the strains it was used agar Mann-Rogosa-Sharp (MRS), and for identification of BAL metabolic tests were performed. The probiotic potential of the strains was evaluated by testing their antibacterial activity against organisms pathogens (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*), also by their auto-aggregation and co-aggregation capacities. Six strains of LAB were isolated: three of *Lactobacillus* spp., two of *Enterococcus* spp. and one of *Pediococcus* spp. The strain 6, which belongs to the genus *Lactobacillus*, was the only one that showed inhibition against all tested pathogens. The other strains only inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. All strains studied possess the capacity of auto-aggregation, and the rate of auto-aggregation ranged from 16% to 35%. All strains showed low co-aggregation rates, ranging from 9% to 22%. Thus, it was possible to isolate LAB from fish feed, which were identified as strains of the genera *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Pediococcus* spp. The LAB strains isolated did not present probiotic potential suitable in the auto-aggregation and co-aggregation assays. In the *in vitro* test of inhibition against pathogens, all strains showed satisfactory probiotic potential for *Pseudomonas aeruginosa*, being strain 6 (*Lactobacillus* spp.) the most promising one due to its capacity of inhibition against all tested pathogens. Despite the poor results achieved in probiotic evaluation, strain 6 (*Lactobacillus* spp.) may be promising, being necessary to carry out more *in vitro* and *in vivo* assays to prove its full probiotic potential.

INDEX TERMS: Aquaculture, *Enterococcus* spp., LAB, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Pós-Graduação em Ciência Animal, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus da Socopo, Teresina, PI 64049-550, Brasil. *Autor para correspondência: criz_evangelista@hotmail.com. E-mails: jose_1berto@hotmail.com, alinemary2@yahoo.com.br

³ Docente, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Prof. Cinobelina Elvas, BR 135, km 3, Bom Jesus, PI 64900000, Brasil. E-mail: raizza_eveline@hotmail.com

⁴ Docente, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus da Socopo, Teresina, PI 64049-550, Brasil. E-mail: chrismuratori@uol.com.br

RESUMO.- Na aquicultura, a prevenção e o controle de doenças podem propiciar o uso indiscriminado de antibióticos. Para substituir a administração de drogas antimicrobianas, têm-se investido na utilização de bactérias ácido-láticas (BAL) como probióticos. Deste modo, objetivou-se isolar e identificar BAL de rações para peixes, e avaliar o potencial probiótico das cepas por meio de ensaios *in vitro*. Foram analisadas 36 amostras de rações para peixes de diferentes propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI. Para isolamento das cepas foi utilizado o ágar Mann-Rogosa-Sharp (MRS), e para identificação das BAL foram realizadas provas metabólicas. O potencial probiótico foi avaliado por meio da atividade antibacteriana frente a patógenos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*), além da capacidade de auto-agregação e co-agregação. Foram isoladas seis cepas de BAL: três do gênero *Lactobacillus* spp., duas de *Enterococcus* spp. e uma de *Pediococcus* spp. A cepa 6, pertencente ao gênero *Lactobacillus*, foi a única que apresentou inibição frente a todos os patógenos testados. As demais cepas apresentaram inibição apenas para *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as cepas pesquisadas possuem capacidade de auto-agregação, com a taxa auto-agregação variando de 16% a 35%. Todas cepas apresentaram taxas de co-agregação baixas, com uma variação de 9% a 22%. Logo, foram isoladas cepas de BAL de rações para peixes, as quais foram identificadas como cepas do gênero *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Pediococcus* spp. Os testes de auto-agregação e co-agregação demonstraram que as cepas isoladas não apresentaram potencial probiótico satisfatório. No teste *in vitro* de inibição aos patógenos, todas as cepas de BAL foram capazes de inibir *Pseudomonas aeruginosa*, e a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) foi a que apresentou melhor resultado já que inibiu todos os patógenos testados. Apesar dos resultados pouco satisfatórios nos testes probióticos executados, a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) pode ser promissora, sendo necessária a realização de mais ensaios *in vitro*, além de ensaios *in vivo*, para provar seu potencial probiótico completo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Aquicultura, BAL, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp.

INTRODUÇÃO

A aquicultura é o ramo da produção animal com o melhor índice de crescimento no Brasil. O crescimento da produção de 2014 em relação a 2013 foi de 26,5% na aquicultura, 6,7% na avicultura, 3,2% na suinocultura e 0,3% na bovinocultura (Brasil 2014). A economia exige que os organismos aquáticos sejam cultivados em densidades elevadas, implicando em condições de estresse aos animais, consequentemente ocasionando doenças e perdas econômicas (Bondad-Reantaso et al. 2005). A prevenção e o controle de enfermidades levam ao uso indiscriminado de antibióticos, contribuindo para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos, o que resulta na dificuldade em controlar e eliminar patógenos (Figueiredo & Leal 2008), além de ser um fator preocupante à saúde pública uma vez que o antibiótico residual pode permanecer no produto final. Como alternativa para substituir o uso de drogas antimicrobianas, a indústria da aquicultura tem investido na utilização de probióticos comercialmente disponíveis que são introduzidos como aditivos na alimentação animal ou nas águas de cultivo (Wang, Xu e Xia 2005).

Define-se como probióticos “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO 2002). Eles atuam no organismo humano ou animal por diferentes mecanismos de ação, como competição pelo sítio de adesão do epitélio intestinal; produção de compostos com atividade antimicrobiana; neutralização dos compostos indesejáveis; alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da

atividade enzimática; aumento da imunidade pelo aumento da atividade de linfócitos e macrófagos (Saad 2006). Para exercer potencial probiótico no hospedeiro, as cepas probióticas devem sobreviver ao trato gastrointestinal e manterem-se viáveis, além de serem capazes de se aderir à mucosa intestinal, resultando na colonização do probiótico (Yuksekgad & Aslim 2010). Testes de antagonismo *in vitro* são utilizados para selecionar bactérias com potencial probiótico, pois essas são capazes de produzir compostos inibitórios quando confrontadas com patógenos (Sorrosa et al. 2012).

As bactérias ácido-láticas (BAL) apresentam características probióticas devido a sua capacidade de colonizar o trato gastrointestinal e promover o balanço benéfico da microbiota natural nesse ambiente (Pfeiler & Klaenhammer 2007). São importantes no controle de patógenos, pois competem pelos sítios de ligação e produzem substâncias antimicrobianas, a exemplo de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, reuterina, reuterociclina, bacteriocinas, entre outros (Castellano et al. 2008).

Diante o exposto, objetivou-se isolar e identificar BAL de rações para peixes, e avaliar o potencial probiótico das cepas por meio de ensaios *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 36 amostras de rações para peixes de diferentes propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI. As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Controle Microbiológico do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Isolamento e identificação das BAL (Carr, Chill & Maida 2002, Muzzolón 2010 com adaptações)

O procedimento para cada amostra foi realizado retirando-se uma porção de 25g de amostra, diluída em 225 mL de água peptonada a 0,1%, formando diluição inicial (10^{-1}). A partir desta, foram preparadas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . A inoculação foi feita em duplicata, com alíquotas de 0,1mL, na superfície do meio de cultivo ágar Mann-Rogosa-Sharp (MRS), com auxílio da alça de Drigalsky. As placas de MRS foram incubadas a 37°C, por 24h, em microaerofilia. Com o propósito de se obter cultivos puros, as colônias isoladas foram repicadas em estrias novamente em ágar MRS e as placas foram incubadas sob as mesmas condições relatadas anteriormente. Foi realizada coloração de Gram, selecionando-se as colônias que se apresentaram como bastonetes e cocos Gram positivos não esporulados. Realizou-se a classificação das BAL por meio das seguintes provas metabólicas: catalase, oxidase e indol.

A prova de catalase foi realizada transferindo-se uma alçada de colônia pura crescida em ágar nutriente para uma lâmina de vidro, e sobre esta foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. O teste foi considerado positivo quando ocorreu a formação imediata de bolhas.

Para o teste de oxidase, as colônias isoladas foram espalhadas, com auxílio de um palito de madeira, sobre uma fita de oxidase. Nesta prova, a mudança da colônia para a cor roxa indica resultado positivo.

A prova de indol foi realizada utilizando-se o meio caldo triptofano, no qual a cultura de BAL foi semeada a 37°C, por 24h. Decorrido o período de incubação, adicionou-se 5 gotas do reativo de Kovacs. A prova é indol positiva quando há a formação de um halo róseo avermelhado na superfície do meio.

Para identificação dos gêneros foram realizadas as seguintes provas metabólicas: crescimento em caldo MRS com 6,5% de NaCl e com pH 9,6, desenvolvimento em caldo MRS a temperaturas de 10°C e 45°C, produção de gás a partir de glicose, além de provas de hidrólise de arginina e esculina.

Atividade antibacteriana frente a patógenos (Jatobá et al. 2008 com adaptações)

As cepas de bactérias patogênicas utilizadas neste ensaio *in vitro* foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* cedidas pelo Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), do CCA, da UFPI. As cepas foram previamente inoculadas em caldo triptona de soja a 37°C, por 48 h. Padronizou-se a suspensão de bactérias patogênicas com auxílio de espectrofotômetro a 600nm para uma densidade óptica (DO) de 0,5. Posteriormente, placas de Petri contendo ágar infusão de cérebro-coração (BHI) foram semeadas, com auxílio de *swab* estéril, com cada um dos patógenos e incubadas a 37°C, por 48h.

As cepas de BAL foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37°C, por 24h, em microaerofilia. Após esse período, foram padronizadas adicionando-se tampão fosfato-salino (PBS), até atingir a concentração de 600nm para uma DO de 0,5. Em seguida foram semeadas, com auxílio de *swab* estéril, em placas de Petri contendo ágar MRS, sendo incubadas em microaerofilia, a 37°C, por 24h.

A partir do ágar MRS contendo as BAL crescidas, foram cortados assepticamente discos de 10 mm de diâmetro e adicionados às placas contendo a infestação de bactérias patogênicas. Cada tratamento foi realizado em duplicata. A interpretação dos resultados foi realizada após 24 h de incubação, a 37°C, pelo surgimento de zonas claras ao redor (halo) indicando o efeito inibitório de um micro-organismo sobre o outro. Os diâmetros de zonas de inibição do crescimento em torno discos foram medidos e os resultados dados em mm, subtraindo-se dos discos de ágar MRS.

Capacidade de auto-agregação (Muzzolón 2010 com adaptações)

Se obteve um cultivo através do crescimento das BAL em caldo MRS durante 24h, e o mesmo foi centrifugado a 5000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de PBS. Foram realizadas diluições com PBS até atingir uma DO a 600nm de 0,5 (DO_{INICIAL}). O cultivo diluído foi deixado em repouso por 2 horas a 37°C, sendo utilizada a parte superior da suspensão bacteriana para se medir novamente a DO. Para determinar a porcentagem de auto-agregação de cada cepa, aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Auto-agregação \%} = 1 - (\text{DO}_{\text{FINAL}} / \text{DO}_{\text{INICIAL}}) \times 100$$

Capacidade de co-agregação de BAL com micro-organismo patogênicos (Muzzolón, 2010 com modificações)

Foram utilizadas quatro cepas de bactérias patogênicas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* cedidas pelo LASAN, CCA, UFPI. Os inóculos de cada bactéria patogênica foram obtidos em caldo triptona de soja após 48h em estufa com controle de temperatura a 37°C. Posteriormente, a suspensão de bactérias foi submetida à centrifugação de 5000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuscitadas com PBS. Realizou-se uma padronização inicial tanto da suspensão de BAL previamente cultivadas em caldo MRS a 37°C por 24h, quanto das bactérias patogênicas em espectrofotômetro a 600nm para uma DO de 0,5, sendo a densidade ajustada com adição de PBS para as suspensões mais concentradas. Volumes iguais (1:1) das cepas de BAL e das bactérias patogênicas foram homogeneizados em agitador tipo *Vórtex* e incubados a 37°C durante duas horas sem agitação. Então, a absorvância da mistura (DO_{MIX}) foi quantificada por espectrofotômetro a 600nm. A co-agregação foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Co-agregação \%} = [1 - \text{DO}_{\text{MIX}} / (\text{DO}_{\text{BAL}} + \text{DO}_{\text{BACTÉRIA PATOGÊNICA}}) / 2] \times 100$$

RESULTADOS

A partir da análise das amostras de rações para peixes, foi possível isolar 67 cepas bacterianas. Destas, apenas seis cepas foram agrupadas como BAL após a realização da coloração de Gram e das provas de catalase, oxidase e indol. Por meio das provas bioquímicas determinou-se o gênero das BAL, que foram identificadas como: três cepas *Lactobacillus* spp., duas cepas *Enterococcus* spp. e uma cepa *Pediococcus* spp. (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das bactérias ácido lácticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI

Cepa	Morfologia	Gram	Catalase	Oxidase	Indol	Gás	Crescimento				Hidrólise		Identificação
							10°C	45°C	pH 9,6	6,5% NaCl	Esculina	Arginina	
1	Cocos	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i> spp.
2	Bacilos	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i> spp.
3	Bacilos	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i> spp.
4	Cocos	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Pediococcus</i> spp.
5	Cocos	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i> spp.
6	Bacilos	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	<i>Lactobacillus</i> spp.

Das seis cepas isoladas, a cepa 6, pertencente ao gênero *Lactobacillus*, foi a única que apresentou inibição *in vitro* frente a todos patógenos testados. As demais cepas apresentaram inibição apenas contra *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 2).

Tabela 2. Inibição de crescimento de bactérias patogênicas frente as bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI

Cepa	Gênero	Diâmetro médio dos halos inibitórios (mm) nas bactérias patogênicas testadas			
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
1	<i>Enterococcus</i> spp.	20	-	-	-
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	19	-	-	-
3	<i>Lactobacillus</i> spp.	18	-	-	-
4	<i>Pediococcus</i> spp.	18	-	-	-
5	<i>Enterococcus</i> spp.	24	-	-	-
6	<i>Lactobacillus</i> spp.	18	20	26	20

-: sem inibição

Todas as cepas isoladas apresentaram capacidade de auto-agregação (Tabela 3). A taxa de auto-agregação variou de 16% a 35%. A cepa 4, representada por um BAL do gênero *Pediococcus* sp., apresentou maior porcentagem de auto-agregação (35%), já a cepa 3, representada por uma BAL do gênero *Lactobacillus*, apresentou menor porcentagem de auto-agregação.

Tabela 3. Porcentagem de auto-agregação das bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI

CEPA	Gênero	Auto-agregação (%)
1	<i>Enterococcus</i> spp.	27
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	33
3	<i>Lactobacillus</i> spp.	16
4	<i>Pediococcus</i> spp.	35
5	<i>Enterococcus</i> spp.	20
6	<i>Lactobacillus</i> spp.	32

Todas as cepas pesquisadas possuem capacidade de co-agregação (Tabela 4). As cepas apresentaram taxas de co-agregação baixas, com uma variação de 9% a 22%. As maiores porcentagens de co-agregação foram observadas na cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) com todas as cepas patogênicas testadas.

Tabela 4. Porcentagem de co-agregação das bactérias ácido-láticas isoladas de rações para peixes oriundas de propriedades piscicultoras da zona rural de Teresina, PI

Cepa	Gênero	Co-agregação (%)			
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
1	<i>Enterococcus</i> spp.	10	15	12	14
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	15	9	10	14
3	<i>Lactobacillus</i> spp.	14	10	11	12
4	<i>Pediococcus</i> spp.	11	12	10	15

5	<i>Enterococcus</i> spp.	11	12	10	11
6	<i>Lactobacillus</i> spp.	16	22	17	19

DISCUSSÃO

Na literatura não foi possível encontrar pesquisas referentes ao isolamento de BAL em rações para peixes, entretanto, foram realizados estudos de BAL em rações para cães: Muzzolón (2010) não encontrou BAL, porém Lauková et al. (2008) isolou BAL pertencentes a diferentes espécies de *Enterococcus*. As rações para peixes avaliadas neste estudo foram coletadas de sacos que se encontravam expostos e em contato direto com o chão de locais destinados para o seu armazenamento, que também serviam como depósito para outros materiais. Próximo ao local de armazenamento das rações, encontravam-se presentes cães, gatos e galinhas. Logo, a presença de *Enterococcus* spp. pode ser atribuída a contaminação fecal ou pode ser originária de grãos ou outros componentes da ração (Lauková et al. 2008), enquanto a presença de *Lactobacillus* spp. pode ser oriunda do ambiente, pois estas bactérias crescem e se adaptam a diferentes condições ambientais (Hammes & Hertel 2006). Já contaminação por *Pediococcus* spp. pode ser associada a presença de vegetais fermentados na ração (Allegreti 2009).

Apenas a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Resultado semelhante foi encontrado por Martins et al. (2006), que isolaram cepas de BAL em fezes de porco capazes de inibir *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhi e *Escherichia coli*. Rebutti et al. (2007) encontraram resultados que confirmam o que foi demonstrado no presente trabalho ao identificarem *Lactobacillus casei* de salsicha fermentada com atividade antagonista contra *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*.

Diferentemente dos *Enterococcus* spp. analisados, espécies de *Enterococcus* isoladas por Acurcio et al. (2014) a partir de leite de ovelha apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*, além dos *Enterococcus faecium* pesquisados por Juri et al. (2013) em fezes de cães que inibiram *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Yuksekgad e Aslim (2010) identificaram espécies de *Pediococcus* em salsichas fermentadas que não possuíam atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, enquanto algumas espécies inibiram *Escherichia coli*.

A inibição de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* frente todas as cepas BAL desta pesquisa não corrobora com os dados de Coelho (2013), pois não se obteve atividade microbiana das BAL, dentre elas *Lactobacillus* e *Enterococcus*, oriundas de queijo contra *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto Juri et al. (2013) relatou inibição de *Pseudomonas* spp. frente *Enterococcus faecium*.

Vale ressaltar que a atividade antimicrobiana resulta da ação de substâncias inibidoras produzidas pelas BAL, como ácido lático; ácido acético; peróxido de hidrogênio; substâncias bactericidas de alto e baixo peso molecular, a exemplo de bacteriocinas e reuterinas, respectivamente (Jatobá et al. 2008). Portanto, é necessária a realização de testes para determinar quais substâncias foram produzidas pelas BAL ao inibir os patógenos.

Como testes *in vitro* de antagonismo frente a patógenos são frequentemente empregados para selecionar potenciais BAL probióticas (Ehrmann et al. 2002), todas as cepas de BAL analisadas possuem potencial probiótico satisfatório para *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) a que apresentou melhor resultado, pois inibiu todas as bactérias patogênicas avaliadas.

A capacidade de se aderir a células também é um dos fatores para a seleção de cepas como potenciais probióticos (Ehrmann et al. 2002), podendo ser avaliada através de ensaios *in vitro* de auto-agregação e co-agregação, pois estes mecanismos estão

relacionados com a capacidade de adesão ao epitélio intestinal (Collado et al. 2007). No presente estudo, apesar de todas as BAL se agregarem, a porcentagem de auto-agregação, com variação de 16% a 35%, não foi satisfatória, porque de acordo com Del Re et al. (2000), a porcentagem indicada como aceitável para que a cepa seja considerada probiótica deve ser >40%. Logo, as BAL isoladas apresentaram uma baixa capacidade de colonizar o trato gastrointestinal (Collado et al. 2007). Em relação a auto-agregação de *Enterococcus* spp., os resultados corroboram com os relatados por Muzzolón (2010), que obteve uma variação de 6% a 46%. Já em relação a auto-agregação dos *Lactobacillus* spp., os resultados diferem dos encontrados por Todorov et al. (2008), que relatam valores de porcentagem de auto-agregação variando de 67% a 99%. O resultado de auto-agregação do *Pediococcus* spp. foi igual ao do *Pediococcus pentosaceus* testado por Yuksekad & Aslim (2010).

Apesar de todas as BAL se co-agregarem com os patógenos testados nesta pesquisa, os resultados não foram satisfatórios. Dessa forma, as BAL avaliadas não são capazes de formar uma barreira físico-química que impeça a colonização de patógenos (Collado et al. 2007). Os resultados para co-agregação de *Enterococcus* spp. com *Salmonella* spp. diferem das porcentagens de co-agregação encontrados por Muzzolón (2010), no entanto os resultados para co-agregação de *Enterococcus* spp. com *Escherichia coli* são semelhantes. Sahoo et al. (2014), ao analisarem a co-agregação de *Lactobacillus* spp. com *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, encontraram taxas de co-agregação superiores (38.01% a 57.63%) as taxas dos *Lactobacillus* spp. isolados nesta pesquisa.

CONCLUSÕES

Foram isoladas BAL de rações para peixes, e estas foram identificadas como cepas pertencentes aos gêneros: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Pediococcus* spp. As cepas isoladas de BAL não possuem potencial probiótico satisfatório para os ensaios de auto-agregação e co-agregação. Para o teste *in vitro* de inibição aos patógenos, todas as cepas apresentaram potencial probiótico satisfatório para *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) a que apresentou melhor resultado por inibir *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Apesar dos resultados pouco satisfatórios nos testes probióticos executados, a cepa 6 (*Lactobacillus* spp.) pode ser promissora. Logo, é necessária a realização de mais ensaios *in vitro*, além de ensaios *in vivo*, para provar seu potencial probiótico completo.

Agradecimentos

Às propriedades piscicultoras por contribuírem com o fornecimento das amostras. À UFPI e ao NUEPPA pelo suporte laboratorial necessário para este estudo fosse realizado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado. À Prof^a. Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori pela orientação.

REFERÊNCIAS

- Acurcio L.B., Souza M.R., Nunes A.C., Oliveira D.L.S., Sandes S.H.C. & Alvim L.B. 2014. Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(3):940-948.
- Allegretti, L. 2009. Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de

- Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 101p.
- Bondad-Reantaso M., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogawa K., Chinabut S., Adlard R., Tan Z. & Shariff, M. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet. Parasitology*. 132:249-272.
- Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Produção da Pecuária Municipal. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>>. Acesso em 24 jan. 2016.
- Carr F., Chill, D. & Maida, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4):281-370.
- Castellano P., Belfiore C., Fadda S. & Vignolo G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*. 79:483-499.
- Coelho, M. C. 2013. Isolamento e caracterização de bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no fabrico de queijo fresco. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar), Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo. 129 p.
- Collado M.C., Surono I., Meriluoto J. & Salminen S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of Food Science*. 72:89-93.
- Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M. & Palenzona D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 31:438-442.
- Ehrmann M.A., Kurzak P., Bauer J. & Vogel R.F. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*. 92:966-975.
- FAO/WHO - Food and Agricultural Organization/World Health Organization. 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em 20 jan. 2016.
- Figueiredo H.C.P. & Leal C.A.G. 2008. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37:08-14.
- Hammes W. P. & Hertel C. 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, p.320-403. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt, E. *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 3rd ed. Springer, Nova York.
- Jatobá A., Vieira F.N., Buglione Neto C., Silva B.C., Mouriño J.L.P., Jerônimo G.T., Dotta G. & Martins M.L. 2008. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(9):1201-1207.
- Juri M.G.F., Muzzolon J., Dalcerio A.M. & Magnoli C.E. 2013. Inhibitory properties of *Enterococcus* spp. isolated from faeces of healthy dogs. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 48(11):983-992.
- Lauková A., Marcináková M., Stropfová V. & Ouwehand A.C. 2008. Probiotic potential of enterococci isolated from canine feed. *Folia Microbiologica*. 53(1):84-88.
- Martins A.D.O., Mendonça R.C.S., Silva D.L., Ramos M.S., Martins M.C., Donzele J.L. & Andrade N.J. 2006. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microrganismos indicadores. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 5(1):53-59.

- Muzzolón J. 2010. Uso de bacterias lácticas y/o levaduras en la prevención de aflatoxicosis en animales de compañía. Monografía (Título de Microbiólogo), Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto. 110 p.
- Pfeiler E.A. & Klaenhammer T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*. 15:546-553.
- Rebucci R., Sangalli, L., FAVA M., Bersani C., Cantoni C. & Baldi A. 2007. Evaluation of functional aspects in *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *Journal of Food Quality*. 30:187-201.
- Saad S. M. I. 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 42(1):1-6.
- Sahoo T.K., Jena P.K., Nagar N., Patel A.K. & Seshadri S. 2014. In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from the Gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 6(3-4).
- Sorroza L., Padilla D., Acosta F., Román L., Grasso V., Vega J. & Real F. 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Vet. Microbiol.* 155:369-373.
- Todorov S.D., Botes M., Guigas C., Schillinger U., Wiid I., Wachsman M.B., Holzapfel W. H. & Dicks, L.M.T. 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 104:465-477.
- Wang Y.B.; XU Z.R. & XIA M.S. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Science*. 71(5):1034-1039.
- Yuksekdag Z.N & Aslim B. 2010. Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk). *Journal of Microbiology Biotechnology*. 20(1):161–168.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças que acometem os organismos aquáticos ainda são uma restrição para a expansão da aquicultura. Visando o controle de doenças e a melhoria na qualidade da água dos cultivos, são realizadas pesquisas para avaliar a utilização de BAL como probióticos, caracterizando-se por ser um tema recente e propício a mais estudos.

Logo, verificou-se através do presente trabalho que novas linhas de pesquisa podem ser definidas futuramente na busca por BAL que possam ser usadas como probióticos na aquicultura:

- Isolamento de outras cepas de BAL em busca de cepas com propriedades probióticas mais satisfatórias;
- Padronização de protocolos de identificação molecular das BAL para melhor identificação das espécies;
- Realização de mais ensaios *in vitro*, além de ensaios *in vivo* para definir as propriedades probióticas mais efetivas das BAL.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. C.; LUO, J.; RAYWARD, D.; KING, S.; GIBSON, R.; MOGHADDAM, G. H. Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 41–52, 2008.
- ADNAN, A. F. M.; TAN, I. K. P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potencial. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 1380-1385, 2007.
- AGARWAL, N.; KAMRA, D. N.; CHAUDHARY, L. C.; AGARWAL, L.; SAHOO, A.; PATHAK, N. N. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves on different microbial feed additives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 329-336, 2002.
- ALEXOPOULOS, C.; GEORGOULAKIS, I. E. A.; TZIVARA, A.; KRITAS, S. K.; SIOCHU, A.; KYRIAKIS, S. C. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Athens, v. 88, p. 381-392, 2004.
- ALVES, V. F.; MARTINEZ, R. C. R.; LAVRADOR, M. A. S.; DE MARTINIS, E. C. P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, v. 74, p. 623-627, 2006.
- AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEM, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Eds.) **Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1-66.
- BADARÓ, A. C. L. et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 2. **Revista Digital de Nutrição**, v. 3, n. 4, p. 396-416, 2009.
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D., CALVO A. C.; MÁRQUEZ, I.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J. L. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 522–527, 2007.
- BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; VENDRELL, D.; CALVO A. C.; GIRONÉS, O.; MUZQUIZ, J. L. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 278, p. 188–191, 2008.
- BELLO, B. D.; RANTSIOUA, K.; BELLIO, A.; ZEPPAA, G.; AMBROSOLIA, R.; CIVERAB, T.; COCOLINA, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of autochthonous populations. **LWT Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.
- BONDAD-REANTASO, M., SUBASINGHE, R.P., ARTHUR, J.R., OGAWA, K., CHINABUT, S., ADLARD, R., TAN, Z., SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Vet.Parasitology**. v. 132, p. 249–272, 2005.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Brasil, 2014. 36 p. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>>. Acesso em 24 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano de desenvolvimento da aquicultura brasileira - 2015/2016**. Brasília, DF, 2015. 61p. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Developmento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em 24 jan. 2016.

BURBANK, D. R.; SHAH, D. H.; LAPATRA, S. E.; FORNSHELL, G.; CAIN, K. D. Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 321, p. 185–190, 2011.

CHU, W.; LU, F.; ZHU, W.; KANG, C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 202–208, 2010.

COELHO, M. C. **Isolamento e caracterização de bactérias do ácido lático produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no fabrico de queijo fresco**. 2013. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2013.

COTTER, P. C.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews- Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

CYRINO, J. E. P; BICUDO, A. J. A; YUJI, S. R; BORGHESI, R; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

DANIEL, C.; ROUSSEL, Y.; KLEEREBEZEM, M.; POT, B. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. **Trends Biotechnol.**, v. 29, n. 10, p. 499-508. 2011.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 114-119, 2003.

DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

EFSA - European Food Safety Authority. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 3: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2015. **EFSA Journal**, v. 13, n. 12, p. 1-25, 2015.

FAO/WHO - Food and Agricultural Organization/World Health Organization. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London Ontario, Canadá, 2002. 11p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2016.

- FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa, 2003. 206p.
- FLEMMING, J. S. **Utilização de leveduras, probióticos e mananoligossacarídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte**. 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.
- FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos – Uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 142, p. 22-33, 2006.
- FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 89-95, 2009.
- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147-165, 1999.
- GOBELI, S.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E.; FREY, J.; BURR, S. E. *Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 597–602, 2009.
- GONÇALVES, S. M. L. **Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- GUERRA, N. P.; BERNÁRDEZ, P. F.; MÉNDEZ, J.; CACHALDORA, P.; CASTRO, L. P. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, Boston, v. 134, p. 89-107, 2007.
- HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365-331, 2001.
- HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 813–835, 2005.
- JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, M.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, Milwaukee, v. 77, p. 1259-1265, 1998.
- KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, p. 139-144, 2003.

- KIM, D. H.; AUSTIN, B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, p. 513-524, 2006.
- LERAYER, A. L. S.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; VIALTA, A. Culturas lácticas e probióticas: Identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. P. 125-186.
- LEROY, F.; DEVUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.
- LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.
- MOHAMED, M. H.; REFAT, N. A.G. A. Pathological Evaluation of Probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in Tilapia Nilotica (*Oreochromis Niloticus*) Fish in Sharkia Governorate, Egypt. **Journal of American Science**, v. 7, n. 2, 2011.
- MOUNTZOURIS, K. C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating caecal microflora composition and metabolic activities. **Poultry Science**, v. 86, p. 309-317, 2007.
- MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Wiley-Blackwell, 2010. 417p.
- NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; BYLUND, G.; SALMINEN, S.; LILIUS, E. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 15, p. 443-452, 2003.
- NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 583-592, 2005.
- PARTHASARATHY, R.; RAVI, D. Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Indian Journal of Fishery**, v. 58, n. 3, p. 87-93, 2011.
- PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 546-553, 2007.
- POPPI, L. B.; MANCILHA, I. M.; FERREIRA, A. J. P.; LEAL, D. D. M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagonístico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p. 113-119, 2008.
- POWEDCHAGUN, P.; SUZUKI, H.; RENGPIPAT, S. Characterization of a probiotic *Bacillus* S11 bacterium of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Songklanakarinn Journal Science Technology**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2011.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; FERES, F. A.; TOLEDO, R. S. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. In: **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Ferreira CLLF, 2003. p. 181-202.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 915-923, 2007.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 42, n. 1, p. 1-6, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATILLA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J Biotechnol.**, v.84, p. 195-215, 2000.

SALMINEM, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how they should be defined?. **Trends in Food, Science & Technology**, v.10, p.107-110, 1999.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, E. Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action, **Journal of Animal Feed Science**, v. 10, p. 51-67, 2001.

SINGER, R.S. et al. Antibiotic resistance - the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 47-51, 2003.

SON, V. M.; CHANG, C. C.; WU, M. C.; GUU, Y. K.; CHIU, C. H. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coiodes*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 691-698, 2009.

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

STERR, Y.; WEISS, A.; SCHMIDT, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. **International journal of food microbiology**, v. 136, n. 1, p. 75-82, 2009.

SYBESMA, W.; HUGENHOLTZ, J.; VOS, W. M.; SMID, E. J. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 424-448, 2006.

TEALE, C.J. Antimicrobial resistance and the food chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 85-89, 2002.

TEUSINK, B.; SMID, E. J. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 1, p. 46-56, 2006.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias ácido lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.

TORO, C. R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. 2005. 153 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v. 245, p. 149-161, 2005.

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

VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; MOURIÑO, J. P. L.; JATOBÁ, A.; MARTINS, M. L.; SCHLEDER, D. D.; ANDREATTA, E. R.; BARRACO, M. A.; VINATEA, L. A. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 631-638, 2010.

WANG, Y. B.; XU, Z. R.; XIA, M. S. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fisheries Science**, v. 71, n. 5, p. 1034-1039, 2005.

WANG, Y.B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 269, p. 259–264, 2007.

WANG, Y. B.; TIAN, Z. Q.; YAO, J. T.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v. 277, p. 203-207, 2008.