

JOSÉ HUMBERTO SANTOS FILHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS
ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA**

TERESINA, 2016

JOSÉ HUMBERTO SANTOS FILHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS
ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA**

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

S237a Santos Filho, José Humberto
Avaliação do potencial probiótico de bactérias ácido lácticas
isoladas de viveiros de piscicultura / José Humberto Santos
Filho. – 2016.
51 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2016.
Orientação: Profª. Drª. Maria Christina Sanches Murtori

1. Peixes 2. Antimicrobiano 3. Inibição 4. Bactérias ácido
lácticas I. Título


CDD 639.311

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL PROBIÓTICOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS ISOLADAS EM TANQUES DE PISCICULTURA**

JOSE HUMBERTO SANTOS FILHO

Dissertação Aprovada em: 18/02/2016

Banca Examinadora:



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



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



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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir concluir mais etapa da minha vida e pelas vitórias conquistadas.

Aos meus pais, Maria da Conceição e José Humberto, e meu irmão, Alberto, pelo carinho, amor, ensinamentos, apoio e dedicação, muitas vezes desistindo de seus sonhos para a realização dos meus.

Aos meus demais familiares que me ajudaram muito durante esta caminhada.

Aos meus amigos para toda a vida, Leidiane Sousa, José Jones, Cecília Muniz, Vanessa Solano, Jéssica Soares, Thiago Silva, Francisca Dácia, Andrezza Aragão, e Márcio Leonardo pela amizade, companheirismo, e que apesar das distâncias, a amizade ainda é a mesma. Obrigado pelo grande apoio e força desde o início dessa nova etapa da minha vida, mais uma vez torcendo para a concretização dos meus sonhos.

À Aline Dourado, pela amizade e grande apoio e orientação no decorrer dessa pesquisa. Obrigado por dizer as palavras certas nas horas certas e pela grande disponibilidade, esclarecendo as dúvidas e ajudando no que precisava.

Aos meus novos amigos que fiz no NUEPPA: Cristiane Evangelista, Raizza Escórcio, Rafael Bacelar, Juliana Abreu, Juliet Teixeira, Felipe Matos, Aline Monte, Liliane Ximenes, João Farias e Amanda Cruz pelo apoio, ajuda, amizade, e disponibilização durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários do NUEPPA/CCA/UFPI, em especial, ao Sr. Francisco, Sr. Aminthas Floriano Filho, pela prestatividade e ao técnico do Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, George Emanuel Pereira da Silva, pela ajuda fundamental no laboratório.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Christina Sanches Muratori pela oportunidade, confiança, orientação, ensinamentos, apoio, amizade e compreensão nos meus momentos mais difíceis.

À Prof.^a Dr.^a Marlúcia Pereira Gomes e Prof.^a Dr.^a Maria José Santos pela amizade, confiança, compreensão e pelos ensinamentos durante esses anos de academia.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maciel Calvet pela compreensão, flexibilidade e contribuição a esse trabalho.

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de crescimento na área acadêmica.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal - UFPI, pela atenção e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e concessão de bolsa de estudos.

Aos piscicultores pela confiança, ao permitir minha entrada em suas propriedades, contribuindo assim para a realização desse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

“Ao homem pertencem os planos do coração,
mas do Senhor vem a resposta da língua”.

Provérbios 16. 1

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Bactérias Ácido Láticas (BAL).....	13
2.2 Probióticos.....	14
2.3 Benefícios dos probióticos.....	15
2.4 BAL como probióticos.....	16
2.5 Seleção de probióticos.....	19
2.6 Probióticos na piscicultura.....	20
3 CAPÍTULO – Artigo científico	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos	26
Resultados e Discussão.....	30
Conclusões.....	42
Referências.....	42
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA

RESUMO

Um dos problemas enfrentados na piscicultura no Brasil são as doenças que acometem aos peixes em criatórios, e devido a esse fato tem-se utilizado probióticos como alternativas preventivas no controle de enfermidades. Esta pesquisa objetivou verificar o potencial probiótico de cepas de bactérias ácido láticas (BAL) provenientes de ambientes de piscicultura. Foram analisados 36 amostras de substratos (lama) e águas de tanques de piscicultura, localizados na zona rural de Teresina, PI, dos quais foram isolados 197 cepas. As cepas foram avaliadas *in vitro* quanto a capacidade de inibição aos patógenos *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes utilizados foram autoagregação e co-agregação, produção de compostos antagônicos e resistência a antibióticos. Do total dos isolados por meio de provas bioquímicas e fisiológicas foram identificadas 19 cepas de BAL, divididas entre os gêneros *Lactococcus* (5,26%), *Lactobacillus* (10,52%), *Leuconostoc* (5,26%) e *Enterococcus* (80%), sendo este último em maior quantidade. Na avaliação dos testes de agregação e co-agregação as BAL mostraram-se com baixo potencial inibitório, porém quanto aos testes de susceptibilidade antimicrobiana todas as cepas mostraram-se sensíveis aos principais antibióticos administrados. Após análise dos resultados concluiu-se que as cepas BAL isoladas não possuem potencial probiótico satisfatório por apresentar baixa inibição a *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: antimicrobiano, inibição, bactérias ácido láticas

ASSESSMENT OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA LACTIC ACID ISOLATED FROM FISHPONDS

ABSTRACT

One of the problems faced in fish farming in Brazil are the diseases that affect the fish farms, and because of this fact has been used probiotics as preventive alternatives in disease control. This research aimed to verify the potential probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) from fish farming environments. We analyzed 36 sample substrates (mud) and water psicultura tanks, located in the countryside of Teresina, PI, which were isolados197 strains. The strains were evaluated in vitro for their ability to inhibit pathogens *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The tests were autoagregacao and coaggregation, production of antagonistic compounds and antibiotic resistance. Of total isolated by biochemical and physiological tests were identified 19 strains of BAL, divided among *Lactococcus* genera (5.26%), *Lactobacillus* (10.52%), *Leuconostoc* (5.26%) and *Enterococcus* (80%), the latter being in greater quantities. In the evaluation of the aggregation and co-aggregation test the BAL showed up with low inhibitory potential, but as the antimicrobial susceptibility testing all strains were sensitive to the main administered antibiotics. After analyzing the results it was concluded that the isolated strains BAL not satisfactory probiotics have the potential for introducing low inhibition *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: antimicrobial, inhibition, lactic acid bacteria

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma atividade agrícola lucrativa no Brasil devido aos seus recursos hídricos abundantes, o clima tropical e espécies de peixes que apresentam aptidão para o desenvolvimento da atividade. Aspectos como qualidade nutritiva do pescado, potencial de geração de emprego da indústria pesqueira, baixo custo da produção de peixes em cativeiros e o aumento da demanda de alimentos em função do crescimento populacional tornam a piscicultura uma atividade viável para a agropecuária.

Alguns patógenos infecciosos em peixes, como *Vibrio spp* e *Aeromonas spp*, afetam diretamente a atividade piscicultora. Consequentemente tornou-se frequente a utilização de antibióticos na aquicultura para tratamento das enfermidades e também como medida profilática; consequentemente, devido à redução de infecções, atuam também como promotores do crescimento dos animais. Entretanto, essa prática pode favorecer a ocorrência de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, portanto, sua utilização em piscicultura deve ser administrada com cautela.

Como alternativas ao tratamento profilático com antimicrobianos, torna-se mais frequente a utilização de aditivos ou matérias-primas nos alimentos dos peixes que favorecem o desenvolvimento e fortalecimento do sistema imunológico. Dentre essas alternativas tem-se a administração de probióticos e prebióticos, os quais além de melhorar o desempenho, promovem benefícios à saúde dos animais.

Os probióticos são culturas de micro-organismos que são adicionadas ao alimento e que favorecem de várias maneiras o organismo hospedeiro, podendo agir na reorganização e colonização da microbiota do intestino, competição por sítios de ligações específicos e estímulo a resposta imune do hospedeiro. Várias espécies de micro-organismo possuem propriedades probióticas, porém as bactérias ácido lácticas (BAL) recebem especial atenção, pois além de agir na saúde do hospedeiro fornecem benefícios na produção de alguns alimentos, como alterações organolépticas e aumento do tempo de conservação por ação de enzimas específicas.

As BAL são representadas por vários gêneros bacterianos e estão naturalmente presentes em alimentos lácteos fermentados e derivados, bem como no ambiente, sendo possível seu isolamento do solo, água, esgoto e trato gastrointestinal de alguns animais e do homem.

Reconhecendo o potencial probióticos de algumas BAL e sua presença em diversos tipos de ambiente, esta pesquisa teve como objetivo identificar e testar o potencial probióticos de BAL isoladas de ambientes de piscicultura.

Os resultados obtidos foram apresentados em forma de artigo científico seguindo as normas de publicação da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, para a qual será submetido para posterior publicação. O artigo foi apresentado no capítulo intitulado: Avaliação do potencial probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de tanques de piscicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias Ácido Láticas (BAL)

As bactérias lácticas fazem parte de um grupo que produzem ácido láctico após a fermentação de carboidratos. São caracterizadas como cocos, bastonetes ou bacilocos Gram-positivas, geralmente imóveis, não esporuladas, catalase negativas. Inicialmente esse grupo pertencia a quatro gêneros (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*) que foram subdivididos nos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (TAMANINI, 2008; SILVA et al., 2010; POFFO; SILVA, 2011). Todas estas bactérias crescem em condições de micro-aerofilia ou anaerobiose, e possuem propriedades fisiológicas e bioquímicas semelhantes (ALLEGRETTI, 2009; DIAS, 2014; GOMES; MOTTA, 2015).

Estas bactérias são classificadas como homofermentadoras ou heterofermentadoras conforme os produtos finais da fermentação dos carboidratos. Os homofermentadores (*Streptococcus* e *Pediococcus*) produzem ácido láctico como maior produto da fermentação da glicose e os heterofermentadores (*Leuconostoc* e as Betabactérias) além do ácido láctico produzem também dióxido de carbono, etanol, aldeído e diacetil. Os heterofermentativos são mais usados na indústria láctea por causa da produção de substâncias flavorizantes, como o diacetil (CARR, CHILL e MAIDA, 2002; GOMES; MOTTA, 2015).

As bactérias ácido-láticas (BAL) fazem parte da microbiota intestinal dos mamíferos e são encontradas em ambiente rico em nutrientes e podem ocorrer naturalmente em laticínios, produtos cárneos e vegetais, podendo fazer parte da tecnologia de alguns alimentos. Outros habitats as quais podem ser encontrados incluem solo, água, água de esgoto, silagem (SCHNURER; MAGNUSSON, 2005; ALMEIDA, 2007; TAMANINI, 2008; JENSEN et al., 2012; SILVA, 2011; LIMA et al., 2012).

Estes micro-organismos são utilizados na preparação de alimentos por alterar de forma favorável, a sua textura, aroma e sabor devido à produção de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas. Possuem ainda capacidade de prevenir a deterioração precoce de produtos alimentícios, ao inibir o desenvolvimento de organismos prejudiciais a saúde pela competição por oxigênio e por sítios de ligação. Além desses efeitos de preservação as bactérias ácido-láticas, possuem efeito probiótico por inibirem o

crescimento de bactérias patogênicas pela produção de compostos antibacterianos, como bacteriocinas, diacetil, peróxido de hidrogênio, ácido láctico e reuterim (SCHNURER; MAGNUSSON, 2005; ALMEIDA, 2007; JATOBÁ et al., 2008; TAMANINI, 2008; ALLEGRETTI, 2009; POFFO; SILVA, 2011; LIMA et al., 2012).

Quanto à identificação e isolamento dos gêneros de BAL, requerem tempo e meios de cultura muito rico em nutrientes (carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas) por serem micro-organismos nutricionalmente fastidiosos (ALMEIDA, 2007; ALLEGRETTI, 2009; SILVA, 2011).

2.2 Probióticos

Probióticos são micro-organismos vivos que promovem benefícios à saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades adequadas (FAO, 2002). A maioria desses micro-organismos são bactérias, mas também podem ser fungos filamentosos e leveduras (SINGH et al., 2011).

Muitas bactérias probióticas estão presentes no grupo das BAL, sendo as espécies *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Bifidobacterium* spp. as principais usadas em preparos probióticos. As espécies de leveduras normalmente usada como probióticos são *Sacharomices cerevisiae* e *S. cerevisiae* var. *boulardi*, *Xanthophyllomyces* e *Schizosaccharomyces*. (SINGH et al., 2011; ARGYRI et al., 2013; EFSA, 2015).

Os probióticos têm sido introduzidos na fabricação de vários produtos lácteos fermentados, derivados de carne, sorvetes, *smoothies*, cereais, barrinhas de cereais, fórmulas infantis e soja (REBUCCI et al., 2007; ARGYRI et al., 2013). São consumidos a partir da adição de culturas vivas em iogurtes e outros suplementos alimentares. Alguns são utilizados em pasta ou em pó no preparo de ração para animais (SINGH et al., 2011; HOU et al., 2015).

As cepas probióticas geralmente são selecionadas conformes critérios relativos à: tolerância a ácidos e a bile, habilidade de adesão epitélio para colonização trato intestinal, produção de substâncias antimicrobianas, resistência a antibióticos, demonstrada eficácia e segurança (cepas não-patogênicas e não-tóxicas), e sobrevivência ao processamento industrial (SINGH et al., 2011; HERMANNNS, 2013; HOU et al., 2015).

2.3 Benefícios dos probióticos

Está bem estabelecido que o uso de probióticos em alimentos confere efeitos benéficos a saúde de homens e animais. Na prática veterinária, o uso de probióticos nos alimentos, segundo a União Européia, substituindo o uso de promotores de crescimento e também por ser uma alternativa à adição de antibióticos na alimentação. São comumente fornecidos a cavalos jovens, em piscicultura e outras culturas, como suplementos alimentares, e no gado são utilizados para prevenir doenças alimentares (REBUCCI et al., 2007; GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; SINGH et al., 2011; ARGYRI et al., 2013).

Em animais de produção tem sido observado que os probióticos promovem o crescimento, aumentam a eficiência da conversão alimentar, reestabelece a microbiota gastrointestinal estimula o sistema imunológico e protege o trato gastrointestinal do hospedeiro contra doenças (HOU et al., 2015).

Muitos mecanismos de cada probióticos medeiam benefícios à saúde no hospedeiro podendo ser divididos em três categorias: atividade antimicrobiana, adesão ao epitélio intestinal e estímulo da resposta imune do hospedeiro (JENSEN et al., 2012).

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Os probióticos fornecem uma alternativa potencial ao uso de antibióticos nos alimentos, uma vez que produzem substâncias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, reuterina, e reuterociclina, que possuem potencial de inibição contra patógenos entéricos como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, e rotavírus. Dessa forma, ao reduzir o número desses patógenos no trato gastrointestinal, promove o equilíbrio da microbiota local e diminuindo o risco de doenças do trato-gastrointestinal (ARGYRI et al., 2013; HOU et al., 2015). Além desses efeitos, algumas bacteriocinas são utilizadas em alimentos como conservantes (HERMANNNS, 2013).

2.3.2 Adesão ao epitélio intestinal

Probióticos também são utilizados na homeostase da microbiota intestinal, ao impedir patógenos de colonizarem ou aderirem à mucosa, estabilizando a função da barreira gastrointestinal (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). Essa

propriedade constitui em um benefício à saúde do hospedeiro, uma vez que permite à cepa probiótica colonizar eficazmente, e impede desde modo a proliferação de micro-organismos patogênicos, assim como também ajuda a diminuir os riscos de alergias e alterações à digestão (MUZZOLÓN, 2010).

2.3.3 Estímulo à resposta imune

O estímulo do sistema imunológico é um dos benefícios mais comumente relatados pela utilização de probióticos, uma vez que possuem propriedades de estimular a resposta da imunidade inata pela modulação de citocinas pro-inflamatórias (NAYAK, 2010; HOU et al., 2015; WONG et al., 2015). As respostas imunes possivelmente ocorrem ao ativar macrófagos, aumentando os níveis de citocinas, aumento da atividade natural das células NK (*Natural Killers*), e/ou aumentando os níveis de imunoglobulinas. Dessa maneira ocorre inibição do desenvolvimento e redução de infecções por patógenos comuns como *Salmonella* e *Shigella* (SINGH et al., 2011).

2.4 BAL como Probióticos

Em um alimento fermentado, denomina-se cultura láctea (ou *starter*, ou fermento láctico) o preparo de uma cultura microbiológica com concentrações de células padronizadas, de um mesmo micro-organismo ou de espécies diferentes, que é adicionado ao alimento durante o processo de produção com intuito de auxiliar na fermentação e fornecer qualidades nutricionais (REBUCCI et al., 2007; MONTEGAUDO-MERA, 2012). As culturas iniciais provocam transformações nas matérias-primas, produzindo ácidos e outras substâncias que melhoram as características sensoriais de vários produtos alimentícios (VILLA et al., 2014).

Algumas espécies de BAL têm sido largamente usadas como cultura inicial em produtos fermentados, tendo recebido o estatuto GRAS (*Generally Recognized As Safe*), fornecido pela *American Food and Drug Agency* (FDA) (MONTEAGUDO-MERA, 2012; DIAS, 2014).

Além disso as BAL têm tido relevância, tanto na indústria de alimentos quanto em saúde pública, tendo sido utilizadas há muito tempo em alimentos por apresentarem características transformadoras, probióticas e bioconservadoras (TAMANINI, 2008; HERMANNNS, 2013; VILLA, 2014; GOMES; MOTTA, 2015).

Dois aspectos podem ser considerados quando se utilizam bactérias ácido lácticas como probióticos: a fermentação do alimento e a antibiose. No primeiro caso, a cultura inicial adicionada age sobre o produto, resultando em benefícios ao alimento, e no segundo caso, a cultura iniciadora deve inibir o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis que causam danos ao produto ou à saúde do consumidor. Esta inibição é, em parte, devido aos produtos finais da fermentação, como ácido láctico, diacetil, acetaldeído e ácido acético, que podem acumular em níveis inibitórios em certos alimentos e bebidas. Em outros casos, a inibição pode, ainda, ser causada por subprodutos secundários da atividade metabólica, tais como peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas (BELLO et al., 2010; BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010; VILLA, 2014).

Alguns gêneros de BAL unem-se a carboidratos específicos de enterobactérias e inibem sua adesão mediante agentes antimicrobianos e a produção de substâncias de baixo peso moléculas, produzindo efeitos tóxicos sobre outras bactérias ao aderir-se aos receptores de suas superfícies (HERMANNNS, 2013; VILLA, 2014).

Micro-organismos mais frequentemente usados como agentes probióticos incluem algumas bactérias do gênero *Streptococcus* e algumas espécies de leveduras, principalmente espécies de *Saccharomyces*. Porém as bactérias de maior aplicação como probióticos são as bactérias ácido-lácticas (BAL), as quais pertencem os gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Tabela 1) (JENSEN et al., 2012; MUZOOLÓN, 2010; LAUKOVA et al., 2008; ARGYRI et al., 2013; HOU et al., 2015).

Tabela 1 – Micro-organismos mais utilizados como probióticos

Gênero	Espécie
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. casei</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. paracasei</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. rhamnosus</i>

	<i>L. salivarius</i> <i>L. lactis</i> <i>L. bulgaricus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. lactis</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. salivarius</i> sub sp. <i>Thermophilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>S. pombe</i>
<i>Xanthophyllomyces</i>	<i>X. dendrorhous</i>

Fonte: MUZZOLÓN, 2010; EFSA, 2015

Alguns desses gêneros, como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, são habitantes normais do trato gastrointestinal de vertebrados como tilápias, galinhas, cachorros e até mesmo humanos, porém outras fontes de bactérias de potencial probióticos podem ser produtos lácteos fermentados, como leites e iogurtes fermentados, salsichas enlatadas, alimentos de origem vegetal, frutas, cereais, carnes ou peixes. Espécies desse gênero têm sido bem documentadas como boas cepas probióticas e utilizadas em vários produtos alimentares fermentados a partir da adição de culturas vivas em iogurtes e outros suplementos alimentares para humanos a animais. (ALY, 2008; MUZZOLÓN, 2010; SINGH ET AL., 2011; ARGYRI, 2013; HOU et al., 2015).

Quanto à agricultura, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Sacharomyces* são atualmente os probióticos mais usados na pecuária, avicultura e práticas agrícolas, promovendo principalmente resistência a doenças ao estimular o sistema imunológico do hospedeiro (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; NAYAK, 2010).

Outro uso das BAL tem sido mecanismo de remoção de aflatoxinas em rações contaminadas por fungos, uma vez que as BAL possuem a propriedade de inibir a biossíntese de aflatoxinas, ou ainda, possuem a habilidade de remover a micotoxina do meio minimizando a ação desta, ajudando assim a reduzir os riscos de exposição a essas

toxinas pelo consumo de alimentos, (BOVO; CORASSIN; OLIVEIRA, 2010; SANTOS et al., 2014).

2.5 Seleção de probióticos

Na ordem de ação dos probióticos no trato gastrointestinal alguns critérios devem ser usados para selecionar cepas com potenciais probióticos, como capacidade de sobreviver á passagem pelo trato gastrointestinal. A capacidade para produzir compostos antimicrobianos (ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bactericidas) é outra propriedade funcional que é usada para caracterização de probióticos (REBUCCI, et al., 2007; JENSEN et al., 2012; GOMES; MOTTA, 2015).

Atividade probiótica pode ser relacionada ao gênero, espécie, ou cepas de um determinado micro-organismo. Portanto, para o uso como probióticos na alimentação animal cepas de micro-organismos precisam ser selecionadas cuidadosamente, e avaliadas pela sua inocuidade e efeitos usando métodos *in vitro*, animais controles e análises clínicas. Devem possuir capacidade de produzir um efeito benéfico ao animal hospedeiro, aumentar o crescimento ou resistência a doença; deve ser não-patogênico e não-tóxico (; SINGH et al., 2011; HOU, 2015).

Para agir como um probióticos no trato gastrointestinal e exercer seus efeitos benéficos no hospedeiro, a bactéria deve ser apta a sobreviver às condições acidas do estômago e resistir à ação da bile no início do intestino delgado. Assim, é essencial que a bactéria possua sistemas de proteção para resistir às condições do trato gastrointestinal do hospedeiro. (LAUKOVA et al., 2008; GAGGÌA; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; JENSEN et al., 2012; MONTEAGUDO-MERA, 2012; ARGYRI et al., 2013).

A aderência bacteriana as células epiteliais intestinais e/ou mucosas é frequentemente considerado como sendo uma característica desejável de uma cepa probiótica, como também pode promover ao tempo de transito intestinal. Portanto os micro-organismos devem ter capacidade de multiplicação e adesão ao intestino, colonizando-o e mantendo sua viabilidade e atividade. (JENSEN et al., 2012).

Além dessas características, de acordo com a *European Food Safety Authority*, os micro-organismos probióticos não devem apresentar resistência a antibióticos, nem apresentar patogenicidade ou toxicidade. E outra exigência na seleção de cepas probióticas é a capacidade das mesmas de resistir a quaisquer condições adversas

durante produção industrial (MONTEAGUDO-MERA, 2012; (VIALTA et al., 2012; HOU et al., 2015).

2.6 Probióticos na piscicultura

Fatores como doenças e poluições causam mortalidade massiva na criação de peixes, representando fatores limitantes na aquicultura. As doenças que causam maiores impactos na indústria incluem infecções virais e bacterioses como as provocadas por espécies de *Aeromonas*, *Yersinia*, e *Vibrio* causando infecções e produzindo, conseqüentemente, consideráveis perdas econômicas na piscicultura (WANG; NISHINO, 2008; BALCÁZAR et al, 2008; KESARCODI-WATSON et al, 2007).

Em piscicultura utilizam-se vacinações ou antibióticos na prevenção de doenças, porem esses métodos nem sempre são eficientes. Por exemplo, o uso de agentes químicos como antibióticos podem levar à promoção de cepas bacterianas resistentes (BALCÁZAR et al, 2008; WANG; NISHINO, 2008).

Como alternativa os probióticos tem sido largamente usados para controlar doenças em muitos países em desenvolvimento e seu uso na produção de peixes aquáticos tem aumentado com a demanda do aumento da piscicultura. BALCÁZAR, et al, 2008; (WANG; NISHINO, 2008; NEWAJ-FYZUL; AL-HARBJ; AUSTIN, 2014).

A primeira aplicação de probióticos na piscicultura foi relatada em 1986, e houve desde então crescente interesse no desenvolvimento de novas pesquisas de cepas com potenciais probióticos (WANG; NISHINO, 2008).

Em animais terrestres, os efeitos do probióticos ocorrem devido a produção de moléculas de inibição de patógenos e competição nutrientes ou oxigênio. Em animais aquáticos, há evidências por competição de sítios de ligação no epitélio da mucosa gastrointestinal do animal e aderência e crescimento no muco do intestino desses animais (NEWAJ-FYZUL; AL-HARBJ; AUSTIN, 2014).

Os probióticos possuem vantagens como aumento do crescimento, suplementação e redução da incidência de doenças e surtos na produção de peixes através de seus mecanismos de produção de substâncias patogênicas, ou competição por nutrientes essenciais. Quando utilizados individualmente ou em combinações, podem aumentar ambas as imunidades sistêmicas quanto locais, por exemplo, estímulo da proliferação de linfócitos B em peixes, aumento de hematócrito, aumento do número de

fagócitos, leucócitos e linfócitos. (BALCÁZAR, et al, 2008; NAYAK, 2010; NEWAJ-FYZUL; AL-HARBJ; AUSTIN, 2014).

Outros benefícios relacionados aos diferentes grupos de BAL são sua capacidade de elevar os níveis de imunoglobulina em peixes, e além dos ganhos nutricionais e outros benefícios à saúde, certo probiótico pode agir na decomposição da matéria orgânica, reduzindo os níveis de nitrogênio e fósforo bem como de amônia, nitrito e sulfato de hidrogênio (NAYAK, 2010).

3. CAPÍTULO
– Artigo científico –

1 **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS**
2 **ISOLADAS DE VIVEIROS DE PISCICULTURA**

3
4 José Humberto Santos Filho* - Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Mestrado,
5 Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil;

6 Cristiane Evangelista Lima - Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Mestrado,
7 Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil;

8 Aline Maria Dourado Rodrigues - Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Doutorado,
9 Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brasil;

10 Maria Chiristina Sanches Muratori – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências
11 Agrárias, Departamento de Morfofisiologia Veterinária

12
13 **RESUMO**

14 Um dos problemas enfrentados na piscicultura no Brasil são as doenças que acometem aos
15 peixes em criatórios, e devido a esse fato tem-se utilizado probióticos como alternativas
16 preventivas no controle de enfermidades. Esta pesquisa objetivou verificar o potencial
17 probiótico de cepas de bactérias ácido láticas (BAL) provenientes de ambientes de
18 piscicultura. Foram analisados 36 amostras de substratos (lama) e águas de tanques de
19 piscicultura, localizados na zona rural de Teresina, PI, dos quais foram isolados 197 cepas. As
20 cepas foram avaliadas *in vitro* quanto a capacidade de inibição aos patógenos *Salmonella* spp.,
21 *Escherichia coli*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os
22 testes utilizados foram autoagregação e co-agregação, produção de compostos antagônicos e
23 resistência a antibióticos. Do total dos isolados por meio de provas bioquímicas e fisiológicas
24 foram identificadas 19 cepas de BAL, divididas entre os gêneros *Lactococcus* (5,26%),
25 *Lactobacillus* (10,52%), *Leuconostoc* (5,26%) e *Enterococcus* (80%), sendo este último em
26 maior quantidade. Na avaliação dos testes de agregação e co-agregação as BAL mostraram-se
27 com baixo potencial inibitório, porém quanto aos testes de susceptibilidade antimicrobiana
28 todas as cepas mostraram-se sensíveis aos principais antibióticos administrados. Após análise
29 dos resultados concluiu-se que as cepas BAL isoladas não possuem potencial probiótico
30 satisfatório por apresentar baixa inibição a *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus*
31 *equi*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

32
33 Palavras-chave: antimicrobiano, inibição, bactérias ácido láticas

35 **ASSESSMENT OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA LACTIC ACID**
36 **ISOLATED FROM FISHPONDS**

37
38 **ABSTRACT**

39 One of the problems faced in fish farming in Brazil are the diseases that affect the fish farms,
40 and because of this fact has been used probiotics as preventive alternatives in disease control.
41 This research aimed to verify the potential probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) from
42 fish farming environments. We analyzed 36 sample substrates (mud) and water psicultura
43 tanks, located in the countryside of Teresina, PI, which were isolados197 strains. The strains
44 were evaluated in vitro for their ability to inhibit pathogens *Salmonella* spp., *Escherichia coli*,
45 *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The tests were
46 autoagregacao and coaggregation, production of antagonistic compounds and antibiotic
47 resistance. Of total isolated by biochemical and physiological tests were identified 19 strains
48 of BAL, divided among *Lactococcus* genera (5.26%), *Lactobacillus* (10.52%), *Leuconostoc*
49 (5.26%) and *Enterococcus* (80%), the latter being in greater quantities. In the evaluation of
50 the aggregation and co-aggregation test the BAL showed up with low inhibitory potential, but
51 as the antimicrobial susceptibility testing all strains were sensitive to the main administered
52 antibiotics. After analyzing the results it was concluded that the isolated strains BAL not
53 satisfactory probiotics have the potential for introducing low inhibition *Salmonella* spp.,
54 *Escherichia coli*, *Streptococcus equi*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

55
56 **Keywords:** antimicrobial, inhibition, lactic acid bacteria

57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68

69 INTRODUÇÃO

70

71 A piscicultura é uma atividade agrícola lucrativa no Brasil devido aos seus recursos
72 hídricos abundantes, o clima tropical e espécies de peixes que apresentam aptidão para o
73 desenvolvimento da atividade. Soma-se a isso a qualidade nutritiva do pescado, baixo custo
74 de produção e o potencial de geração de emprego da indústria pesqueira.

75 Alguns patógenos infecciosos em peixes, como *Vibrio* spp e *Aeromonas* spp, afetam
76 diretamente a atividade piscicultura, tornando frequente a utilização de antibióticos na
77 aquicultura para tratamento das enfermidades e também como profilaxia. Porém, essa prática
78 pode favorecer a ocorrência de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, devendo sua
79 utilização em piscicultura ser administrada com cautela.

80 Têm-se como alternativas ao tratamento profilático com antimicrobianos, a utilização
81 de aditivos ou matérias-primas nos alimentos dos peixes que favorecem o desenvolvimento
82 e fortalecimento do sistema imunológico, como a administração de probióticos e prebióticos.

83 Os probióticos são culturas de micro-organismos que ao serem adicionadas ao
84 alimento, favorecem de várias maneiras o organismo hospedeiro, podendo agir na
85 reorganização e colonização da microbiota do intestino, competição por sítios de ligações
86 específicos e estímulo a resposta imune do hospedeiro.

87 Dentre as espécies de micro-organismo que possuem propriedades probióticas, as mais
88 importantes estão no grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), as quais além de agir na saúde
89 do hospedeiro fornecem benefícios na produção de alguns alimentos, como alterações
90 organolépticas e aumento do tempo de conservação por ação de enzimas específicas.

91 As bactérias lácticas fazem parte de um grupo bactérias que produzem ácido láctico e
92 outros compostos após a fermentação de carboidratos. São caracterizadas como cocos,
93 bastonetes ou bacilocos Gram-positivas, sendo representados por bactérias dos gêneros
94 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobaacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*,
95 *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Essas bactérias além do ácido láctico
96 produzem também dióxido de carbono, etanol, aldeído e diacetil. Fazem parte da microbiota
97 intestinal dos mamíferos e são encontradas em ambiente rico em nutriente, podendo ocorrer
98 naturalmente em laticínios, produtos cárneos e vegetais, e ainda estar presentes no solo, água,
99 água de esgoto e silagem.

100 As bactérias ácido lácticas por apresentarem características transformadoras,
101 probióticas e bioconservadoras têm tido relevância na indústria de alimentos quanto em saúde
102 pública, uma vez que possuem a capacidade de inibir o desenvolvimento de micro-organismos

103 indesejáveis que causam danos ao produto ou à saúde do consumidor. Esta inibição é, em
104 parte, devido aos produtos finais da fermentação, como ácido lático, diacetil, acetaldeído e
105 ácido acético.

106 Na seleção de probióticos são considerados os seguintes critérios: capacidade para
107 produzir compostos antimicrobianos, capacidade de sobreviver a passagem pelo trato
108 gastrointestinal, capacidade de multiplicação e adesão ao intestino, colonizando-o e mantendo
109 sua viabilidade e atividade. Também é desejável que não apresentem resistência a antibióticos,
110 nem apresentem patogenicidade ou toxicidade ao organismo hospedeiro.

111 Diante do exposto esta pesquisa teve como objetivo isolar, identificar e testar o
112 potencial probiótico de BAL de ambientes de piscicultura.

113

114 **MATERIAL E MÉTODOS**

115

116 Foram coletadas 36 amostras de água e de substratos de tanques para piscicultura em
117 diferentes propriedades piscicultoras na região de Teresina, PI. A pesquisa foi executada no
118 Laboratório de Controle Microbiológico, do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento
119 de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí
120 (UFPI).

121

122 **Isolamento de cepas de BAL a partir de amostras de água de tanques para piscicultura**

123 Foram utilizadas 25 ml da amostra de água e em seguida diluída em 225 mL de água
124 peptonada a 0,1%, formando diluição inicial (10^{-1}). A partir desta, preparou-se diluições
125 decimais seriadas até 10^{-3} . A inoculação foi feita em triplicata, em alíquotas de 0,1 ml por
126 placa de Petri, na superfície do meio de cultivo Man Rogosa Sharp Agar (MRS), com auxílio
127 de alça de Drigalsky. Incubaram-se as placas a 37°C, por 24h, em microaerofilia. Com o
128 propósito de se obter cultivos puros. As diferentes colônias de BAL isoladas no meio MRS,
129 foram reisoladas no mesmo meio através do método de estrias por esgotamento e novamente
130 incubadas sob as mesmas condições relatadas anteriormente.

131 As diferentes colônias isoladas em ágar MRS foi realizada coloração por Gram e para
132 a continuidade dos ensaios selecionaram-se as colônias que apresentaram-se como bacilos e
133 cocos Gram positivos não esporulados. Fez-se uma identificação presuntiva através das
134 seguintes provas metabólicas: catalase, oxidase e indol.

135

136 **Prova de catalase**

137 A prova da catalase é utilizada para indicar a presença da catalase, uma enzima que
138 decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (ANVISA, 2004).

139 Com o auxílio de uma alça bacteriológica transferiu-se uma alçada do crescimento
140 celular em ágar nutriente para uma lâmina de vidro e sobre esta foi adicionada uma gota de
141 peróxido de hidrogênio a 3,0 %. A produção imediata de bolhas foi considerada prova
142 positiva. Como controles positivo e negativo, para este teste, utilizaram-se respectivamente,
143 amostras-padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. As BAL
144 reagem negativamente à prova da catalase.

145

146 **Prova da oxidase**

147 O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima citocromo-oxidase
148 presente nos gêneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*.

149 Uma colônia isolada foi espalhada, com auxílio de um palito de madeira ou plástico
150 estéril sobre uma fita de oxidase. A mudança da cor da colônia para a cor roxa indicava teste
151 positivo para oxidase. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC
152 25922 foram utilizados como controle positivo e negativo respectivamente (ANVISA, 2004).
153 Cepas de BAL devem reagir positivamente à oxidase.

154

155 **Produção de Indol**

156 Este teste indica a capacidade de uma bactéria degradar o aminoácido triptofano em
157 indol a partir da ação da enzima triptofanase.

158 O teste foi feito semeando o micro-organismo a ser estudado no meio de cultura Caldo
159 Triptofano em tubo de ensaio. Caso o micro-organismo possua a enzima triptofanase, o gás
160 indol resultante da degradação do aminoácido era revelado, após a adição de um reagente
161 (Reagente de Kovacs) pela formação de um anel rosa avermelhado na superfície do meio.

162 Para a execução deste procedimento utilizou-se como cepas padrão positiva
163 *Escherichia coli* ATCC 25922 e negativa *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. As cepas de
164 BAL devem reagir negativamente à produção de indol.

165 Após coloração por Gram e separação das bactérias por morfologia celular, outros
166 testes bioquímicos e metabólicos foram realizados para identificação dos gêneros:
167 crescimento em 6,5% de NaCl e em pH 9,6, desenvolvimento em temperaturas de 10°C, 45°C
168 e em MRS enriquecido com glicose, e provas de hidrólises de arginina e esculina.

169

170 **Inibição de Bactérias Patogênicas**

171 Para determinar o potencial de inibição das BAL frente as bactérias patogênicas
172 utilizou-se o método descrito por Jatobá et al. (2008) com adaptações.

173 As bactérias ácido lácticas a serem testadas foram semeadas em caldo MRS e incubadas
174 a 37°C por 24 horas em condições de anaerobiose. Após esse período estas foram suspensas
175 em solução de PBS estéril até atingir a concentração de Densidade Óptica a 600nm de 0,5, e
176 em seguida semeadas, com auxílio de *swabs* estéril, em placas de Petri contendo Ágar MRS.
177 As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 24hr.

178 Após esse período de incubação foram seccionados cinco discos, de aproximadamente
179 1 cm de diâmetro do Agar MRS e estes sobrepostos em placas com ágar Brain Heart Infusion
180 enriquecido com extrato de levedura. Cada placa de Ágar BHI foi previamente semeada, com
181 auxílio de *swab* estéril, com um dos seguintes patógenos: *Salmonella* ATCC, *Staphylococcus*
182 *aureus* ATCC 25923, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e
183 *Escherichia coli* ATCC 25922, previamente cultivados em caldo BHI e suspensos em solução
184 salina estéril na concentração de 0,5 de McFarland. As placas de BHI com os discos
185 sobrepostos foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Cada teste foi
186 realizado em duplicata.

187 Decorridos esse período foram mensurados os halos de inibição de cada bactéria
188 patogênica a partir dos discos de Agar MRS com BAL.

189

190 **Capacidade de auto-agregação**

191 O potencial de auto-agregação de uma cepa probiótica revela o quanto esse micro-
192 organismo consegue se aglomerar entre si. Isso é necessária para a adesão de linhagens
193 probióticas às células do epitélio intestinal, evitando que patógenos colonizem e/ou interajam
194 com essas células.

195 Para determinar a capacidade de auto-agregação das BAL, utilizou-se a metodologia
196 descrita por Muzzolón (2010).

197 Cada cepa de BAL analisada foi cultivada em caldo MRS a 37° C e em condição de
198 anaerobiose. Decorrido o período de 18-24 horas o cultivo foi centrifugado a 5000 RPM
199 durante 5 minutos, em seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet*
200 resultante em 5 ml de caldo PBS.

201 Foram feitas, por conseguinte, diluições sucessivas em caldo PSB até conseguir-se
202 uma densidade óptica (DO) a 600nm de 0,5 (DO inicial). O cultivo então foi mantido em
203 repouso por 2 horas a 37° C e novamente mensurado sua densidade óptica a partir da parte
204 superior da suspensão.

205 A determinação da porcentagem de auto-agregação de todas as cepas foi calculada a
206 partir da seguinte fórmula:

207

$$208 \quad \% \text{ Auto-agregação} = (\text{DI} - \text{DF}) / (\text{DI}) \times 100$$

209

210 Onde:

211 **DI: Densidade óptica inicial**

212 **DF: Densidade óptica final**

213

214

215 **Capacidade de co-agregação com bactérias patogênicas**

216 A capacidade de co-agregação apresenta uma barreira que previne a colonização por
217 micro-organismos patogênicos, uma vez que as cepas probióticas devem possuir capacidade
218 de ligar-se a esses micro-organismos.

219 As bactérias patogênicas utilizados nesse teste foram *Escherichia coli* ATCC 25922,
220 *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e
221 *Streptococcus equi*, cedidas pelo Laboratório de Doenças Infecciosas, localizado no
222 Laboratório de Sanidade Animal (LASAN), do Centro de Ciências Agrárias, UFPI. Cada cepa
223 de BAL e bactéria patogênica foram cultivadas em caldo MRS e caldo BHI enriquecido com
224 sangue, respectivamente, e incubadas a 37° C e em condição de anaerobiose. Decorrido o
225 período de 18-24 horas cada cultivo foi centrifugado a 5000 RPM durante 5 minutos, em
226 seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet resultante em 5 ml de caldo
227 PBS. Posteriormente foram feitas diluições sucessivas em caldo PSB até conseguir uma
228 densidade óptica (DO) a 600nm de 0,5 (DO inicial).

229 Uma vez preparado as concentrações dos micro-organismos misturaram-se em tubos
230 estéreis cada BAL com cada uma das bactérias patogênicas sob a mesma proporção (1:1).
231 Como controle negativo separou-se também igual volume de cada cultivo puro de micro-
232 organismos.

233 Cada cultivo foi mantido em repouso por 2 horas a 37° C e novamente mensurado sua
234 densidade óptica a partir da parte superior da suspensão. Cada mistura foi feita em duplicata.

235 A determinação da porcentagem de co-agregação entre as cepas foi calculada a partir
236 da seguinte fórmula:

237

$$238 \quad \% \text{ Co-agregação} = \text{D01} + \text{D02} - (2 \times \text{DOM}) / (\text{D01} + \text{D02}) \times 100$$

239

240 **DO1:** absorção da cultura de BAL após incubação241 **DO2:** absorção da cultura de bactérias patogênicas após a incubação242 **DOM:** mistura (BAL + bactéria patogênica) após incubação

243

244 **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana**

245 Para o teste de susceptibilidade antimicrobiana utilizou-se o teste de difusão em disco
246 seguindo as recomendações propostas pelo CLSI (2014) e Karktcham et al. (2012) de acordo
247 com os gêneros de BAL identificados.

248 Preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v),
249 com cada cepa de BAL identificada, até atingir a concentração equivalente a 0,5 de
250 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com o auxílio de swab estéril cada suspensão foi semeada
251 em superfície de placas de Petri contendo Ágar MRS. Após secagem do inóculo depositou-se,
252 então, discos dos seguintes antimicrobianos: ampicilina 10µg (AMP), penicilina 10 U (PEN),
253 ciprofloxacina 5µg (CIP), levofloxacina 5µg (LVX), tetraciclina 30µg (TET), gentamicina
254 120 µg (GEN), estreptomicina 300 µg (STR) e vancomicina 30µg (VAN).

255 As placas com o semeio foram incubados a 37° C, por 24 horas sob atmosfera de
256 anaerobiose e, decorrido esse período, mensurou-se cada halo de inibição.

257

258 **Conservação das cepas de BAL**

259 Após a identificação das cepas como bactéria ácido láctica, estas foram inoculadas em
260 caldo MRS e incubadas a 37°C por 24 h. Após o período de incubação transferiu-se para
261 microtubo tipo Ependorf, estéril, 800 µl do inóculo adicionado de 200 µl de salina glicerinada
262 a 30%, e em seguidas mantidas sob congelamento a -20 °C.

263

264 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

265

266 Isolou-se o total de 197 colônias em Ágar MRS, e após os testes iniciais presuntivos
267 para identificação de bactérias ácido lácticas (coloração por Gram, catalase e indol) restaram
268 19 cepas presuntivas de BAL. Destas, 95% (18 cepas) correspondiam a cocos (cocos em pares,
269 cocobacilos ou estreptococos) e 5% (apenas única cepa) era do tipo bastonete.

270 Foram identificados os gêneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e
271 *Lactococcus*. Os resultados referentes à morfologia e testes fisiológicos encontram-se na
272 (Tabela 1).

273

274

275

Tabela 1 – Resultados das provas de identificação das cepas (CP) de BAL isoladas de águas e substrato de tanques de piscicultura

	Morfologia	Gram	Catalase	10°C	40°C	pH 9,6	6,5% NaCl	Gás	Esculina	Arginina	Suspeita
CP8	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP20	Cocos	+	-	+	+	+	+	+	+	+	<i>Leuconostoc</i>
CP53	Cocos pares	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP63	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP70	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP77	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP96	Cocos cadeia	+	-	+	+	-	+	-	+	+	<i>Lactococcus</i>
CP99	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP108	Cocos pares	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP111	Bacilos	+	-	+	+	+	-	-	+	+	<i>Lactobacillus</i>
CP119	Cocos	+	-	-	+	+	-	+	+	+	<i>Leuconostoc</i>
CP130	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP135	Cocobacilos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP138	Cocos pares	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP142	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP162	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP171	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP179	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>
CP184	Cocos	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Enterococcus</i>

277 As maiorias das cepas de BAL isoladas correspondiam ao gênero *Enterococcus*
278 (80%). Muzzolón (2010), pesquisando BAL com potenciais probióticos em fezes de
279 cachorros encontrou 100% de cepas do gênero *Enterococcus*, e Muñoz-Atienza et al.
280 (2013), isolando BAL de frutos do mar encontrou 60% desse gênero em sua pesquisa.
281 Silva et al. (2010) afirma que *Enterococcus* têm o trato intestinal como habitat natural e
282 ocorrem em grande quantidade nas fezes humanas e de outros animais e Lauková et al.
283 (2008) por sua vez afirma que os mesmos podem estar presentes em diferentes
284 ecossistemas. Essas declarações deixam claro o fato de a maioria das bactérias isoladas
285 dos tanques de piscicultura pertencerem a esse gênero, uma vez que poderiam fazer
286 parte da microbiota intestinal dos peixes dos tanques analisados.

287 Uma única cepa bacteriana, recuperada da amostra da água de um dos tanques,
288 apresentava arranjo de cocos em cadeias (estreptococos). Os demais testes metabólicos
289 o caracterizaram como pertencentes ao gênero *Lactococcus*. Segundo Silva et al. (2010),
290 os *Lactococcus* são isolados predominantemente de leite e produtos lácteos, onde
291 ocorrem naturalmente, esclarecendo o motivo de apenas uma única colônia ter sido
292 isolada.

293 Apesar de o gênero *Lactobacillus* ser uma espécie muito frequente no trato
294 gastrointestinal de vertebrados como ratos, porcos, homem, cachorros e galinhas
295 (SILVA, 2011; HOU et al., 2015) o único exemplar isolado pertencente ao gênero
296 *Lactobacillus* era proveniente de substrato de um dos tanques analisados. Poffo e Silva
297 (2011), identificando BAL em vísceras de peixes identificaram em sua pesquisa
298 somente exemplar do gênero *Lactobacillus* diferenciando dos resultados encontrados.
299 Segundo esses autores a diferença de localidade de criação e captura dos peixes, o tipo
300 de alimentação e a própria espécie do peixe pode interferir na microbiota comensal
301 desses animais. Portanto a escassez de exemplares isolados de *Lactobacillus* pode ser
302 devido aos peixes analisados não possuírem predominantemente espécies de
303 *Lactobacillus* em seus tratos gastrointestinais.

304

305 **Inibição Heteróloga**

306 Os resultados de inibição heteróloga estão descritos na Tabela 2.

307

308

309

310

Tabela 2 – Halos de inibição da atividade inibitória de cepas de BAL contra bactérias patogênicas

	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
CP8	SI	SI	SI	9	20
CP20	18	13	SI	16	18
CP53	SI	SI	SI	SI	17
CP63	SI	SI	SI	SI	14
CP70	16	SI	SI	SI	17
CP77	9	10	6	14	18
CP96	14	7	10	12	14
CP99	SI	17	8	SI	18
CP108	14	20	SI	15	16
CP111	SI	SI	SI	SI	15
CP119	SI	SI	SI	SI	14
CP130	20	SI	SI	SI	15
CP135	SI	SI	SI	SI	16
CP138	15	SI	SI	SI	17
CP142	SI	SI	18	SI	16
CP162	23	SI	SI	19	19
CP171	18	SI	SI	SI	20
CP179	SI	5	SI	15	19
CP184	12	SI	SI	SI	17

SI: sem halos de inibição

311

312 Pode-se observar que poucos exemplares das espécies de BAL isoladas
 313 promoveram alguma atividade antagônica ao crescimento das bactérias patogênicas
 314 utilizadas. A cepa de BAL com maior atividade antagonica foi a cepa de numero 77,
 315 exemplar do genero *Enterococcus*, a qual inibiu o crescimento de todas as bacterias
 316 testadas, seguido do *Lactococcus* (quatro inibicoes) e *Leuconostoc* (três inibicoes); as
 317 demais amostras de BAL apresentaram atividade de inibicao baixa ou não satisfatoria, o
 318 que nao significa que nao possam ser eficientes mediante outros micro-organismos.
 319 Podemos ressaltar que os dados encontrados por Neto et al. (2005), Silva (2011),
 320 Rebucci et al. (2007); Andrade (2012), demonstraram maior atividade antagonica
 321 oriundas de cepas de *Lactobacillus* contra *E. coli*, ao contrario do observado, uma vez
 322 que o genero nao apresentou acao antimicrobiana nas bacterias testadas.

323 Algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir potentes
 324 antimicrobianos como a reuterina e outro ácidos orgânicos. Então pode ter ocorrido que
 325 a cepa do gênero aqui isolada não pertencia à produtora de substâncias antimicrobianas.

326 Os maiores halos de inibição encontrados ocorreram contra a cepa de
 327 *Pseudomonas*, a qual foi inibida por três cepas de *Enterococcus* e apenas uma de
 328 *Leuconostoc*.

329 A cepa patogênica que mais sofreu inibição pelas BAL foi o *Staphylococcus*
330 *aureus* e as que menos foram inibidas foram *Salmonella* e *Escherichia coli*. Esses
331 resultados diferem do encontrado por Muzzolón (2010), uma vez que em seu
332 experimento a espécie *S. aureus* foi a menos antagonizada pelas cepas de BAL. Essas
333 diferenças ocorreram provavelmente por ter sido utilizadas cepas de BAL de linhagens
334 diferentes ou patógenos não ATCCs por parte do autor.

335 De um modo geral, Coelho (2013) afirma que as bacteriocinas produzidas pelas
336 BAL atuam contra bactérias Gram-positivas, taxonomicamente próximas, e não
337 apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas. Na presente pesquisa esse
338 comportamento foi observado ao constatar que os gêneros *Salmonella*, *E. coli* e
339 *Pseudomonas*, as únicas bactérias Gram (-) testadas foram as que menos foram inibidas
340 pelas BAL, enquanto que *S.aureus* e *Streptococcus*, dois cocos Gram (+) e
341 taxonomicamente próximos aos exemplares de BAL aqui estudados apresentaram
342 maiores restrições de crescimento.

343 No presente trabalho não se procurou identificar os tipos de compostos
344 antimicrobianos, porem constata-se que houve produção destes, uma vez houve
345 atividade inibitória a partir da difusão desses compostos pelo ágar.

346

347 **Autoagregação**

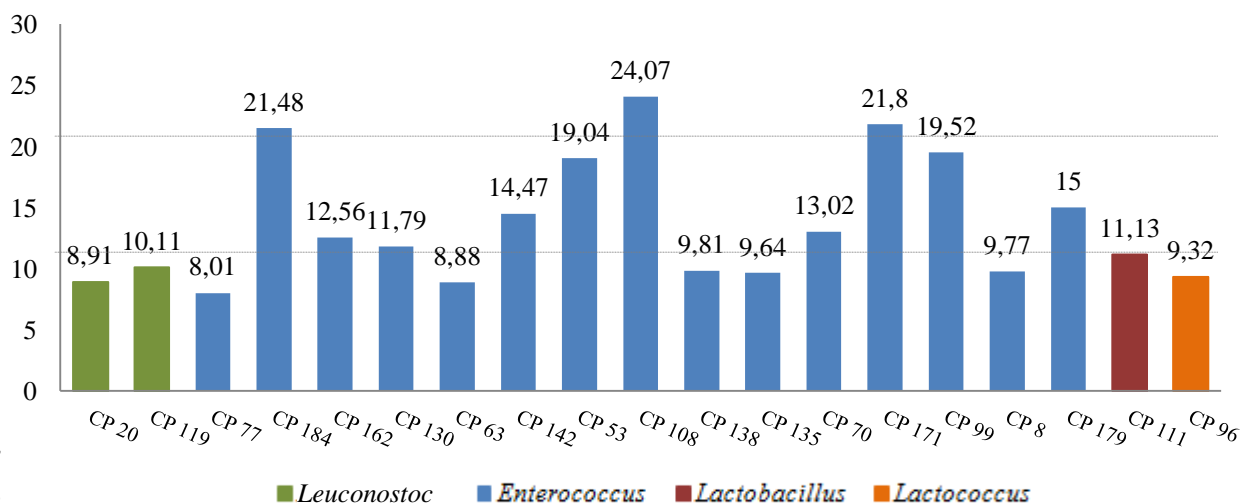
348 Todas as BAL isoladas apresentaram auto-agregação após duas horas de
349 incubação (Figura 1).

350 Encontraram-se valores de agregação entre 8,01% a 24,07%, concentrando-se a
351 maioria dos resultados em torno de 10%, apresentando assim uniformidade entre os
352 gêneros encontrados no presente estudo. Esta uniformidade pode ser decorrente da
353 origem das cepas serem o mesmo tipo de ambiente.

354

355

356 **Figura 1 – Porcentagens de autoagregação das cepas de BAL isoladas de água e substratos de tanques de piscicultura**



357

358

359

360 Dentre os quatro gêneros de BAL isoladas, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*,
 361 *Lactococcus* e algumas cepas de *Enterococcus* apresentaram valores abaixo de 15% de
 362 agregação. Todas as BAL com potencial de agregação maior que 15% pertenciam ao
 363 gênero *Enterococcus*.

364 Dentre os isolados do gênero *Enterococcus*, sete cepas (46,6%) encontravam-se
 365 entre a faixa de 10 a 20% de auto-agregação, enquanto apenas três apresentaram valores
 366 acima de 20%. Esses valores são similares aos encontrados em *Enterococcus* isolados
 367 por Hermanns (2013) a partir de leite e queijos artesanais, uma vez que as cepas
 368 apresentaram porcentagens de auto-agregação distribuídas entre 12 a 20%. Por
 369 conseguinte, as cepas de *Enterococcus* identificadas por Muzzolón (2010)b
 370 apresentaram de 6 a 46% de auto-agregação, sendo a maioria presente na faixa de 30 a
 371 46%, diferindo assim dos resultados do presente estudo.

372 *Lactobacillus* identificado apresentou apenas 11,13% de agregação. Resultado
 373 similar foi encontrado por Yuksekdog, Sahin, e Aslim (2014) ao estudar o potencial de
 374 agregação de *Lactobacilos* isolados do trato gastrointestinal de galinhas, com valores
 375 variando de 11 a 35%. Isolando BAL de leite e queijos, Hermanns (2013) encontrou
 376 *Lactobacillus* com 19% de agregação. Estudos do mecanismo de auto-agregação em
 377 *Lactobacillus* revelam que as proteínas presentes no sobrenadante e as proteínas ou
 378 lipoproteínas e polissacarídeos localizados nas superfícies celulares estão envolvidos na
 379 agregação celular (Yuksekdog e Aslim, 2010). Então a diferença dos valores observados
 380 pode ser devido às concentrações dessas proteínas no sobrenadante ou superfície celular
 381 dos *Lactobacillus*.

382 As duas cepas de *Leuconostoc* apresentaram valores de 8,91 e 10,11% de auto-
 383 agregação, semelhantemente à cepa de *Lactococcus* com 9,32%.

384

385 Co-agregação

386 Nove cepas de BAL foram utilizadas para o teste de co-agregação: as cepas
 387 correspondentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, uma do gênero *Leuconostoc*
 388 e seis de *Enterococcus* escolhidas aleatoriamente.

389 O resultado do teste de co-agregação de nove cepas de BAL está presente na
 390 Figura 2.

391

392

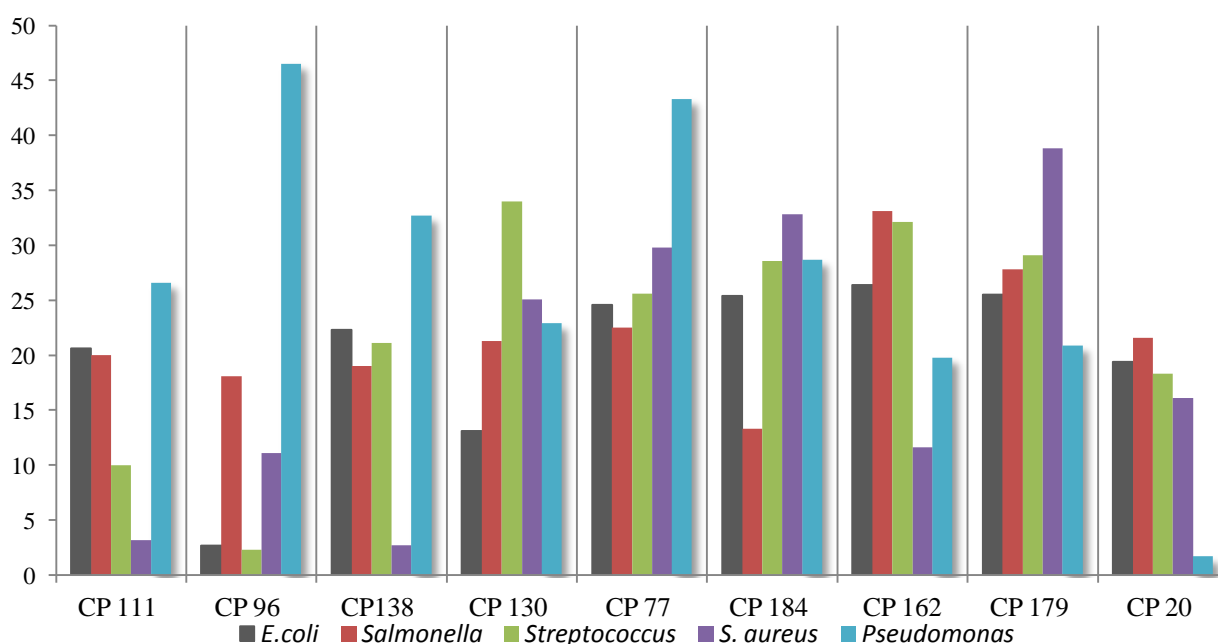
393

394

395

396 **Figura 2 – Porcentagens de coagregação de cepas de BAL com bactérias patogênicas**

397



398

399

400

401 Dentre as bactérias patogênicas utilizadas *Pseudomonas* foi o gênero que
 402 apresentou maior porcentagem de co-agregação com as cepas de BAL testadas, obtendo
 403 os seguintes valores nesse experimento: 46,5 e 43,3%, reagindo com *Lactococcus* e
 404 *Enterococcus*, respectivamente. *S. aureus* foi o segundo micro-organismo patogênico

405 que apresentou maiores porcentagem de co-agregação (38,8%), seguido por
406 *Streptococcus* (32,1%). *Salmonella* obteve uma média de co-agregação com as BAL de
407 21,85% enquanto *E. coli* apresentou média de 20%.

408 Quanto à bactéria ácido láctica, as cepas que apresentaram melhores resultados
409 pertenciam ao gênero *Enterococcus* (CP77; CP179 e CP184), e as com menores
410 resultados pertenciam ao gênero *Lactococcus* (CP96). Muzzolón (2010) encontrou
411 valores entre co-agregação de *Enterococcus* e *Salmonella* variando de 30 a 80%
412 diferindo dos valores aqui observados onde a porcentagens variaram de 13,3 a 33,1%.
413 Quanto à co-agregação com cepas de *E.coli* também houve discordância entre os
414 resultados, onde o autor observou <15% de ligação com *Enterococcus* contra os valores
415 de 13 a 26,4% nessa pesquisa.

416 Quanto à bactéria ácido láctica, as cepas que apresentaram melhores resultados
417 pertenciam ao gênero *Enterococcus* (CP77; CP179 e CP184), e as com menores
418 resultados pertenciam ao gênero *Lactococcus* (CP96). Muzzolón (2010) encontrou
419 valores entre co-agregação de *Enterococcus* e *Salmonella* variando de 30 a 80%
420 diferindo dos valores aqui observados onde a porcentagens variaram de 13,3 a 33,1%.
421 Quanto à co-agregação com cepas de *E.coli* também houve discordância entre os
422 resultados, onde autor observou <15% de ligação com *Enterococcus* contra os valores
423 de 13 a 26,4% nessa pesquisa.

424 Quanto à bactéria ácido láctica, as cepas que apresentaram melhores resultados
425 pertenciam ao gênero *Enterococcus* (CP77; CP179 e CP184), e as com menores
426 resultados pertenciam ao gênero *Lactococcus* (CP96). Muzzolón encontrou valores
427 entre co-agregação de *Enterococcus* e *Salmonella* variando de 30 a 80% diferindo dos
428 valores aqui observados onde a porcentagens variaram de 13,3 a 33,1%. Quanto à co-
429 agregação com cepas de *E.coli* também houve discordância entre os resultados, onde o
430 autor observou <15% de ligação com *Enterococcus* contra os valores de 13 a 26,4%
431 nessa pesquisa.

432 As cepas de *Leuconostoc* testada (CP20) apresentaram valores máximos para
433 *Salmonella* (21,6%) e mínimo para *Pseudomonas* (1,7%) indicando ineficiência para
434 este último micro-organismo. O contrário foi constatado pela cepa de *Lactococcus*, o
435 qual apresentou forte agregação à *Pseudomonas* e baixa a *Streptococcus*.

436 Quanto ao *Lactobacillus* a maior porcentagem de agregação foi de 26,5% com
437 *Pseudomonas*, seguido de *E.coli* e *Salmonella* com 20,6 e 20% respectivamente. Dados
438 próximos foram encontrados por Yuksekdag, Sahin, e Aslim (2014), o qual observou

439 28,3% de co-agregação de *Lactobacillus* com *E.coli* e 25% com este mesma BAL e
440 *Salmonella*. Yuksekdag e Aslim (2010), afirmam que *Lactobacillus* possuem boa
441 capacidade de interação com patógenos indesejáveis.

442 Muzzolón (2010) afirma que ensaios de agregação e co-agregação devem são
443 apenas testes preliminares e dever ser analisados conjuntamente com outros testes in
444 vitro como adesão em cultivos celulares e à mucos intestinais.

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473 **Resistência antimicrobiana**

474 O resultado do teste de antibiograma das 19 cepas de BAL está exposto na

475 Tabela 3.

476

477

Tabela 3 – Testes de sensibilidade antimicrobiana às cepas de BAL isoladas

Identificação	CIP	TET	EST	AMP	VAN	PEN	GEN	LVX		
<i>Enterococcus</i>	CP8	S (26)	R (0)	S (16)	S (35)	S (21)	S (25)	S (21)	S (23)	
	CP53	R (9)	R (13)	S (38)	R (15)	S (24)	S (33)	S (19)	I (15)	
	CP63	S (27)	S (24)	S (29)	R (13)	S (21)	S (26)	S (15)	S (21)	
	CP70	R (9)	S (22)	S (26)	R (0)	S (17)	S (20)	S (11)	S (18)	
	CP77	I (19)	S (25)	S (11)	S (28)	S (20)	S (23)	S (15)	S (20)	
	CP99	S (23)	R (9)	S (13)	S (34)	S (21)	S (30)	S (19)	S (22)	
	CP108	R (9)	S (20)	S (35)	R (15)	S (22)	S (30)	S (14)	S (25)	
	CP130	S (24)	S (32)	S (19)	S (38)	S (23)	S (34)	S (17)	S (22)	
	CP135	R (8)	S (21)	S (33)	S (25)	S (20)	S (23)	S (16)	S (22)	
	CP138	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	S (22)	R (0)	S (17)	S (25)	
	CP142	S (22)	R (9)	S (12)	S (33)	S (22)	S (31)	S (16)	S (17)	
	CP162	S (30)	S (25)	S (35)	S (17)	S (22)	S (34)	S (20)	S (21)	
	CP171	R (9)	S (22)	S (32)	R (11)	S (18)	S (22)	S (13)	S (19)	
	CP179	S (24)	R (0)	S (14)	S (32)	S (19)	S (21)	S (18)	S (22)	
	CP184	S (27)	R (0)	S (30)	R (10)	S (20)	S (24)	S (16)	S (21)	
	<i>Leuconostoc</i>	CP20	S (35)	S (22)	S (31)	R (11)	S (21)	S (25)	R (15)	S (21)
		CP119	S (22)	S (32)	I (17)	S (38)	S (24)	S (39)	I (18)	S (21)
	<i>Lactococcus</i>	CP96	S (22)	S (31)	R (9)	S (33)	S (22)	S (28)	I (19)	S (24)
	<i>Lactobacillus</i>	CP111	I (18)	R (8)	I (16)	S (35)	S (24)	S (33)	I (18)	I (16)

S: Sensível; I: inconclusivo; R: Resistente; CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; EST: estreptomicina; AMP: ampicilina; VAN: vancomicina; PEN: penicilina; GEN: gentamicina; LVX: levofloxacina

478

479 Do total de cepas de *Enterococcus* 87% (13 cepas) apresentaram resistência a
480 pelo menos um antibiótico testado; e apenas duas cepas possuíam sensibilidade a todos
481 os antibióticos. Esses dados concordam com os encontrados por Muzzolón (2010), ao
482 verificar a sensibilidade de *Enterococcus* isolado de fezes de cães, onde encontrou
483 78,6% (14 isolados) de cepas resistentes aos antimicrobianos testados. Dentre os
484 antibióticos utilizados apenas estreptomicina, vancomicina e gentamicina inibiram o
485 crescimento de todas as cepas testadas.

486 O perfil de sensibilidade a gentamicina difere dos encontrado por Coelho (2013)
487 e Muzzolón (2010), uma vez que todas as cepas de *Enterococcus* isolados por estes
488 autores apresentaram alto nível de resistência à gentamicina (100% e 85,7%,
489 respectivamente).

490 Ampicilina e ciprofloxacina foram os antimicrobianos com menor efeito de
491 inibição entre as cepas de *Enterococcus* (40% do total das cepas), seguido por
492 tetraciclina (33% das cepas), e penicilina e levofloxacina apenas uma única cepa. Todos
493 esses resultados diferem dos encontrados por Hermanns (2013), onde ao estudar
494 *Enterococcus* isolados de queijos artesanais este autor constatou 89% de cepas sensíveis
495 à ampicilina, seguido por tetraciclina e vancomicina; concordando com esse estudo
496 apenas a sensibilidade à penicilina. Diferenças similares também são observadas ao
497 comparar os resultados de Muzzolón (2010), uma vez que esse autor também observou
498 sensibilidade a AMP em 93% das cepas de *Enterococcus* e resistência a GEN em 84,7%
499 das cepas pesquisadas.

500 De Paula (2014) afirma que a resistência a tetraciclina pode ser decorrente ao
501 uso corriqueiro desse antibiótico em atividade de criações. Também relata que a
502 resistência de *Enterococcus* pode ser tanto intrínseca, mediada por genes localizados no
503 cromossoma, podendo estar presente em quase todas as estirpes de *Enterococcus*, ou
504 adquirida, mediada por genes que residem em plasmídeos ou transposons. A resistência
505 intrínseca inclui às cefalosporinas, sulfonamidas, lincosamidas, muitos β -lactâmicos.
506 Diante disso, a não concordância desses resultados pode ser devido à ausência de genes
507 que medeiam a resistência intrínseca por parte dos *Enterococcus* recuperados, ou
508 possivelmente por nunca ou raramente as propriedades psicultricas analisadas terem
509 utilizados tratamentos à base de antibióticos e, conseqüentemente, as cepas nunca terem
510 contato esses antimicrobianos.

511 A cepa de *Lactobacillus* apresentou resistência a tetraciclina, sensibilidade
512 intermediária a ciprofloxacina, estreptomicina, gentamicina e levofloxacina, e sensível
513 aos demais antimicrobianos. Estes resultados diferem dos encontrados por Kaktcham
514 (2014), ao encontrar *Lactobacillus* com sensibilidade intermediária a tetraciclina e
515 resistência a gentamicina e ciprofloxacina, mas ainda assim deve-se tomar cautela uma
516 vez que esses antibióticos não possuem espectro de ação suficientes para impedir o
517 desenvolvimento de *Lactobacillus*. Em ambos os estudos ampicilina e penicilina
518 apresentaram-se eficientes contra *Lactobacillus*.

519 Monteagudo-Mera (2012) e Pisano et al, (2014), Leite et al. (2015) também
520 encontraram *Lactobacillus* sensíveis a ampicilina, penicilina G, porém quando testados
521 a sensibilidade frente à tetraciclina apresentaram sensibilidade a esse antimicrobiano,
522 contrapondo a resistência a esse fármaco aqui observado. Também constatou-se
523 resistência a vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina.

524 A resistência de *Lactobacillus* as ciprofloxacina, gentamicina e
525 aminoglicosídeos são naturalmente encontradas como resistência intrínseca nesse
526 micro-organismo, devido à estrutura da parede celular, impermeabilidade da membrana
527 e ausência de transporte de elétrons mediada por citocromos, que mediam a absorção da
528 droga (MATHUR; SINGH, 2006; D'AIMMO; MODESTO; BIAVATI, 2007).

529 GEVERS; HUYS e SWINGS, (2003) afirmam que a resistência à tetraciclina em
530 *Lactobacillus* ssp. é uma característica adquirida, que pode ser transferida para outros
531 gêneros de bactérias do ácido lático e se tornar um problema de segurança para a saúde
532 pública de potenciais estirpes probióticas. Portanto pode-se afirmar que provavelmente
533 a cepa de *Lactobacillus* (CP111) tenha adquirido essa resistência a partir de outro
534 micro-organismo resistente a tetraciclina.

535 Por sua vez, Andrade (2012) afirma que *Lactobacillus* possuem resistência
536 intrínseca a vancomicina, o que não foi detectado na única cepa encontrada (CP 111) e
537 esta mesma autora analisando esse gênero isolados de queijos encontrou resistência aos
538 antimicrobianos estreptomicina, gentamicina e ciprofloxacina. Esses resultados são
539 similares aos apresentados uma vez que a cepa identificada apresentou sensibilidade
540 intermediária a esses antimicrobianos.

541 Quanto às cepas de *Leuconostoc* constatou-se resistência de única cepa a
542 ampicilina e gentamicina, e sensibilidade intermediária a estreptomicina e gentamicina
543 em outra amostra, e apresentando sensibilidade às demais drogas. Esses relatos também
544 diferem da afirmação de De Paula (2014), uma vez que esta relata que a maioria das

545 cepas de *Leuconostoc* estudadas apresentam resistência a gentamicina, canamicina,
546 ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina. A diferença pode ter
547 ocorrido devido à ausência de genes de resistência intrínseca nas cepas isoladas, uma
548 vez que *Leuconostoc* apresentam resistência intrínseca aos aminoglicosídeos,
549 glicopeptídeos e sulfametoxazol decorrente à resistência intrínseca a esses grupos
550 antimicrobianos (PERICHON; COURVALIN, 2000; MATHUR; SINGH, 2005).

551 A cepa de *Lactococcus* apresentou resistência a estreptomicina e sensibilidade
552 intermediária a gentamicina. Maki, (2009) afirma que há maiores resistências à
553 tetraciclina, associado a plasmídeos móveis ou a transposons, e a clindamicina,
554 eritromicina, trimetoprim e ácido nalidíxico De Paula (2014). Porém não foi encontrado
555 trabalhos relatando o perfil de sensibilidade desses gêneros com mais clareza.

556 Cepas de BAL não devem carrear genes de resistência antibiótica transferíveis
557 por causar risco, uma vez que podem transferir para outras bactérias (COMUNIAN,
558 2010).

559

560 CONCLUSÃO

561

562 Após análise dos resultados conclui-se que as cepas de BAL isoladas dos
563 tanques de piscicultura não apresentaram todas as capacidades suficientes para ser
564 considerada com potencial probiótico satisfatório.

565

566

567 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

568

569 ANDRADE, C. R. G. **Propriedades Probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp.**
570 **Isolados de Queijos Minas Artesanais da Serra da Canastra – MG.** 2012. 40 f.
571 Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) –
572 Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2012.

573

574 ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Manual de**
575 **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** 1.ed,
576 p.381, 2004

577

578 CARR, F.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey.
579 **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002. PMID:12546196.
580 <http://dx.doi.org/10.1080/1040-840291046759>

581

582 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for
583 antimicrobial susceptibility testing; twenty fourth informational supplement. Wayne,
584 Pa.: **CLSI**, 2014. 230 p. (CLSI document M100-S24).

585

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

590

591 COMUNIAN, R. et al. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of
592 *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods.
593 **International Journal of Food Microbiology**, n.138, p. 151-156, 2010.

594

595 D'AIMMO, M. R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic
596 acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products.
597 **International Journal of Food Microbiology**, n. 115, p. 35–42, 2007.

598

599 De PAULA, M. **Avaliação do risco da ocorrência de resistência a**
600 **antibióticos e/ou bacteremia causadas por bactérias ácido lácticas: uma revisão**
601 **sistemática**. 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) –
602 Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

603

604 GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. *In vitro* conjugal transfer of tetracycline
605 resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. **FEMS-**
606 **Microbiology Lett.**, v.225, p.125-130, 2003.

607

608 HERMANNNS, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de Bactérias**
609 **ácido lácticas isoladas de Leite e queijos artesanais – Rio Grande do Sul**. 2013. 101 f.
610 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

611

612 HOU, C. et al. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a
613 review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, p. 6-14, 2015.

614

615 JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato
616 intestinal de tilápia - do - nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,
617 Brasília, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, set. 2008.

618

619 KAKTCHAM, P. M. et al. Antimicrobial and safety properties of lactobacilli
620 isolated from two cameroonian traditional fermented foods. **Scientia Pharmaceutica**, n.
621 80, p. 189-203, 2012

622

623 LAUKOVA, A. et al., Probiotic potential of enterococci isolated from canine
624 feed. **Folia Microbiologic**, n. 53, v.1, p. 84-88, 2008.

625

626 LEITE, A. M. O. et al., Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains
627 isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, n. 6, v. 98, 2015.

628

629 MAKI, T. et al. A transferable 20-kilobase multiple drug resistance-conferring R
630 plasmid (pKL0018) from a fish pathogen (*Lactococcus garvieae*) is highly homologous
631 to a conjugative multiple drug resistance-conferring enterococcal plasmid. **Applied and**
632 **Environmental Microbiology**, v.75, p.3370–3372, 2009.

633

634 MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a
635 review. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.281–295, 2005.

636

637 MONTEAGUDO-MERA, A. et al. In vitro evaluation of physiological probiotic
638 properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of**
639 **Functional Foods**, v. 4, p. 531-541, 2012.

640

641 MUÑOZ-ATIENZA, E. et al., Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility
642 and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as
643 probiotics in aquaculture. **BMC Microbiology**, n. 13:15, 2013.
644 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/15>

645

646 MUZZOLÓN, J. **Uso de bacterias lácticas y/o levaduras en la prevención de**
647 **aflatoxicosis en animales de compañía.** 2010. 110 f. Monografía (Título de
648 Microbiólogo) - Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, 2010.

649

650 NETO, G. G. L.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W.
651 L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de Coalho
652 artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de**
653 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl. 2, p. 245-250, 2005.

654

655 PERICHON, B.; COURVALIN, P. Update on vancomycin resistance.
656 **International Journal of Clinical Practice**, v.115, p.88–93, 2000.

657

658 PISANO, M. B. et al. Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of
659 *Lactobacillus* Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. **BioMed Research**
660 **International**, v. 2014, Article ID 286390, 9 pages, 2014.

661

662 POFFO, F.; SILVA, M. A. C. da. Caracterização taxonômica e fisiológica de
663 bactérias ácido-lácticas isoladas de pescado marinho. **Ciência e Tecnologia de**
664 **Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 303-307, abr.-jun. 2011.

665

666 REBUCCI, R. et al. Evaluation of functional aspects in *Lactobacillus* strains
667 isolated from dry fermented sausages. **Journal of Food Quality**, v.30, p. 187–201,
668 2007.

669

670 SILVA, B. C. **Seleção de Bactérias Lácticas com Potencial Probiótico para**
671 **Uso como Veículos Vacinais Orais Contra a Leptospirose Canina.** 2011. 90 f.
672 Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
673 Horizonte, 2011.

674

675 SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**
676 **e água.** 4.ed. São Paulo: Livraria Varela., 624 p. 2010.

677

678 YUKSEKDAG, Z. N.; SAHIN, N.; ASLIM, B. In vitro evaluation of the
679 suitability potential probiotic of lactobacilli isolates from the gastrointestinal tract of
680 chicken. **Europe Food Research Technological**, n. 239, p. 313-320, 2014.

681

682 YUKSEKDAG, Z.N, ASLIM, B. Assessment of potential probiotic and starter
683 properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk).
684 **Journal of Microbiology Biotechnology**, n. 20, p.161-168, 2010.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de probióticos na alimentação animal como promotores do crescimento e como alternativas na substituição de antibióticos torna-se uma prática segura e eficaz na prevenção de doenças em diversas culturas animais, dentre elas a piscicultura.

Uma vez que para a seleção de cepas de micro-organismos com potencial probiótico se exige passagem por provas metabólicas e testes que demonstrem os efeitos requeridos de um probiótico, ainda assim se faz necessários estudos *in vivo* para verificar sua eficiência e viabilidade econômica no mercado.

5 REFERÊNCIAS

ALLEGRETTI, L. **Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Lactococcus* spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALMEIDA, R.C. de. **Caracterização bioquímica e genética de Bactérias lácticas isoladas de queijo serrano**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2007.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.; GHAREEB, A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.128- 136, 2008.

ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology**, v.33, p. 282–291, 2013.

BALCÁZAR, J. L. et al. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, n.278, p. 188-191, 2008.

BELLO, B. Dal. et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, n. 43, p. 1151-1159, 2010.

BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; OLIVEIRA, C.A.F. de. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. **UNOPAR Ciênc. Biol. Saúde.**, v.12, n. 2, p. 15-21, 2010.

DIAS, G. M. P. **Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa – Pernambuco**. 2014. 114 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2015. 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** 2015;13(12):4331, 25 pp. 2015.

FAO/WHO. (2002). Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B., Review: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 15-28, 2010.

GOMES, M. S. M.; MOTTA, A. S. Technological and functional properties of Lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, mai/jun, 2015.

JENSEN, H. et al. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n.153, p. 216-222, 2012.

KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotic in aquaculture: the need, principles and mechanism of action and screening processes. **Aquaculture**, n. 274, p. 1-14, 2007

LIMA, C. P.de. et al. Resistência de bactérias ácido-láticas a bacteriófagos provenientes de unidades de processamento de queijo Coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1117-1122, jun, 2012.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBJ, A. H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**, n.431, p. 1-11, jul, 2014.

NAYAK, S. K. Review: Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v.29, p. 2-14, 2010.

SCHNURER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, n. 16, p. 70-78, 2005.

SINGH, K. et al. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 287-290, 2011.

TAMANINI, R. **Bactérias ácido láticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no estado de Pernambuco**. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

VILLA, K. J. F. et al. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: Revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. **Revista Biosalud**, n.13, p.45-61, 2014.

WANG F, NISHINO N. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science** n. 91, p. 2380-2387, 2008.

WONG, A. et al. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. **Nutrition Journal**, v.14, n. 95, 2015.