

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**SELEÇÃO E USO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO PROBIÓTICO PARA
TILÁPIA DO NILO**

MÁRCIA GOMES DE SOUZA

SALVADOR - BAHIA

AGOSTO - 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**SELEÇÃO E USO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO PROBIÓTICO
PARA TILÁPIA DO NILO**

MÁRCIA GOMES DE SOUZA
Médica Veterinária

SALVADOR - BAHIA
AGOSTO - 2016

MÁRCIA GOMES DE SOUZA

**SELEÇÃO E USO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO PROBIÓTICO
PARA TILÁPIA DO NILO**

Tese apresentada ao Programa Doutorado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador (a): Prof^a Dra. Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt.

Co-orientador: Prof^o Dr. Mateus Matiuzzi da Costa.

SALVADOR - BAHIA

AGOSTO – 2016

Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

SO729 Gomes de Souza, Márcia
SELEÇÃO E USO DE BACTÉRIA ÁCIDA LÁCTICA COMO PROBIÓTICO EM
TILÁPIA DO NILO / Márcia Gomes de Souza. -- Salvador, 2016.
73 f.

Orientadora: Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de
Bittencourt.

Coorientador: Mateus Matiuzzi da Costa.

Tese (Doutorado - Doutorado em Zootecnia) -- Universidade
Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia,
2016.

1. Tilápia (Peixe). 2. Bactéria ácido lácticas. 3.
Probiótico. 4. Enterococcus casseliflavus EC30. 5. Modulação da
microbiota intestinal. I. Borio dos Santos Calmon de
Bittencourt, Thereza Cristina. II. Matiuzzi da Costa, Mateus.
III. Título.

SELEÇÃO E USO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO PROBIÓTICO PARA TILÁPIA DO NILO

Márcia Gomes de Souza

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia

Salvador, 31 de agosto de 2016

Comissão examinadora:



Dra. Thereza Cristina Bório dos Santos Calmon de Bittencourt
UFBA
Orientadora / Presidente




Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati
UFBA



Dr. Carlos Eduardo Copatti
UFBA



Dr. Mauricio Costa Alves da Silva
UFBA



Dra. Bartira Guerra Santos
UFBA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Márcia Gomes de Souza - filha de Dórian de Souza e Maria de Fátima Gomes Rodrigues, nasceu em um domingo, 25 de março de 1979, na cidade de Salvador, estado da Bahia. Em 28 de julho de 2008, conquistou o diploma de Medica Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). No ano de 2010, obteve o título de Mestre em Ciência Animal, na área de Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco - Univasf, sob a orientação da Prof^o. Dr^o. Fábio Meurrer. Em março de 2012, ingressou no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de Produção de Monogástricos e Aquicultura, pela Universidade Federal da Bahia, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt. Em março de 2015, iniciou o SWE- Programa de Doutorado Sanduíche na Universidade de Málaga - Espanha, sob supervisão do Prof. Dr. Salvador Arijo Andrade. Defendendo a tese intitulada Seleção e Uso de bactérias ácido lácticas como probiótico para tilápias, em 31 de agosto de 2016.

Cada etapa da vida se inicia com sonhos

Ansiava por conhecimento

Um difícil caminho,

com marcas profundas fincadas na alma,

Batalha muitas vezes lacinantes

Orar era a saída para seguir, sem desistir

E como se diz:

“Obstáculos podem ser superados e suportados,

ou não seriam os teus”

E assim foi.

Suportei, lutei e segui.

Iniciei e finalizei.

Fiz o melhor que pude mediante os conhecimentos adquiridos na academia.

Graças a Deus.

Volto a respirar com leveza de espírito.

Anseio por outros caminhos.

Sem estresse, sem pesos, mais livre.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante
é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida
quando perdoar os erros
e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar
porque um belo dia se morre.

Autora: Clarice Lispector

Dedido a Fátima Gomes (mãe) e Dórian de Souza (in memorian),
filhos caninos (Eyo, Emília, Manny e Galega).
Minhas amigas do coração (Eliene e Micheline) e ao meu amor (Oscar).
Agradeço a Deus por tudo.
Entrego-me em suas mãos

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr^a. Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt e (co-orientadores) Dr^a. Emiko Shinozaki Mendes e Dr. Mateus MatiuZZi da Costa, por toda ajuda na execução e elaboração desta tese.

Agradeço ao professores Ricardo Castelo Branco Albinati e Luis Vitor Oliveira Vidal por todo apoio e ajuda nas disciplinas, orientações extras referentes a aquicultura.

A minha família, que mesmo sem entender e algumas vezes apoiar, são minha base e estrutura espiritual. Principalmete minha mãe, Fátima Gomes, que é meu radier neste mundo e ao meu pai Dórian de Souza (falecido). Obrigada por sempre estar comigo, ajudar-me e escutar-me.

Aos meus irmãos, Maurício , Marcel e Moacir e sobrinhos, Ana Sofia, Maria Clara, Enrico e Heitor, cunhadas Alexandra e Karla, por todo amor, apoio e palavraras de conforto, e por toda ajuda sempre que necessitei.

Aos meus cachorros Eyo, Emília, Manny e Galega, por me darem amor, serenidade e motivos para prossegrir e despertar em cada dia difícil, por isso, nunca me sentir só.

A Rozzanno Antônio Cavalcanti Reis Figuerido por doar os exemplares de tilápia para seleção.

As amigas de pós-graduação Bartira Guerra e Alessandra, por estar por perto acalmando-me e rindo do meu desespero.

As amigas do coração Eliene e Micheline, por estarem presentes em minhas agonias.

Aos companheiros de trabalho e amigos de laboratório em Málaga que me auxiliaram muito, Silvana, Alberto, Milena e Albertito.

As novas amizades que me ajudaram a suportar as pressões de estar em outro país, Thaís, Eliana, Karla, Natália, Doris, Fran, Manuel, May, Agi, Rafa, Paco, Marcos e Rosa.

A meu amor, meu noivo Oscar, o melhor presente que ganhei de Deus neste momento, que me acolheu, me ajudou, me compreendeu e me ama.

Ao supervisor do doutorado sanduiche no exterior, prof. Dr. Salvador Arijó Andrade e sua equipe por toda paciência para comigo.

E por fim ao meu criador, Deus, por nunca me abandonar nas batalhas e dificuldades.

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

Capítulo 01

Isolamento e Seleção de bactéria com potencial probiótico do intestino de juvenis tilápias.

Tabela	1. Medias dos halos de inibição (mm), dos isolados a bactérias com potencial patogênico.	44
	2. Medias dos halos de inibição (mm) dos antimicrobianos nos BAL	46
	3. Contagem em placas de TSA do crescimento em SSE 0,65% do EC30 a 37 °C	50
	4. Contagem das UFC.mL ⁻¹ na diluição 10 ⁻⁶ , em placas de ágar TSA para o EC 30 na ração comercial extrusada para tilápias, para diferentes temperaturas.	50

Capítulo 02

Sobrevivência e modulação da microbiota intestinal de alevino de tilápia alimentados com *Enterococcus casseliflavus* EC30.

Tabela	1. Valores de diversidad (H ²), riqueza de especies (R), y habitabilidad (Rr) de la microbiota de tilapias do nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentados con dieta comercial (controle) e dieta suplementada com <i>Enterococcus casseliflavus</i> EC30.	68
--------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 02

Sobrevivência e modulação da microbiota intestinal de alevino de tilápia alimentados com *Enterococcus casseliflavus* EC30.

- Figura 1. Dendrograma obtido a partir da análise do padrão de bandas dos géis de DGGE da microbiota intestinal de exemplares de *Oreochromis niloticus* alimentados com uma dieta comercial (Controle) e exemplares alimentados com a dieta suplementadas com *Enterococcus casseliflavus* EC30 por 30 dias e submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco
CODEVASF - Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba
Univasf - Universidade Federal do Vale do São Francisco
UMA- Universidade de Málaga
PCR - Reação em cadeia polimerase
UFBA - Universidade Federal da Bahia
 μL - microlitro
OD - Densidade ótica
pH - Potencial hidrogeniônico
Tris-HCl - Hidroximetil-aminometano-hidroclorídrico
BAL - bactérias ácido lácticas
EC30 - *Enterococcus casseliflavus EC30*
g – gramas
UFC/mL⁻¹ - Unidade formadoras de colônias por mililitro.
L – litros
mL – mililitros
L⁵⁰ - dose letal
L^{50x10} - dose letal aumentada em dez
OMS - organização mundial de saúde
NaCl - cloreto de sódio
SSE - água salina estéril
UFCg-1 - unidade formadoras de colônias por gramas
DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
cm – centímetros
mm – milímetros
°C - graus Celsius
T – temperatura
h- horas

SUMÁRIO

Resumo	15
Abstract	17
Introdução Geral	19
1.0 Revisão de Literatura	20
1.1 Resistência Bacteriana	20
1.2 Probióticos: Conceito	21
1.3 Uso de Probióticos na Aquicultura	22
1.4 Bactérias Ácido Lácticas (BAL) - Ação na Resposta Imune	24
1.5 Inocuidade de Probióticos - Critérios de Seleção	27
1.6 Verificação da Eficácia dos Probióticos - Técnicas Moleculares	28
1.7 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO INTESTINO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).	37
---	----

RESUMO	38
ABSTRACT	39
1.0 Introdução	40
2.0 Material e Métodos	40
2.1 Animais e Instalações	40
2.2 Isolamento das bactérias ácido lácticas	41
2.3 Teste de Atividade Inibitória	41
2.4 Resistência a Antimicrobianos	42
2.5 Avaliação de sobrevivência e crescimento em Concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl), Diferentes temperaturas (°C), Água salina 0,65% e Ração	42
3.0 Resultados e Discussão	43
3.1 Seleção e Atividade Inibitória	43
3.2 Resistência a Antimicrobianos	45
3.3 Atividade metabólica, resistência a NaCl, T°C e Identificação Molecular	47
3.4 Viabilidade Celular do EC 30 em água salina e ração extrusada	49
4.0 Conclusões	51
REFERÊNCIAS	52

CAPÍTULO 2

ENTEROCOCCUS CASSELI FLAVUS EC30 AGINDO COMO MODULADOR DA MICROBIOTA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>).	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1.0 Introdução	59
2.0 Material e Métodos	59
2.1 Locais de Desenvolvimento do Trabalho	59
2.2 Preparo da dieta	59
2.3 Teste <i>in vivo</i> alimentação com <i>Enterococcus casseliflavus</i> EC30	60
2.4 Desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> após alimentação com EC30	61
2.5 Técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)	61
2.5.1 Amostras e Extração do DNA intestinal	61
2.5.2 Reações de Amplificação	63
2.5.3 Eletroforese	63
2.5.4 Padrões de DGGE	64
2.5.5 Sequenciação das Bandas Obtida nos Géis de DGGE	65
3.0 Resultados e Discussão	65
3.1 Desafio com <i>Aeromona hydrophila</i>	65
3.2 Análise da Microbiota Intestinal de acordo com Geis	68
4.0 Conclusões	69
5.0 Considerações Finais	70
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi selecionar uma bactéria ácido láctica com características probióticas e realizar desafio frente ao patógeno *Aeromonas hydrophila* observando a modulação da microbiota intestinal dos animais alimentados com e sem a inserção da bactéria ácido láctica na alimentação. Foram isoladas 141 cepas do intestino de alevinos de tilápia do Nilo, sendo 55 com características desejadas: Gram positivas, catalase negativa, produtoras de ácido láctico. Frente ao teste de antagonismo com os patógenos *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, apenas oito demonstraram eficiência e destas duas foram capazes de inibir totalmente os quatro patógenos. Foi realizada a identificação em nível de gênero utilizando provas bioquímicas e PCR, todos eram *Enterococcus sp.* O isolado com melhor e maior atividade inibitória teve seu genoma sequenciado e foi identificado como *Enterococcus casseliflavus* EC30. Todos os oito isolados foram testados quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos: ampicilina, tetraciclina, amoxicilina, estreptomicina, eritromicina e gentamicina, não apresentando resistência. Quanto a atividade metabólica, foram semelhantes apresentando crescimento nas temperaturas 4°C, 28°C, 37°C, 45°C e salinidade 0,5%, 4%, 6% e 8%. Para o teste de desafio e mapeamento da microbiota intestinal foram utilizados 120 alevinos de tilápias, divididos em dois grupos e quatro subgrupos. Um grupo foi alimentado com o *Enterococcus casseliflavus* EC30 (10^{-9}) em caldo MRS e outro com ração contendo MRS estéril. Cada grupo continha quatro subgrupos para o desafio *Aeromonas hydrophila* no 21º dia. No mapeamento da microbiota intestinal foram realizadas sete amostragens em dias determinados (0, 3, 6, 9, 15, 24 e 30), onde foram retirados cinco animais de cada tratamento (grupo) e tiveram seus intestinos congelados para posterior análise utilizando a técnica DGGE. O desafio cada grupo continha os seguintes subgrupos: não injetado, injetado com PBS estéril, injetados com dose L50 (10^{-7}) e outro com a dose L50x10 (10^{-8}) do patógeno *A. hydrophila* IOC/FDA. A quantidade da dose injetada foi de acordo com o peso individual de cada animal (g/ μ L). O subgrupo alimentado com EC30 e injetado com a dose L⁵⁰ obteve 50% sobrevivência, no subgrupo que recebeu EC30 que recebeu a dose L^{50x10} a sobrevivência foi de 33% e para os subgrupos não alimentados e alimentados

com EC30 que não foram injetados e os injetados com PBS estéril se observou 100% de sobrevivência, enquanto os subgrupos que não foram alimentados com ração contendo EC30 e receberam as doses letais de *Aeromonas* se observou mortalidade de 100%. As análises utilizando a técnica de DGGE foram observadas uma menor variedade de espécies no dendograma obtido, podendo afirmar que os animais alimentados com o *Enterococcus casseliflavus* EC30 sofreram uma maior modulação da microbiota intestinal quando comparados ao grupo que não foi alimentado com o EC30. Os resultados do presente estudo demonstram que o *Enterococcus casseliflavus* EC30 se aderiu a mucosa intestinal e manteve sua presença no intestino mesmo após os animais não receberem mais a ração, conferindo proteção aos animais quando desafiados com *A. hydrophila* IOC/FDA, influenciando e modulando a microbiota intestinal dos alevinos de tilápia, confirmando assim seu potencial como probiótico para esta espécie nesta fase de vida.

Palavras-chaves: Bactéria ácido láctica, *Enterococcus casseliflavus* EC30, *Aeromonas*, DGGE, Modulação da microbiota Tilápia do Nilo.

ABSTRACT

The objective of the present work was to select a lactic acid bacterium with probiotic characteristics and to challenge the *Aeromonas hydrophila* pathogen by observing the modulation of the intestinal microbiota of the animals fed with and without the insertion of lactic acid bacteria in the diet. A total of 141 strains were isolated from the intestine of Nile tilapia, 55 of which had the following characteristics: Gram positive, catalase negative, lactic acid producers. Faced with the antagonism test with the pathogens *A. hydrophila* IOC / FDA 110-36, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, only eight demonstrated efficiency and these two were able to totally inhibit the four pathogens. Identification at the genus level was performed using biochemical tests and PCR, all were *Enterococcus* sp. The isolate with better and greater inhibitory activity had its genome sequenced and was identified as *Enterococcus casseliflavus* EC30. All eight isolates were tested for antimicrobial susceptibility: ampicillin, tetracycline, amoxicillin, streptomycin, erythromycin and gentamicin, showing no resistance. As for the metabolic activity were similar presenting growth at temperatures 4°C, 28°C, 37°C, 45°C and salinity 0.5%, 4%, 6% and 8%. For the challenge test and mapping of the intestinal microbiota, 120 tilapia fingerlings were used, divided into two groups and four subgroups. One group was fed with *Enterococcus casseliflavus* EC30 (10-9) in MRS broth and another with feed containing sterile MRS. Each group contained four subgroups for the *A. hydrophila* challenge on the 21st day. In the mapping of the intestinal microbiota, seven samples were taken on days (0, 3, 6, 9, 15, 24 and 30), where five animals were removed from each treatment (group) and had their intestines frozen for later analysis using the technique DGGE. The challenge each group contained the following subgroups: uninjected, injected with sterile PBS, injected with dose L50 (10-7) and another with dose L50x10 (10-8) of the pathogen *A. hydrophila* IOC / FDA. The amount of the injected dose was according to the individual weight of each animal (g / μ L). The EC30-fed subgroup and injected with the L50 dose achieved 50% survival; in the EC30 subgroup receiving the L50x10 dose the survival was 33% and for the non-fed and EC30-fed subgroups that were not injected and those injected with PBS was observed to be 100% survival while the subgroups that were not fed feed

containing EC30 and received lethal doses of *Aeromonas* showed a 100% mortality. Analyzes using the DGGE technique showed a smaller variety of species in the obtained dendrogram, being able to affirm that the animals fed *Enterococcus casseliflavus* EC30 suffered a greater modulation of the intestinal microbiota when compared to the group that was not fed the EC30. The results of the present study demonstrate that *Enterococcus casseliflavus* EC30 adhered to the intestinal mucosa and maintained its presence in the intestine even after the animals did not receive the feed, conferring protection to the animals when challenged with *A. hydrophila* IOC / FDA, influencing and modulating the microbiota of tilapia fingerlings, thus confirming its potential as a probiotic for this species at this stage of live.

Keywords: Bacteria Lactic acid, *Enterococcus casseliflavus* EC30, *Aeromonas*, DGGE, Microbiota modulation, Nile Tilapia

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a FAO (2012), o Brasil ocupava a o 14º lugar dentro do grupo dos países de maior produção aquícola, se espera para esta próxima década se coloque entre os dez maiores produtores mundiais e para 2020 ocupe o segundo maior produtor aquícola, sendo a China o primeiro.

Meurrer et al. (2008), afirma que pesquisas no setor aquícola têm avançado, e com o descobrimento de novas tecnologias para produção como os aditivos alimentares e vacinas, diminuem custos e o impacto ambiental. Sendo, o entrave nas primeiras fases de vida das diversas produções, onde se têm grandes perdas. O controle das enfermidades emergentes neste ponto é o desafio a ser controlado (MEURRER et al., 2008).

A busca por alternativas aos antibióticos na aquicultura sem prejuízos ao meio ambiente e sem a possibilidade de resistências bacterianas é a meta atual do setor, o uso de bactérias ácido lácticas (BAL), como probióticos é cada vez mais utilizado e estudado, os quais têm propriedades de ativar respostas do sistema imune e favorecer o equilíbrio do organismo (MERRIFIED et al., 2010).

As BAL são selecionadas do próprio meio de cultivo ou do intestino dos animais, sendo fornecidas diretamente no alimento e/ou meio de cultivo. Em situações de estresse e infecções as BAL agem como uma barreira, impedindo a fixação e proliferação dos agentes patogénicos (JATOBÁ et al. 2011).

Hoje, o uso de algum tipo de aditivo seja probiótico, prebiótico ou simbiótico, são utilizados preventivamente à possíveis situações de desequilíbrio sistêmico dos animais. Melhorando o estado de saúde e desempenho, através de modulações na microbiota intestinal e meio de cultivo (SUZER et al, 2008).

A busca por novos probiótico comerciais e a segurança biológica destes, é de fundamental importância assegurar suas inocuidade e fiabilidade para a saúde animal e humana, tendo como foco principal a sua real eficácia junto as produções animais e humanas. Sendo assim necessário um protocolo universal bem definido para tal.

1.0 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Resistência Bacteriana

Até a década passada o uso de antibióticos como tratamento profilático e terapêutico em diversos sistemas de produção de animais era a estratégia mais utilizada no controle das enfermidades principalmente na piscicultura (MOURIÑO et al., 2008). Devido a imaturidade do sistema imunológico dos animais aquícolas, o seu principal uso se dava nas fases iniciais de produção (ALY et al., 2008).

No intuito de combater as enfermidades, os antibióticos eram utilizados de forma indiscriminada, diretamente nos animais, nas rações e nas águas de produção e cultivo. Com o predomínio do uso de antibiótico nas produções os patógenos indesejáveis sofreram uma seleção, surgindo a resistência bacteriana a estes mesmos antibióticos antes eficazes (GARCIA e MASSAM, 2005).

Butaye et al. (2003) afirmam que as drogas antimicrobianas agem como indutores para expressão de genes bacterianos que codificam mecanismos de resistência a estas mesmas drogas, pois poder de seleção é proporcional ao tempo de exposição das bactérias ao antibiótico. A presença de genes de resistência se dá pela seleção de uma população de microrganismos resistentes, como consequência da pressão exercida pelo uso de fármacos antimicrobianos (AUSTIN e AUSTIN, 2007).

Um dos efeitos dos antimicrobianos no meio ambiente é a proliferação das bactérias resistentes após a morte das não resistentes. Existe a transferência de genes de resistência a outras bactérias nunca expostas a estas drogas (VINE et al., 2004).

Efeitos adversos associados com o uso de antibióticos na aquicultura são notórios. O desenvolvimento e a disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos como *Aeromonas spp.*, *E. tarda*, *Escherichia coli*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. Cholerae*, esta bem documentado (RADU et al., 2003), e segundo a OMS (2004) a ocorrência de resíduos de antibióticos em produtos de saúde humana é uma ameaça aquicultura.

Levando em consideração o aumento do risco de surgimento de doenças em pisciculturas intensivas, as bactérias do gênero *Aeromonas spp.* assumiram nos últimos anos grande importância nos diagnósticos de doenças de peixes, muitas vezes,

aparecendo como agentes primários causadores de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (SUZER et al., 2008), acarretando perdas na produção e na qualidade do pescado (RADU et al., 2003).

Algumas espécies de *Aeromonas* são associadas a doenças em seres humanos, e classificadas pela OMS (2004) como patógenos veiculados pela água e por alimentos contaminados, de interesse emergente à saúde pública (MARTINS et al., 2002).

Isolamentos de *Aeromonas* foram realizados a partir de vários alimentos, como por exemplo, leite e derivados, carcaças de frangos, vegetais e pescado (GRAN et al., 2003.)

Na China, em enfermidades de peixes estão envolvidas bactérias patogênicas como *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Vivrio harveyi*, *Photobacterium damsela piscicida*, etc (KRUMMENAUER et al., 2009).

O gênero *Enterococcus sp.* tem assumido notoriedade como agente etiológico de infecções nosocomiais, tais como infecções do trato urinário e endocardite, o que é relacionado à multirresistência a antimicrobianos (BASANTA et al, 2008).

No entanto, o Mello et al. (2016) salientam que não somente os antimicrobianos selecionam microrganismos resistentes, mas também os metais pesados como cobre. Segundo Costa (2010) a co-resistência é a presença de genes de resistência a antimicrobianos e a metais no mesmo elemento genético móvel.

É preocupante o potencial de contaminação dos metais, pois eles podem propiciar a manutenção de genes de resistência a antibióticos tanto em ambientes naturais quanto clínicos (BOONTHAI et al., 2011).

1.2 Probióticos: Conceito

A palavra probiótico tem origem grega, significa “a favor da vida” (CYRYNO et al., 2010). No passado definiram probióticos como substâncias secretadas por protozoários que estimulariam o crescimento de outros microrganismos (LILLY e STILLWELL, 1965).

Atualmente o conceito de probióticos mais utilizado é o definido há 25 anos por Parker (1974), colocando estes como suplementos alimentares e inclusive

microrganismos, que acrescentados a alimentos e rações alterariam o equilíbrio da microbiota intestinal dos animais.

Partindo deste conceito, Fuller (1989) concluiu: “probióticos são bactérias vivas e quando suplementadas aos alimentos, favorecem o equilíbrio da microbiota intestinal de um “hospedeiro”, causando efeitos benéficos a este”. Já Gatesoupe (1994, 1999) propôs que os probióticos são células microbianas e, quando administradas a animais, colonizariam o trato gastrintestinal, permanecendo viáveis melhorando a sua saúde.

Verschuere et al. (2000) afirmaram que os probióticos exercem efeito sobre os microrganismos presentes no ambiente aquático e Mattar et al. (2001) acrescentam que os probióticos podem melhorar ou prevenir doenças.

A melhor definição hoje, a nível internacional, é que os probióticos são microrganismos vivos, e quando administrados em quantidades adequadas, tem o poder de beneficiar à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003). Estes benefícios são decorrentes da inibição da proliferação de agentes prejudiciais ao epitélio de revestimento da mucosa intestinal, tendo muitas vezes a ação de promotor de crescimentos, melhorando o desempenho zootécnico, graças à melhor digestibilidade e absorção de nutrientes (NAYAK, 2010).

O uso de probióticos na aquicultura se iniciou na China em 1980, em seguida nos EUA, Japão e Reino Unido e ganharam forma comercial, sendo que os primeiros testes em animais vivos se deram na China em 1990. Desde então novas cepas probióticas foram triadas e seus diferentes modos de ação e administração estudados. No início do século, se propôs o implante de bactérias ácido lácticas no intestino de humanos, para suprimir outros microrganismos (TANNOCK, 1997).

Com a popularidade dos probióticos na aquicultura, surgiu a preocupação com o controle de qualidade destes produtos. Dados sobre a eficácia dos probióticos na aquicultura comercial apesar de se ter muitas pesquisas, ainda são imprecisos, nem sempre conclusivos e escassos (FAO, 2012).

1.3 Uso de probióticos na aquicultura

O crescimento do uso de probióticos na aquicultura se deu nos últimos 10 anos, de forma exponencial. Hoje mais de uma centena de empresas produzem diferentes tipos

de probióticos para a aquicultura e sua comercialização supera 50.000 toneladas só de uso nesta atividade (WANG e WANG, 2008).

Os primeiros ensaios realizados em aquicultura com probióticos comerciais foram isolados a partir da microbiota de animais terrestres. Os esporos de *Bacillus toyoi*, isolado do solo, reduziu a mortalidade da enguia infectada com o patógeno *Edwardsiella sp.* (KOZASA, 1986).

Microrganismos, como *Vibrio sp.* e *Aeromonas sp.*, se tornaram os patogênicos mais utilizados em estudos de desafios em peixes e outros organismos aquáticos. As *Pseudomonas* tem estado envolvida em surtos na aquicultura e as bactérias eleitas para o controle deste patógeno têm sido as bactérias ácido lácticas, conhecidas como BAL (GATESOUBE, 2008).

Vários autores demonstram em pesquisas os efeitos benéficos dos probióticos, como diminuição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos, melhoras no desempenho zootécnico e maior sobrevivência, utilizando a inoculação artificial de patógenos específicos (GILDBERD et al., 1997, JATOBÁ et al., 2008).

Muitos autores ressaltam que os animais quando mantidos em boas condições de manejo (nutricionais e sanitárias), muitas vezes, não é possível verificar os efeitos da inclusão do probiótico sobre o desempenho e sobrevivência (LIMA et al., 2003, MERRIFIEDL et al., 2010), visto que, nessas situações a possibilidade de contato dos animais com microrganismos patogênicos é menor, o que pode até não haver efeito da inclusão de probióticos nas rações sobre o desempenho animal (GARCIA-ULLOA, 2003).

Os probióticos são usados na piscicultura adicionado-se as células microbianas nos tanques de larvicultura e alevinagem, com a finalidade de modificar a composição da microbiota ambiental, controlando a presença de patógenos na água. Estas células também são adicionadas nas rações fornecidas aos peixes, diretamente na indústria e/ou na hora de fornecer o alimento, objetivando a modulação da microbiota intestinal, através do mecanismo de exclusão competitiva contra um dos principais agentes envolvidos nas enfermidades aquícolas, as bactérias patogênicas (IRIANTO e AUSTIN, 2002; COPPOLA et al., 2004; WANG et al., 2007a; LAN et al., 2008).

Outra grande preocupação na aquicultura, ao lidar com os problemas ambientais, diz respeito aos "resíduos orgânicos" e "poluentes", resultados da incorporação de

"biorremediação" e "controle biológico". Os probióticos também entram neste campo de ação na sua definição ampla, estes também tem sido utilizado, associados e/ou combinados com prebióticos, que são os simbióticos, ditos microecologicos (WANG e WANG, 2008).

Um grande uso dos probióticos na piscicultura, tem sido nas primeiras fases de vida, período crítico, onde ocorre muita morbidade e/ou mortalidade. Outra é em situações de grande estresse como o manuseio e transporte dos animais. A atividade imunomodulatória da microbiota intestinal nestas fases de vida ou outras situações conferem uma barreira contra aberrações imunorregulatórias as quais podem acarretar em patologias.

1.4 Bactérias ácido lácticas (BAL) - ação na resposta imune

Hoje a maioria dos probióticos proposto como biocontroladores e agentes de biorremediação para aquicultura, pertencem ao grupo BAL (principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Carnobacterium*, aos gêneros *Vibrio*, *Bacillus* e *Pseudomonas* ou à espécie *Saccharomyces cerevisiae*) (VERSCHUERE et al., 2000; GATESOUBE et al., 2008).

Foi observado que os probióticos têm ação direta no trato digestivo, influenciando favoravelmente a quantidade, a biodisponibilidade e a digestibilidade de alguns nutrientes da dieta. Como concentrações de determinados nutrientes e vitaminas do complexo B, que aumentam devido ao processo de fermentação realizado pelas BAL, liberando diversas enzimas no lúmen intestinal que exercem efeitos sinérgicos sobre a digestão e minimizam as deficiências de absorção de diversos nutrientes (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Os benefícios dos probióticos na microbiota intestinal dos animais está associado a efeitos antagônicos, competição por sítios e ativação do sistema imunológico, resultando em uma melhor resposta do sistema imune contra patógenos. Os probióticos estimulam a multiplicação de outras bactérias benéficas inibindo a proliferação de bactérias com potencial patogênico (VERSCHUERE et al., 2000a; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

Relata-se que as bactérias ácido láticas podem aumentar concentrações de determinados nutrientes, como as vitaminas do complexo B e ainda liberar diversas enzimas no lúmen intestinal, que agem como sinérgicos sobre a digestão dos alimentos, minimizando os sintomas relativos à deficiências e absorção dos nutrientes (KOPP-HOOLIHAN, 2001). As enzimas liberadas pelas bactérias têm ação hidrolisante, levando a um aumento da biodisponibilidade de proteínas e gorduras, liberando, assim, uma maior quantidade de aminoácidos (NAVARRETE e TOVAR-RAMÍREZ, 2014).

Essas bactérias são produtoras de ácido-lático, os quais são ácidos graxos de cadeia curta, como propiônico e butírico, que ao serem absorvidos geram um pool de energia no hospedeiro. Podem ainda proteger a mucosa do cólon contra mudanças patológicas, pois uma elevada quantidade de ácidos graxos de cadeia curta, mantém o pH no lúmen do cólon apropriado para a expressão de algumas enzimas bacterianas, frente a compostos estranhos ao metabolismo, como os carcinogênicos intestinais (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Logo, bactérias probióticas produtoras de ácido butírico, têm o poder de neutralizar a atividade carcinogênicas de compostos da dieta, como é o caso das nitrosaminas, produzidas por bactérias comensais em animais que têm a dieta com altos teores de proteínas, como alguns peixes carnívoros (WOLLOWSKI et al., 2001).

Uma das características mais estudada dos probióticos, e com efeito promissor eficaz, é a resistência que eles conferem contra patógenos. As culturas probióticas, quando empregadas na alimentação, têm a ação de exclusão sobre os microrganismos patogênicos, reforçando as defesas naturais do hospedeiro (KAUR et al., 2002). O mecanismo que entra em ação para tal resposta de defesa do hospedeiro é denominado de “exclusão competitiva”, no qual o probiótico atua modulando a microbiota intestinal, em que patógenos são impedidos de colonizar a mucosa intestinal devido à competição por sítios de adesão, nutrientes e/ou compostos antimicrobianos (GUARNER e MALAGELADA, 2003). Ácidos graxos de cadeia curta e polihidroxicanoatos inibem do crescimento do patógeno através da replicação dos genes de virulência (*quorum sensing* interrupção) (DEFOIRD et al., 2011).

Os probióticos são produtores de bacteriocinas, compostos antimicrobianos, os quais impedem a multiplicação de outros microrganismos sensíveis a estas bacteriocinas, disponibilizando assim sítios e nutrientes (DESRIAC et al., 2010).

A microbiota intestinal pode ser alterada de maneira drástica devido a alguns fatores como o estresse, uso de rações com má qualidade e tratamentos com químicos e/ou antibióticos. Nestas situações, os probióticos entram como uma terapia, atuando na correção e multiplicação da microbiota autóctone que se encontra em desequilíbrio. Variações na dieta e estresse causados por manejo, transporte, alterações de temperatura, pH da água e sua qualidade, influenciam o metabolismo das bactérias intestinais (ISOLAURI et al., 2004 LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2011).

Estudos têm demonstrado o poder de degradação de compostos carcinogênicos pelos probióticos ligados a algumas atividades metabólicas. Estas modificações do metabolismo microbiano pelos probióticos se dão principalmente devido as mudanças na atividade enzimática, produzida pelas bactérias ácidas lácticas no intestino (O'SHEA et al., 2012).

Muitos estudos têm focado no efeito dos probióticos sobre a resposta imune. Muitas das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos estimulam tanto a resposta imune não-específica quanto específica. Acredita-se que isto ocorra devido a uma ativação dos macrófagos, devido ao aumento dos níveis de citocinas, por causa do aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - "*natural killer*") e/ou dos níveis de imunoglobulinas (MUÑOZ-ATIENZA et al., 2013).

Destaca-se o fato de que os probióticos têm uma ação benfeitora sobre o sistema imune, todas estas respostas ocorrem sem o início de uma resposta inflamatória a qual seria prejudicial para o hospedeiro. Por outro lado, nem sempre todas as bactérias lácticas têm eficácia, quando a desencadear uma resposta imune acentuada, a atuação de probióticos ingeridos juntos pode atuar de maneira sinérgica, isto foi verificado com os *Lactobacillus* administrados em conjunto com o *Bifidobacterium* (VAN DE WATER, 2003).

Muitos pesquisadores têm focado em estudos para conhecer com maior precisão as propriedades dos microrganismos que tem ação de probiótico. Como se dá a aderência e colonização no intestino dos hospedeiros, os fatores pelos quais se dá a atividade

imunomodulatória, quais as propriedades específicas são requeridas para aderência e quanto ao fator da colonização, como se inicia, o que sugere uma ligação com o amadurecimento da imunidade humoral. Outras ações são a absorção de nutrientes ingeridos, alterações nestas quantidades, bem como a biodisponibilidade e digestibilidade pelo hospedeiro (MERRIFIELD et al., 2010; O'SHEA et al., 2012; MUÑOZ-ATIENZA et al., 2013).

Algumas destas bactérias são as fotossintéticas (PBS), bactérias antagonistas (*Flavobacterium sp.*, *Alteromonas sp.*, *Phaeobacter sp.*, *Bacillus sp.*, etc), microrganismos que contribuem para a nutrição e digestão enzimática (bactérias ácido láctico, leveduras, etc), temos ainda as bactérias que atuam melhorando a qualidade da água (nitrificantes, desnitrificantes, etc.), *Bdellovibrio* e outros probióticos, a combinação de vários probióticos (microecológicos), têm sido bem aceita e demonstra bons resultados (WANG e WANG, 2008).

O uso destas bactérias hoje é feito como probiótico no cultivo de peixes e moluscos, esta é comercializada de forma concentrada e encapsulada, podendo ser uma única espécie ou várias, combinadas com promotores de crescimento ou condicionadores (WANG et al., 1994).

Após a proibição de muitos antibióticos, é notável o rápido crescimento do uso de probióticos na aquicultura, alguns probióticos foram liberados para uso como alimento na aquicultura, entretanto muitos probióticos comerciais são descritas várias cepas. Muitas vezes, a quantidade de cepas nos produtos é maior do que o permitido pela legislação específica de cada país e têm países que ainda não definiram suas legislações para a utilização de probióticos permitidos, bem como, suas combinações e quantidades combinados e para uso (FERREIRA, 2012).

1. 5 Inocuidade dos probióticos - critérios de seleção

Crítérios que definam a segurança dos probióticos para uso na aquicultura é inevitável e urgente. Existem fatores que avaliam a segurança dos probióticos para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, são estes: patogenicidade, infecciosidade, toxicidade, atividade metabólica, e propriedades intrínsecas dos microrganismos (ISOULARI et al., 2004), probióticos comerciais produzidos em outros países, como é o

caso do Brasil introduzem microrganismos exóticos, o que aumenta o perigo em relação a eles, possibilitando a transferência de genes ligados a fatores de resistência aos antibióticos, ocupação de “nichos” e alterações microbianas alimentares (HU et al., 2006; POLLETO, 2015).

Portanto, para que um microrganismo seja definido como probiótico na prática, algumas propostas de critérios rigorosos foram determinadas. Huff et al. (2004), por exemplo, propôs os seguintes parâmetros na seleção de um probiótico: total segurança para o anfitrião, resistência a acidez gástrica e secreções pancreáticas, aderência às células epiteliais, atividade antimicrobiana, inibição de aderência das bactérias patogênicas, avaliação de resistência a antibióticos, tolerância para os aditivos alimentares e estabilidade na matriz alimentar.

Para a produção de um probiótico comercial é necessário ter atenção durante o processo industrial, a fim de que não ocorra à inativação dos microrganismos. Para isto, a indústria tenta selecionar as cepas de maior resistência e faz uso de processos de bioencapsulação (NAVARRETE, e TOVAR-RAMÍREZ, 2014).

1.6 Verificação da Eficácia dos Probióticos - Técnicas Moleculares

O modo de ação dos probióticos deve ser avaliado e monitorado, bem como sua interação com a microbiota já existente. Sendo assim, as técnicas moleculares para sequenciamento de genes, oligonucleotídeos, produção e liberação de enzimas, verificação da disponibilização de vitaminas etc. são uma ferramenta importante no auxílio dos parâmetros do controle de qualidade de um probiótico ou um composto probiótico (DIMITROGLOU et al., 2016). A biologia molecular, para avaliação de probióticos comerciais, é um método sensível e confiável para identificar e caracterizar os microrganismos probióticos (DESRIAC et al., 2010).

Antigamente a caracterização fenotípica limitava a ciência devido à dependência do crescimento microbiano. Suas características, perfis bioquímicos e sorológicos foram e ainda são utilizados, no entanto são imprecisos, levando a erros e/ou dificuldades para identificar determinada espécie. As técnicas moleculares, utilizando marcadores genéticos, têm sido úteis para determinar as subespécies ou diferenciação de espécies (FERREIRA et al., 2012).

Atualmente, o uso da PCR e DGGE é muito utilizado devido a sua rapidez e precisão (HU e YANG, 2006). Essas técnicas permitem a análise de produtos probióticos, avaliação das alterações na composição relacionadas com a vida de prateleira destes produtos e investigações dos probióticos específicos em culturas (MUNÑOS-ALTIENZA et al., 2013). As pesquisas com relação aos probióticos conhecidos e os ainda a serem descobertos, bem como, modo de ação nos animais e diferentes espécies, quantidades indicadas, etc., ainda necessita ser bem documentada (FERREIRA et al., 2012).

Com o auxílio das técnicas moleculares, acredita-se que logo as lacunas existentes (no modo de ação, na resposta dos probióticos, na inocuidade das cepas, nas possíveis mutações etc.) serão sanadas, embora, ainda existam muitas dúvidas e perguntas sem respostas (NAYAK et al., 2012; MELLO et al., 2013).

É preciso que as pesquisas com cepas de probióticos utilizados em produções e laboratórios sejam melhor investigadas. Alguns probiótico têm sido desenvolvidos contendo aderências ou propriedades específicas de colonização, e produção de produtos antimicrobianos ou ação sinérgica, podendo representar um possível risco ambiental se usados de forma indiscriminada na indústria aquícola. É necessário se chegar a melhores avaliações do uso dos probióticos antes da sua aplicação maciça na aquicultura (MERRIFIELD et al., 2010).

De acordo com Vieira et al., (2013), um probiótico pode ter comportamento diferente a depender do organismo (peixe, crustáceos, bivalves), da área de aplicação (biofilme intestinal, água, sedimentos) e das condições de cultivo (extensivos, intensivos, sistemas de recirculação). O que sugere que o progresso das pesquisas com probiótico podem se direcionar para obter uma compreensão mais precisa da ecologia dos probióticos no que se deseja alcançar, doses e efeitos sobre os hospedeiros em cada fase como cultivo e alimento fornecido, especificação dos mecanismos de adesão e colonização e ainda a forma de ativação do sistema imunitário, bem como, o efeito sobre o ambiente nas condições de cultivo em larga escala (BASANTA et al., 2008).

1.7 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A espécie de peixe tilápia do Nilo têm forte impacto na produção mundial por ser o segundo peixe mais produzido e consumido no mundo, sendo a carpa o primeiro. A

espécie têm grande destaque nas piscicultura devido a característica desejáveis para uma produção animal como: rápido crescimento, grande rusticidade, alta adaptabilidade a temperaturas e salinidade (THASHIBANA et al., 2015).

Sendo bastante apreciada pelo mercado consumidor, devido a não possuir espinhas em “y” uma carne de sabor suave, branca e firme (HIL DSORF, 1995). Por ser um peixe de hábito alimentar onívoro, têm um ponto forte quando se trata de custo de alimentação devido a sua eficiência para a utilização dos carboidratos, baixando assim oscustos de produção (MEURRER et al., 2012, CARVALHO et al., 2014, GUERRA et al., 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, S.M.; Abd-El-RAHMAN, A.M.; JOHN, G.; MOHAMED, M.F. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. **Aquaculture**, v. 277, n. 1-2, p. 1 – 6, 2008.

AUSTIN, B. and AUSTIN, D. **Bacterial fish pathogens**: diseases of farmed and wild fish. Chichester, UK. Springer, 2007. 594p.

BASANTA, A.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ-SALA, B.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P.E.; CINTAS, L.M. Antimicrobial activity of Enterococcus faecium L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 293–307, 2008

BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V; NIMRAT, S. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture nutrition**, v.17, n.6, p.634-644, 2011.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, p.205-210, 2003.

COPPOLA, M.M. ; CONCEIÇÃO, F.R. ; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, v. 16, p. 2013-2019, 2004.

COSTA, S.W.; VICENTE, L.R.M.; SOUZA, T.M.; ANDREATTA, E.R.; MARQUES, M.R.F. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.12, p.1521-1530, dez. 2010.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y. ; BORGHESI, R.; DAIRIK, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente correto sem piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.68-87, 2010.

DEFOIRDT, T; SORGELOOS, P; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current opinion in microbiology**. 2011.

DESRIAC, FLORIE ET AL. Bacteriocinas weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. **Marine drugs**, v. 8, p. 1153-77. 2010.

DESRIAC, FLORIE ET AL. Bacteriocinas weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. In: **Marine drugs**, v. 8, p. 1153-77. 2010.

FAO - **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. O estado mundial da pesca e da aquicultura. Roma, 250p, 2012.

FAO - **Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura**. O estado mundial da pesca e da aquicultura. Roma, 2012. 250p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The state of world fisheries and aquaculture, Rome, Italia, 2013 **Disponível em** <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>. Acesso em 22 de agosto de 2016.

FERREIRA, A. H. C.; ARARIPE, M. B. N. A.; MONTEIRO, C. A. B.; LOPES, J. B.; ARARIPE, H. G. A. Use of Probiotics in Aquaculture. **Revista Eletrônica**, v. 9, p. 1965-1980, Set/ Out 2012.

FULLER, R. Probiotics in man and animals, a review. **Journal of Applied Bacteriology**, 66:365–378, 1989.

GARCIA, A.F. and MASSAM, J.P. Elimination of antibiotics in hatcheries while improving production levels by use of probiotics. **Journal of World Aquaculture Society**, v.36, p.57-60, 2005.

GARCIA-ULLOA, M. Aditivos nutricionales: probióticos. **Panorama acuícola**, v. 8, p. 38, 2003.

GATESOUBE, F. J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 107-114, 2008.

GATESOUBE, F.J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus (L.)*, against pathogenic vibrio. **Aquatic Living Resources**, v.7, p. 277-282, 1994.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147-165, 1999.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E. Probiotic effect of latic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). **Hydrobiology**, v. 352, p. 279-285, 1997.

GRAN, H. M.; WETLESEN, A.; MUTUKUMIRA, A. N.; RUKURE, G.; NARVHUS, J. A. Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. **Food Control**, v.14, p.539-544, 2003.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.360, p.512-518, 2003.

Hu, K.; Yang, X.L. Current progress of microbial ecological agents in aquaculture in China **Fishes Modern**, v. 6, p. 36–38, 2006.

HUFF, B.A.; EMPTOR, C. "Probiotics" might not be what they seem. **Canadian Family Physician**, v. 50, p. 583-587, 2004.

IRIANTO, A.; B. AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p. 333-342, 2002.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. Best Practic&Research: **Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.299-313, 2004

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinalde tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, 43: 1201-1207, 2008.

JATOBÁ, A; VIEIRA, FN; BUGLIONE-NETO, CC; MOURIÑO, JLP; SILVA, BC; SEIFTER, WQ; ANDREATTA, RE. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology and Biochemistry**, 37:725-732, 2011.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Europe Jounal Pharmacy Science**, v.15, p.1-9, 2002.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Jounal American Dietetic Association**, Chicago, v.101, p.229-241, 2001.

KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiology Aliments Nutrition**, n.4, p.121-135, 1986.

KRUMMENAUER D, ABREU PC, LARA G, POERSCH L, ENCARNACAO P, WASIELESKY JR W. The Effect of Probiotic in *Litopenaeus vannamei* Biofloc Technology Culture System contaminated with *Vibrio parahaemolyticus*. **Abstract World Aquaculture Conference**, Mexico, 2009.

LAN, J.; ZHANG, X-H.; WANG, Y.; CHEN, J.; HAN, Y. Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gyrB* gene. **Journal Applied Microbiology**. 2008.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

LIMA, A.C.F.; PIZAURO JÚNIOR, J.M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E.B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.200-207, 2003.

MARTINS, L. M.; MARQUEZ, R. F.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.32, p.237-242, 2002.

MATTAR, A.F.; DRONGOWSKI, R.A.; CORAN, A.G.; HARMON, C.M. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery Intitute**, v.17, p.265-268, 2001.

MELLO, H; MORAES, JRE; NIZA, IG; MORAES, FR; OZÓRIO, ROQ; SHIMADA, MT, ENGRACIA FILHO, JR; CLAUDIANO, GS. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2013;33(6):724-730. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>. Acesso em 20 de agosto de 2016.

MERRIFIELD, D L; DIMITROGLOU, A; FOEY, A; DAVIES, S.J; BAKER, RTM; BOGWALG, J; CASTEX, M; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, 2010;302:1-18. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>. Acesso em 2 de agosto de 2016.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BARBERO, L.M.; SANTOS, L.D.; BOMBARDELLI, R.A.; COLPINI, L.M.S.. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p.791-794, 2008.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L.. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1201-1207, 2008.

MUÑOZ-ATIENZA, E.; GÓMEZ-SALA, E.; ARAÚJO, C.; CAMPANERO, C.; CAMPO, R. DEL; HERNÁNDEZ, P. E.; HERRANZ, C.; CINTAS, L. M. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. **BMC Microbiology**, p. 13-15, 2013.

NAVARRETE, P. E.; TOVAR-RAMÍREZ, D. Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. Sustainable Aquaculture Techniques, cap.5, p.125 – 176. **Inthec Open Science**, 2014.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 1553-1573, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for drinking water quality**. Geneva, 2004. Disponível: <http://www.who.int/docstore/watersanitation_health/GDWQ/Updating/draftguidel/draftchap7.htm>. Acesso em: 27 maio 2010.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 189-205, 2012.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, n.29, p.4-8, 1974.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.261-266, 2003.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v.61, p.91-99, 2003.

SUZER, C; ÇOBAN, D; KAMACI, HO; SAKA, S; FIRAT, K; OTGUCUOĞLU, O; KÜÇÜKSARI, H. Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, 2008;280:140–145.

TANNOCK, G.W. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: Mackie, R.I., Withe, B.A., Isaacson, R.E. (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*, pp. 434–465. Chapman and Hall Microbiology Series, **International Thomson Publishing**, New York, 1997.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods*. p.113-144. Boca Raton: **CRC Press**, 2003.

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

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

VIEIRIA, FN; PEDROTTI, FS; BUGLIONE, CC; MOURIÑO, JLP BELTRAME, E; MARTINS, ML; RAMIRES, C; VINATEA, LA. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Brazilian Journal of Oceanography**, 2007;55(4):251-255. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-87592007000400002>.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v.27, p.319-326, 2004.

WANG, X.; SUN, Z.; LIU, X.; MA, J.; WANG, B.; SONG, X.; ZHU, Z.; SHI, J.; WANG, F. Application of photosynthetic bacteria in scallop artificial seed breeding. **Journal Fish China**, v. 18, p. 65–68, 1994.

WANG, Y. M.; WANG, Y. Z. Advance in the mechanisms and application of microecologies in aquaculture. **Programe Veterinary Medicin**, v. 29, p. 72–75, 2008.

WANG, Y.; HAN, Y. LI, J. CHEN, X.-H. ZHANG. Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) in China. **Acta Microbiology Science**, v.47, p. 763–768, 2007

WOLLOWSKI, L.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal Clinic Nutrition**, v.73, p.451-455, 2001.

CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO INTESTINO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi selecionar uma bactéria ácido láctica com características probióticas para verificar seu potencial como probiótico. Foram isoladas 141 cepas do intestino de alevinos de tilápia do Nilo destas, 55 apresentaram características: Gram positivas, catalase negativa, produtoras de ácido láctico. Frente ao teste de antagonismo com os patógenos *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, oito demonstraram eficiência e duas foram capazes de inibir totalmente os quatro patógenos. Foi realizada identificação em nível de gênero utilizando provas bioquímicas e PCR, foi feita a identificação como *Enterococcus sp.* Todos os oito isolados foram testados quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos: ampicilina, tetraciclina, amoxicilina, estreptomicina, eritromicina e gentamicina, não apresentando resistência. Quanto a atividade metabólica foram semelhantes apresentando crescimento nas temperaturas 4°C, 28°C, 37°C, 45°C e salinidade 0,5%, 4%, 6% e 8%. O isolado com melhor e maior atividade inibitória teve seu genoma sequenciado foi identificado como *Enterococcus casseliflavus* EC30. Os resultados do presente estudo demonstram que o EC30 mesmo sendo uma nova cepa, a qual ainda não se haviam relatos, demonstrou *in vitro* ser um possível probiótico do grupo BAL.

Palavras-chaves: Probiótico, Bactéria ácido láctica, *Enterococcus casseliflavus* EC30, Tiláia do Nilo.

ABSTRACT

The objective of this work was select them bacteria lactic probiotic with features to verify its potential as probiotics. Be isolated 141 strains of the gut of the tilapia of the Nile these, 55 had characteristics: Gram positive, catalase negative, producers of acid lactic. test of antagonism front with the pathogen *Aeromonas hydrophila* IOC / FDA 110-36, *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, eight demonstrated efficiency and two were able to completely inhibit the four pathogens. The identification was carried out at the level of gender through biochemical tests and PCR, identification was as *Enterococcus* sp. All eight strains were tested to determine susceptibility to the antibiotics ampicillin, tetracycline, amoxicillin, streptomycin, gentamicin and erythromycin, which shows no resistance. The activity metabolic was similar in the presentation of temperatures of growth 4 ° C, 28 ° C, 37 ° C, 45 ° C and the salinity of the 0.5%, 4%, 6% and 8%. Insulated with the best and greatest activity inhibitory had its genome sequenced was identified as *Enterococcus casseliflavus* EC30. The results of this study show that the EC30 is still a new strain, which still had not reported, it has been shown in vitro that be a possible group of probiotics BAL.

Keywords: Probiotic, Bacteria Lactic acid, *Enterococcus casseliflavus* EC30, Nile Tilapia.

1.0 Introdução

Uma das atividades com grande êxito no Brasil têm sido a piscicultura, dentro deste cultivo temos a produção de destaca-se a Tilápia do Nilo. No entanto, a baixa qualidade e pouca quantidade de larvas e alevinos de qualidade no mercado restringe a tilapicultura (JATOBÁ et al., 2015).

A maior parte das enfermidades em piscicultura é causada por agentes infecciosos, tornando a atividades pouco lucrativa (S. GASTALHO et al. 2014). Com a proibição do uso de grande parte dos antibióticos devido a resistência bacteriana e impactos ambientais, a industria, produtores e pesquisadores, cada vez mais investem nos aditivos como é o caso do probióticos (TAVECHIO et al., 2009).

Com o intuito de melhorar a competência imunológica destes animais, um aliado têm sido o uso de probióticos, garantindo a sanidade dos alevinos, aumentando a vilosidade celular no epitélio intestinal, entre estes temos a bactérias ácido lácticas (BAL) devido a sua grande capacidade de inibir o crescimento de bactérias patogênicas através de sua sua ação imunoestimulante com a produção de compostos antibacterianos como: ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, reuterina e bacteriocinas (ALY et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar bactérias ácido lácticas do trato intestinal de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para avaliar seu potencial *in vitro* como probiótico.

2.0 Material e Métodos

2.1 Animais e Instalações

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco - Univasf, a uma altitude de 390 metros, tendo como coordenadas geográficas latitude de -9.3238324 e longitude de -40.5492389. Para o isolamento foram utilizados 40 peixes com 60 dias de vida (juvenil), livre de enfermidades, produzidos na Codevasf – Bebedouro Petrolina-Pernambuco.

Os animais foram mantidos em um tanque de 1000 L no laboratório por uma semana após este período passaram por jejum de 24 h para esvaziamento intestinal e submetidos a anestesia por meio de imersão em solução de Benzocaína 10mg/L, foi

realizada aferição dos parâmetros de peso inicial ($5,29 \pm 1,2$), e comprimento total ($7,00 \pm 1,20$).

A eutanásia foi realizada por meio de secção medular (NIFFER e STAMPER, 2009), higienizados externamente com álcool a 70%, e tiveram intestinos dissecados e retirados de forma asséptica.

2.2 Isolamento das bactérias ácido lácticas

As amostras de intestinos foram pesada ($1,3 \pm 0,7g$), dividida em três porções e incubadas em caldo Trypticase de Soja (TSB) e incubadas a $37^{\circ}C/ 24h$. Retirou-se alíquotas de 1 mL para semeadura por esgotamentos em placas de Petri contendo ágar Man Rogosa Sharpe (MRS), estas foram incubadas $37^{\circ}C/ 24$ horas em cuba anaeróbia com 5% de O_2 (BALCÁZAR et al, 2008). Para a caracterização inicial, as culturas já puras (técnica repicagens em placas de ágar MRS por esgotamento), foram avaliadas quanto à morfologia celular, coloração de Gram e teste de catalase (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). Os isolados que apresentaram características de coco ou bacilos Gram-positivos, catalase negativa. Os isolados selecionados foram mantidos em criotubos a $- 80^{\circ}C$.

2.3 Teste de Atividade Inibitória

O método utilizados foi o de “bloco de gelose” (STERN, 2006), frente aos seguintes patógenos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e o *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, os quais foram obtidos da FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, a partir da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária- CMRVS, da cidade de Recife - PE.

Cada isolados foi reativados em 5 mL caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco) estéril e incubados $37^{\circ}C$ por 24 h, adaptado (NCCLS, 2003). A partir do cultivo puro em caldo MRS, se ressuspendeu em água salina estéril 0,65% (SSE), de acordo com a escala MacFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Cada suspensão foi semeados em placa de Petri com o meio de cultura ágar MRS e incubou-se por 24 h a $37^{\circ}C$.

Foram cortados discos de ágar de 6 mm impregnados com os isolados ácido lácticos. Estes discos invertidos em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton,

semeados com suspensões dos patógenos e incubados da seguinte forma: aeromonas 48h/28°C, pseudomonas e víbrios 48h/37°C, as placas com víbrios foram adicionado de 2% Cloreto de sódio (NaCl) para crescimento ótimo. O teste foi realizado em triplicata, sendo um disco limpo de MH o controle negativo. Os halo de lise bacteriana foram mensuradas em mm com paquímetro, áreas claras ao redor dos discos impregnados foram consideradas a ação inibitória.

2. 4 Resistência a Antimicrobianos

Para realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos, foi realizada a técnica de difusão da droga em discos (KIRBY e BAUER, 1966). Os isolados foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Triptona Soya Ágar e inoculados 37°C/48h..

A massa bacteriana crescida foi transferida para tubos contendo 5,0 mL de SSE 0,65% para obter uma suspensão de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) e inoculados em ágar MRS em seguida foram invertidos discos impregnados com antimicrobianos: Ampicilina (10g), Tetraciclina (30g), Amoxiciclina (10mg), Estreptomicina (30g), Eritromicina (15g), e Gentamicina (10g), incubou-se por 37°C/24h, como controle foi utilizada *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36. Para medir os diâmetros dos halos de inibição se utilizou paquímetro digital, os resultados foram classificados qualitativamente. Sendo descritos como: sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos utilizados no teste (CHARTERIS et al., 1998b).

2.5 Avaliação de sobrevivência e crescimento em Concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl), Diferentes temperaturas (°C), Água salina 0,65% e Ração

Somente os isolados Gram-positivos, catalase negativa, com ação inibitória e resistentes a antimicrobianos foram selecionados para estes testes.

Os isolados puros foram reativados em placas de petri contendo ágar TSA, e incubados 37 °C/24 h, a massa bacteriana obtida foi ressuspensa e ajustada com ajuda do espectrofotômetro a 600nm, a uma concentração DO = 1, ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), para todos os testes.

Foram realizadas microdiluições seriadas 0,1 mL (10^{-1} ;... 10^{-8}) utilizando microtubos contendo 0,9 mL PBS estéril, cada diluição foi realizada em 3 repetições,

com 0,01 mL ou 10 µL/gota. As temperaturas de incubação foram 4°C, 10°C, 22°C, 37°C, 45°C e 60°C, por 24 h. As concentrações de utilizadas de NaCl em placas de Petri com ágar TSA foram 0,5%, 2%, 6% e 8%. O valor máximo de temperatura e NaCl, correspondeu ao maior valor testado, no qual se observou crescimento e o valor mínimo correspondeu ao menor valor para o qual se observa crescimento (BOWMAN, 2001).

Para a Sobrevivência e Crescimento em água salina 0,65% (SSE), foram realizadas microdiluições (10^{-1} ;..... 10^{-8}), em placas de petri contendo TSA ágar e incubadas em estufa a 37°C/ 24h e, contagem das colônias, para se determinar as unidade formadoras de colônia por mL (UFC/mL⁻¹) em água salina por um período de sete dias.

3. 0 Resultados e Discussão

3.1 Seleção e Atividade Inibitória

Das cepas isoladas 141, somente selecionamos 55, estas foram submetidas ao atividade inibitória. Foi observado que 8 das 55 foram capazes de inibir ao menos um dos patógenos utilizados no teste.

Para averiguar as respostas neste teste foi realizada a medição dos halo de lise bacteriana, estes foram mensurados em centímetros (cm), com ajuda de um paquímetro digital.

De acordo com Guedes Neto et al., (2005), a simples presença de halo de inibição mesmo que mínimo é um indicativo de antagonismo, independentemente do tamanho deste halo.

Dos 55 isolados testados, 8 formaram halo de inibição frente a pelo menos um dos patógenos um total de 14,55%, ou seja se observo-se uma sensibilidade de 85,45% do total dos isolados utilizados no teste, sendo: 85, 45 % para *Aermonas hydrophila* IOC/FDA 110-36 e *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, 89,90% para o *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e 96,37% *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442.

Os isolados resistentes a todos os patógenos, 69 e 83, um percentual de 25% dentro dos oito (8) que demonstraram resposta no teste e 3,63% do total de isolados utilizados no teste.

Estes isolados apresentaram halo de inibição significativo para todos os patógenos, sendo que o isolado 83 obteve melhor resposta frente a *Aermonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, maior halos de inibição, quando analisados as médias dos halos (Tabela 1).

Guedes et al. (2005), observou resultados semelhantes para ação inibidora de BAL sobre o *Vibrio harveyi*, uma vez que a simples presença de um halo de inibição, independentemente do diâmetro, é indicativo de antagonismo. Souza et al. (2010), trabalharam com seleção de BAL isoladas do intestino de Juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*), realizou trabalho semelhante, onde cepas selecionadas e classificadas com a morfologia das colônias viáveis através de coloração de Gram foram submetidas a teste de antagonismo frente à *Vibrio harveyi* e *V. Alginolyticus* com técnica de halo de difusão.

Tabela1. Média dos halos de inibição formados no teste de atividade inibitório dos isolados resistentes ao patógeno.

Isolados	<i>A.hydrophila</i> IOC/FDA10-36	<i>P.aeruginosa</i> ATCC15442	<i>V.parahaemolyticus</i> ATCC17802	<i>V.vulnificus</i> ATCC27562
3	8,00	0	0	8,33±1,15
16.1	7,33±0,57	0	8,00	8,00±1,05
17	7,33±0,57	0	0	7,66±0,57
18	7,66±0,57	0	7,33±0,57	10,66±1,15
69	10,00±2,00	8,66±1,15	8,00±0,80	11,33±1,15
83	11,33±1,15	8,00	8,00±0,50	12,66±2,30
84	9,33±1,15	0	7,00±1,15	8,00±1,10
107	10,00±2,00	0	7,66±0,57	12,00±0,00

Fonte: Elaborada a partir de dados originados da pesquisa. Os Isolados estão representados por números e para cada patógeno suas respectivas médias das medidas em centímetros (cm), dos halo formados. ANOVA; Nível de significância $P < 0,05$

De acordo com HJELM et al. (2004), esta metodologia é utilizado para averiguar o potencial antimicrobiano *in vitro* das candidatas probióticas. Usualmente, testes *in vitro* de antagonismo frente à patógenos, baseados na produção de compostos inibitórios ou na competição por nutrientes, são utilizados para selecionar potenciais bactérias probióticas (SOUZA et al., 2010).

Diversos autores têm demonstrado a ação inibitória de patógenos *in vitro* por bactérias isoladas de organismos aquáticos, como *Bacillus pumilus* (ALY et al., 2008), *Lactobacillus sp.* (BALCAZAR et al., 2008) e *Lactobacillus plantarum* (JATOBÁ et al., 2008), *Micrococcus lutueus* e *Pseudomonas sp.* (ABDEL-RHMAN et al., 2009). Estes microrganismos com características ácido lácticas, através de seu metabolismo liberam substâncias antagonicas como peróxido de hidrogênio, radicais livres, ácidos orgânicos,

diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e bacteriocinas, todos capazes de inibir a proliferação de outras bactérias (CHABRILLÓN et al., 2005)

Souza et al. (2010), isolou *Lactococcus sp.* e *L. Plantarum*, observando sua inibição *in vitro* frente a *V. harveyi* e *V. alginolyticus*. O mesmo foi observado por Viera et al., (2007), trabalhando com a cepa *L. Plantarum*. Jatobá et al. (2015), trabalhando com alevinos de tilápias,, isolou do trato intestinal *L. Plantarum*, demonstrou sua capacidade inibitória contra *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *Enterococcus sp.*, *V. alginolyticus*, *Micrococcus luteos*, *Escherichia coli*.

As bactérias antagonistas são muito comuns na natureza, desempenhando um papel no equilíbrio entre microrganismos benéfico e com potencial patogênico na microbiota intestinal de animais aquáticos, esta microbiota está sempre em processo de modificação, devido à ingestão de novos microrganismos, sendo assim a sua manipulação é realizada com o intuito de reduzir a ocorrência de infecções oportunistas (BALCAZAR et al. de 2006).

Estes trabalhos corroboram os resultados encontrados neste experimento que podem comprovar a ação inibitória *in vitro* exercida pelas bactérias lácticas selecionadas sobre bactéria Gram negativa como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e o *Vibrio vulnificus* ATCC 27562.

3.2 Resistência a Antimicrobianos

Os 8 isolados foram submetidos ao teste de resistência a antimicrobianos para se avaliar sua resistência a 5 antibióticos de importância epidemiológica. Todas as amostras testadas foram sensíveis à ampicilina, tetraciclina, Amoxicilina, estreptomicina, eritromicina, gentamicina. Os resultados referentes aos são apresentados na Tabela 2.

Atualmente, existem muitos estudos de investigação sobre os mecanismos de resistência a antibióticos em BAL. Uma grande parte destas são com *Enterococcus Lactococcus* e *Lactobacillus* (CUETO-VIGIL et al, 2010). Nos últimos anos as cepas multiresistente a antibióticos tem aumentado, como é o caso da metilina, cefoxitin, vancomicina, entre outros. O que confirma e têm sido um grande problema

epidemiológico (PULTZ et al. 2006), a maior parte destas cepas vêm de isolamentos clínicos relacionados a infecções nosocomiais (KAUFMANN e FAIRCHIL, 2004).

Segundo Jatoba et al. (2015), uma vantagem na utilização do *L. Plantarum*, é a redução no risco do desenvolvimento de resistência microbiana frente aos antibióticos, fato verificado por Petersen et al., (2014), para cepas de *Enterococcus sp.* frente à oxitetraciclina e eritromicina e para *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* frente oxitetraciclina (JATOBÁ et al., 2014; MERRIFIELD et al., 2014).

Cueto-Vigil et al (2010), trabalhando com cepas do gênero *Enterococcus* resistentes a vancomicina, verificou que sua resistência era determinada por elementos genéticos móveis como plásmidos ou trasposones, este também avaliou que as cepas *Enterococcus* que não apresentaram esta resistência aos antimicrobianos testados, com o intuito de reduzir o risco de que possa existir da transferência de resistência a antibióticos com os microorganismos patógenos presentes no intestino.

Tabela 2. Medias dos halos de inibição dos isolados selecionados frente aos antimicrobianos

Isolados	Antimicrobianos					
	AMP	TET	AMOX	ESTREPT	ERITRO	GENTA
3	17,0 ± 0,2	17,5 ± 0,25	20,0 ± 0,2	12,0	15,5 ± 0,05	14,0
16.1	17,0 ± 0,2	20,0	21,0 ± 0,1	7,0 ± 0,7	16,0 ± 0,1	13,0
17	16,5 ± 0,15	19,5 ± 0,05	21,5 ± 0,05	15,0 ± 0,1	15,5 ± 0,05	13,0 ± 0,1
18	21,0 ± 0,1	19,5 ± 0,05	20,5 ± 0,05	12,0 ± 0,1	15,5 ± 0,05	15,0
69	21,0 ± 0,1	20,5 ± 0,05	20,0	14,5 ± 0,05	18,0	14,5 ± 0,05
83	21,5 ± 0,05	20,5 ± 0,05	23,5 ± 0,15	15,0	16,0 ± 0,1	15,0 ± 0,2
84	22,0	24,5 ± 0,45	22,0	16,0 ± 0,3	16,5 ± 0,05	14,5 ± 0,05
107	23,5 ± 0,05	20,5 ± 0,05	22,0	14,0 ± 0,1	16,5 ± 0,05	14,5 ± 0,05

Fonte: Elaborada a partir de dados originados da pesquisa. Os Isolados estão representados por números e para cada antimicrobiano suas respectivas médias ± erro padrão em centímetros (cm), dos halo formados. ANOVA; Nível de significância $P < 0,05$

O comercio de probióticos que possuam genes de resistência aos antimicrobianos podem ter consequências negativas, pois esta resistência pode ser tranferida aos patogênos intestinais (MATHUR e SINGH, 2005).

Os microrganismos de maior importancia epidemiológica são os *Enterococcus* vancomicina resistentes (VRE) e os *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA). Os *Enterococcus* e *Staphylococcus* compartilham um nicho ecológico comum como o trato gastrointestinal, como foi demonstrado por Ray et al. (2003). Muitos

autores relatam como VRE e *S. aureus*, o que evidencia a transferencia de genes de resistência (SANTOS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Hayes et al. (2003), trabalhando com *E. faecium* e *E. faecalis* multirresistentes estabeleceu grandes diferenças nos níveis de antibiorresistência, confirmando maior capacidade de *E. faecium* para adquirirem resistência à ampicilina, vancomicina e ciprofloxacina, também observado por Lucher et al., (2012). Os microrganismos destinados a ser utilizados como probióticos na aquicultura deve exercer atividade antimicrobiana e ser considerado como seguro, não só para os anfitriões aquáticos, mas também para seus ambientes e seres humanos ao redor (MUÑOZ-ATIENZA et al., 2013).

Neste estudo se observou que nenhum dos isolados BAL, apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, o que nos indica uma característica desejável a um probiótico, o que pode indicar que estes isolados não devem apresentar genes de resistência, sendo assim mais um indicativo que podemos utilizá-los para testes seguintes. Na tabela 4, podemos verificar as médias dos halos formados no teste de antibiograma utilizando cinco antibióticos de uso epidemiológico.

3.3 Atividade metabólica, resistência a NaCl, T°C e Identificação Molecular

Os isolados puros foram identificados de acordo com os critérios do Manual Bergey's, as provas de identificação foram realizadas para Gram +, cocos, catalase negativa, gema hemolise, crescem em 8,0% de NaCl e bile esculina positivos, fermentadores de carboidratos, indicando ser o gênero *Enterococcus sp.*

Os resultados do sequenciamento do DNA genômico dos isolados 69 e 83 e, as informações das sequências obtidas após terem sido submetidas ao BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) indicaram a espécie *Enterococcus casseliflavus* EC30 para ambos os isolados (69 e 83) com 99% de identidade.

Vários autores afirmam que os *Enterococcus* possuem grande resistência a fatores ambientais que causam estresse celular, sobrevivendo a altas temperaturas, valores de pH e salinidade, como foi verificado neste estudo, bem como a fermentação de carboidratos, hidrólise da esculina, como foi demonstrado nos testes realizados. Estes são resistentes a detergentes, sendo difíceis de eliminar (HAYES et al., 2003),

frequentemente encontrados em solo, água e em diversas alimentos de origem animal e vegetal (FRAZÃO et al., 2014).

Em 1984 o gênero *Enterococcus* foi classificado como novo gênero, antes eram classificados como *Streptococos* do grupo D. Atualmente existem cerca de 40 espécies identificadas, sendo poucas de interesse médico. Estes antes considerados inofensivos (AARESTRUP et al., 2001). Algumas espécies hoje, são multiresistentes a antibióticos, demonstrando uma grande quantidade de mecanismos que lhes permitem resistir aos antibióticos, sendo consideradas espécies patogênicas (LUCHER, 2012).

Esta ecorresistência potencia não só a sua persistência num determinado biótopo, como também a existência de um fluxo permanente entre biótopos (KUNTZ et al., 2004) bem como a colonização de biótopos inacessíveis para outros microrganismos, aumentando o número de reservatórios potenciais (FRAZÃO et al., 2014). A dispersão ambiental de fenótipos antibiorresistentes não tem, contudo, um "epicentro" único na produção pecuária. Apesar da evolução tecnológica, os sistemas de depuração dos efluentes hospitalares e dos esgotos urbanos contribuem igualmente para a difusão massiva de enterococos antibiorresistentes (COSTA et al., 2014).

Vários estudos, relatam sua atividade benéfica, referindo-se ao aumento na absorção de nutrientes no intestinal em relação aos demais microrganismos, como os *Lactobacillus*. Segundo o Ecology Health Center (2005), os efeitos do *E. faecium* na flora intestinal são frequentemente visíveis nos primeiros dias após sua ingestão, o que não é observado com outros produtos contendo *Lactobacillus sp.* (MERRIFIELD et al., 2015)

Assim pode se afirmar que a ação dos probióticos no intestino é principalmente de proteção contra infecções entéricas, sendo o seu efeito protetor realizado mediante mecanismos antagônicos que impedem a multiplicação dos patógenos e a produção de toxinas. Este antagonismo ocorre pela competição por nutrientes nos sítios de adesão, ao gerar uma maior produção de imunoglobulinas e aumentar a ativação das células mononucleares e dos linfócitos mediante a imuno-modulação. Ocorre também o metabolismo dos carboidratos, que diminui o pH intestinal, reduzindo a proliferação de bactérias patogênicas (REDODO et al., 2008; MÑOZ-ATIENZA et al., 2013).

Existe uma grande diversidade fenotípica no gênero *Enterococcus*, sendo muitas espécies, para diferenciar as diversas espécies é necessário uso de métodos de

identificação de genótipos, como sondas de gene alvo para os fragmentos 16S e 23S rRNA.

Entretanto, mesmo com sistemas de identificação, algumas espécies raras podem não ser identificadas, como o *Enterococcus casseliflavus* EC30, cepa identificada neste trabalho, a qual ainda não se tem relatos de isolamentos do intestino de tilápias na literatura e seu uso como um probiótico para tilápias.

3.4 Viabilidade Celular do EC 30 em água salina e ração extrusada

O EC30, apresentou contagens celulares elevadas na água salina e ração, sendo que o isolado foi diluído de uma concentração inicial de $5,9 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Foi observado que em SSE na diluição 10^{-7} o EC30 manteve uma constância quanto a sua viabilidade celular. O EC30 se manteve em concentração entre 10^9 , 10^{10} e 10^{11} UFC.mL⁻¹ nas respectivas diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} em SSE para a temperatura de 37 °C, no período de uma semana. Aos sete dias observamos que ocorreu uma diminuição das quantidades de colônias na diluição 10^{-8} . O EC30 demonstrou sobrevivência e crescimento desejado em SSE, podendo ser adicionado a água de cultivo, já que apresenta viabilidade celular (Tabela 3).

A ração contendo probióticos preparadas com proporção de 20% de biomassa celular, demonstraram uma viabilidade celular em torno de 10^8 UFC.g⁻¹, durante um período de sete dias. A Tabela 4 apresenta os valores de viabilidade celular (UFC.g⁻¹) do EC30 em diferentes temperaturas na diluição 10^{-6} . A contagem UFC.mL⁻¹ do EC 30 em diferentes temperaturas em placas de Petri contendo ágar TSA, têm como intuito verificar sua sobrevivência em ração extrusada comercial para tilápias. Foi verificado o crescimento por uma semana nos dias 0, 1, 2, 3 e 7 para temperaturas de 4, 22 e 37 °C e apenas ao 7º dia para a temperatura de - 20 °C.

Foi observado que a uma temperatura de 4 °C, a viabilidade celular se mantém constante durante os sete dias, já nas demais 22 °C e 37°C ocorre uma diferença decrescente quanto a viabilidade celular nos dias 4 e 5 para 22 °C e no dia 7 para 37 °C, indicando uma instabilidade celular nestas temperaturas, o que leva a conclusão que se o probiótico for inserido na ração deve ser acondicionado a temperaturas baixas para que a viabilidade celular não seja alterada, durante testes *in vivo*.

Tabela 3. Contagem em placas de TSA do crescimento em SSE 0,65% do EC30 a 37 °C.

UFC mL ⁻¹	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 7
- 6	In	3,0 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁹	2,4 x 10 ⁹	2,8 x 10 ⁹
- 7	In	1,3 x 10 ¹⁰	2,1 x 10 ¹⁰	2,5 x 10 ¹⁰	2,5 x 10 ¹⁰
- 8	≥300	1,1 x 10 ¹¹	2,1 x 10 ¹¹	2,6 x 10 ¹¹	1,73 x 10 ¹¹

Fonte: Elaborada a partir de dados originados da pesquisa. Os dados estão representados por unidades formadoras de colônias por mililitros na potência - 10 (UFC/mL⁻¹). ANOVA; Nível de significância P<0,05. In = indeterminado.

Tabela 4. Contagem das UFC.mL⁻¹ na diluição 10⁻⁶, em placas de ágar TSA para o EC 30 na ração comercial extrusada para tilápias, para diferentes temperaturas.

UFC mL ⁻¹	4°C	22 °C	37 °C	- 20 °C
Dia 0	2,0 x10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁸	NR
Dia 1	3,0 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁸	NR
Dia 2	1,6 x 10 ⁸	11 x 10 ⁸	5,0 x 10 ⁸	NR
Dia 3	2,0 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁸	6, 0 x 10 ⁸	NR
Dia 7	1,5 x 10 ⁸	7,3 x 10 ⁸	3, 0 x 10 ⁸	9,0 x 10 ⁶

Fonte: Elaborada a partir de dados originados da pesquisa. Os dados estão representados por unidades formadoras de colônias por mililitros na potência - 10 (UFC/mL⁻¹). ANOVA; Nível de significância P<0,05. NR = não realizado.

Estes resultados estão de acordo com varios autores, que trabalhando com cepas de probióticos verificaram que a viabilidade celular na ração armazenada sobre refrigeração, foi mantida durante todos os dias de testes (VIEIRA et al., 2008). Dessa forma, durante todo o ensaio experimental a concentração celular manteve-se em níveis adequados e dentro do recomendado por diversos autores (LUCHER et al. 2012).

Nas dietas probióticas as concentrações na ração fornecida inicialmente não deve sofrer grandes variações, muitos trabalhos confirmam e demonstram esta viabilidade celular e concentração ideal para varios probióticos já estudados (OLIVEIRA et al., 2013). Dietas probióticas, utilizando *Lactococcus lactis* na concentração de 108 UFC.g⁻¹ e *Enterococcus faecium* na concentração de 108 UFC.g⁻¹ para juvenis de *Epinephelus coioides* (garoupa), igualmente a Sharifuzzaman (2010), que utilizou nas dietas probióticas

com *Kocuria* e *Rhodococcus* nas concentrações de 10^7 a 10^8 UFCg⁻¹, para proteção contra infecção por vibrios, para juvenis de truta arco-íris (MUÑOZ-ALTIEZA et al., 2015).

Enfatiza-se que a dose do probiótico, a duração da administração e a idade dos animais podem afetar a eficácia dos mesmos, a forma e o tempo na administração como principais fatores que afetam a eficácia das dietas probióticas (SIGGERS et al., 2007; TASHIBANA et al. 2014). Estudos demonstram que muitos probióticos já comercializados e utilizados na aquicultura não estão de acordo com a composição descrita em seus rótulos e muitas vezes contêm espécies não informadas no rótulo, o que sugere erros de identificação, bem como concentrações abaixo e/ou inexistentes do declarado em seus rótulos (WANNAPRASAT et al., 2009; GAGGIA et al., 2010; LUCHER et al., 2012).

4.0 Conclusões

Enterococcus casseliflavus EC30 é uma nova cepa sua identificação só foi devido ao seu seuqenciamento genômico.

Este é o primeiro registro desta cepa em Enterococcus casseliflavus EC30, a partir do intestino de alevinos de tilápias.

Enterococcus casseliflavus EC30 exerceu função antagonista frente aos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 e o *Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Vibrio harveyi* ATCC 14126T.

Enterococcus casseliflavus EC30 foi resistente aos antimicrobianos ampicilina, tetraciclina, amoxicilina, estreptomicina, eritromicina e gentamicina.

Enterococcus casseliflavus EC30 é resistente a grande faixas de salinidade e temperaturas, sobrevive em água salina e ração.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, M. F.; SEYFARTH, M. A.; EMBORG, HD.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. **Antimicrobiology Agentes Chemother**, vol.45n., p.72054-2059, 2001.
- ABD EL - RHAMN, M. A; YASSIR A.E. KHATTAB, A. E. Y; SHALABY, M. E. A. Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, p. 175-180, 2009.
- ALY, S.M.; Abd-El-RAHMAN, A.M.; JOHN, G.; MOHAMED, M.F. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. **Aquaculture**, v. 277, n. 1-2, p. 1 – 6, 2008.
- BALCAZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CINNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbial**. v. 114, p. 173-186, 2006.
- BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J.L.; GIRONES, O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**, v. 10., p. 188–191, 2008.
- BOWMAN, J. et al. A comparison of tilapia culture technologies: linking research and outreach results across geographical regions. **World Aquaculture**, v.39, n.2, p.39-44, 2008.
- COSTA, S.W.; VICENTE, L.R.M.; SOUZA, T.M.; ANDREATTA, E.R.; MARQUES, M.R.F. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.12, p.1521-1530, dez. 2010.
- DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. Probióticos como alternativa anti-microbiana: limitações e potencial. **Revista da ABCC**, n. 4, p. 58-59, 2005.
- DIMITROGLOU, A; MERRIFIELD, DL; CARNEVALI, O; PICCHIETTI, S; AVELLA, M; DANIELS, CL; GÜROY, D; DAVIES, SJ. Microbial manipulations to improve fish health and production: A Mediterranean perspective. **Fish and Shellfish Immunology**, 2011;30:1-16. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.009>. Acesso em 22 de agosto de 2016.

DEVARAJA, T. N.; YUSOFF, F. M.; SHARIFF, M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. **Aquaculture**, v. 206, p. 245-256, 2002.

FJELLHEIM, A.J.; KLINKENBERG, G.; SKJERMO, J.; AASEN, I.M.; VADSTEIN, O. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Vet. Microbiol.**, 29, 153–159, 2010.

FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, n.151, p.125–140, 2011.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol**, n. 66, p. 365-378, 1989.

JATOBÁ, A; MOURIÑO, P. J. L. *Lactobacillus plantarum* EFFECT ON INTESTINAL TRACT OF *Oreochromis niloticus* FINGERLINGS. **Cienc. anim.bras.** v.16, n.1, p-45-53, jan./mar. 2015.

Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37:725-732, 2011.

GARCIA-ULLOA, M. Aditivos nutricionales: probióticos. **Panorama acuícola**, v. 8, p. 38, 2003.

GRAN, H. M.; WETLESEN, A.; MUTUKUMIRA, A. N.; RUKURE, G.; NARVHUS, J. A. Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. **Food Control**, v.14, p.539-544, 2003.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, v.352, p.279-285, 1997.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, supl.2, p. 245-250, 2005.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 1-4, n. 233, p. 1-14, 2004.

HUFF, B.A.; EMPTOR, C. “Probiotics” might not be what they seem. **Canadian Family Physician**, v. 50, p. 583-587, 2004.

KRUMMENAUER D, ABREU PC, LARA G, POERSCH L, ENCARNACAO P, WASIELESKY JR W. The Effect of Probiotic in *Litopenaeus vannamei* Biofloc

Technology Culture System contaminated with *Vibrio parahaemolyticus*. **Abstract World Aquaculture Conference**, Mexico, 2009.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA M.A. ; GUZMAN-MENDEZ, B. E. ; LOPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, p. 193-201, 2003.

LAVORANTE, B. R. B. O; SANTOS P. N.; MENDES, P. T. S.; MENDES, E. S. Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n .7, p. 738-745, 2009.

LYLE-FRITCH, L.P.; ROMERO-BELTRÁN, E.; PAÉZ-OSUNA, F. A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico), **Aquacultural Engineering**, n. 35, p. 135-146, 2006.

JORY, D.E.; ALCESTE, C.; CABRERA, T.R.. Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica. **Panorama Acuícola**, v.5, p.50-53, 2000.

LAZARD, J; ROGNON, X. Genetic diversity of tilapia and aquaculture development in Côte D'Ivoire and Niger. **Bamidgeh**, v.49, p.90-98. 1997.

MAEDA , H.; SILVA , P. C.; AG UIA R, M. S.; PAD UA, D. M. C.; OLIVEI RA, R. P. C.; MAC HADO , N. P.; ROD RIG UES , V.; SILVA , R. H.. Efeito da densidade de estocagem na segunda alevinagem de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), em sistema *raceway*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 265-272, 2006.

MAYER, E. Evaluation of *Vibrio* control with a multi-species probiotic in shrimp aquaculture. **International Aquafeed**, v. 14, n. 6, 2011. Disponível em: <http://www.biomin.net/en/knowledge-center/articles/browse/1/> Consulta em: 02/08/2012

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BARBERO, L.M.; SANTOS, L.D.; BOMBARDELLI, R.A.; COLPINI, L.M.S.. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p.791-794, 2008.

MENDES, E. S.; LIRA, S.; GÓES, M. N. B.; DOURADO, J; MENDES, P. P; BEZERRA, C. A. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.

MERRIFIELD, D L; DIMITROGLOU, A; FOEY, A; DAVIES, S.J; BAKER, RTM; BOGWALG, J; CASTEX, M; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, 2010;302:1-18. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>. Acesso em 2 de agosto de 2016.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L.. Utilização de bactérias

ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1201-1207, 2008.

NATORI, M.M.; SUSSEL, F.R.; SANTOS, E.C.B.; PREVIERO, T.C.; VIEGAS, E.M.M.; GAMEIRO, A.H. Desenvolvimento da Carcinicultura Marinha no Brasil e no Mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, SP, v. 41, n. 2, 2011.

PETERSEN, A; DALSGAARD, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*, 2003;219:71-82. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00018-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00018-8). Acesso em 20 dezembro de 2014.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.261-266, 2003.

RAMÍREZ, C.. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. 2005. p.180. (Tese) **Doutorado** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G.A.; PANCHENIAK, E.M.G.; SOCCOL, E.F.R.C.. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v.264, p.70-78, 2006.

SOUSA, J. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p.373-381, 2001.

SUZER, C; ÇOBAN, D; KAMACI, HO; SAKA, S; FIRAT, K; OTGUCUOĐLU, O; KÜÇÜKSARI, H. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**,;280:140–145,2008.

STERN, N.J.; SVETICH, E.A.; ERUSLANOV, B.V.; PERELYGIN, V.V.; 388 MITSEVICH, E.V.; MITSEVICH, I. P.; POKHILENKO, V.D.; LEVCHUK, V.P.; SVETICH, O.E.; SEAL B. S. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 50(9), 3111-3116, 2006.

VIEIRA, FN; JATOBÁ, A; MOURIÑO, JLP; VIEIRA, PA; SOARES, M; SILVA, BC; SEIFFERT, WQ; MARTINS, ML; VINATEA, LA. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2013;48(8):998-1004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800027>. Acesso em 20 agosto de 2016.

CAPÍTULO 2

**ENTEROCOCCUS CASSELI FLAVUS EC30 AGINDO COMO MODULADOR
DA MICROBITA INTESTINAL DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*).**

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi observar a modulação da microbiota intestinal e sobrevivência dos animais alimentados com EC30 quando desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Para o mapeamento da microbiota intestinal foram utilizados 120 alevinos de tilápias e para o desafio 48 destes 120 animais iniciais. Para observação da modulação e desafio foram utilizados dois grupos e em cada grupo, quatro sub-grupos. O grupo 1 foi alimentado com o *Enterococcus casseliflavus* EC30 (10^{-9}) em caldo MRS e grupo 2 com ração contendo MRS estéril. Os quatro sub-grupos dentro de cada grupo, para o desafio *Aeromonas hydrophila* que se deu no 21º dia, eram: não injetado, injetado com PBS estéril, injetados com dose L50 (10^{-7}) e outro com a dose L50x10 (10^{-8}) do patógeno *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA. O mapeamento da microbiota intestinal foi amostrado em dias determinados (0, 3, 6, 9, 15, 24 e 30), no qual se retirou cinco animais de cada tratamento (grupo) aleatoriamente. Os intestinos foram retirados e congelados para posterior análise utilizando a técnica DGGE. Para o desafio a dose injetada foi de acordo com o peso individual de cada animal (g/5µL). O subgrupo EC30 - L⁵⁰ obteve 50% sobrevivência, no subgrupo EC30 - L^{50x10} a sobrevivência foi de 33%. Para os subgrupos sem EC30 e com sem dose letal e injetados PBS estéril se observou 100% de sobrevivência. Os subgrupos não alimentados com EC30 e com doses letais de *Aeromonas* se observou mortalidade de 100%. Quanto a modulação da microbiota com o uso do EC30 na técnica de DGGE foram observadas menor variedade de espécies no dendograma obtido, podendo afirmar que os animais alimentados com o *Enterococcus casseliflavus* EC30 sofreram uma maior modulação da microbiota intestinal quando comparados ao grupo que não recebeu EC30. Os resultados do presente estudo demonstram que o *Enterococcus casseliflavus* EC30 conseguiu aderir a mucosa intestinal e se manteve presente mesmo após os animais deixarem de ser alimentados com EC30 na ração. O *Enterococcus casseliflavus* EC30 conferiu proteção aos animais quando desafiados com *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA e modulando a microbiota intestinal dos alevinos de tilápia, demonstrando seu potencial como probiótico.

Palavras-chaves: Bactéria ácido láctica, *Enterococcus casseliflavus* EC30, *Aeromonas*, DGGE, Modulação da microbiota Tiláia do Nilo.

ABSTRACT

The objective of this study was to observe the modulation of intestinal microbiota and the survival of the animals fed EC30 when they were challenged with *aeromonas hydrophila*. For the mapping of the microbiota the used 120 fingerlings of tilapia and the challenge of these 48 fingerlings 120 animals. To observe the modulation and the challenge is used two groups and each group of four sub-groups. Group 1 was fed EC30 *Enterococcus casseliflavus* EC30 broth and group 2 with feed containing sterile MRS. Four subgroups within each group, for the challenge of *aeromonas*, which took place on day 21, were: not injected, injected with sterile PBS, injected with doses L50 (10^{-7}) and the other with the $L^{50 \times 10} (10^{-8})$ dose of the pathogen *Aeromonas hydrophila* IOC / FDA. The mapping of the intestinal microbiota samples were taken on certain days (0, 3, 6, 9, 15, 24 and 30), where five animals were removed in each treatment (Group) at random. Them intestines is eliminated and is froze for its subsequent analysis by the technical of DGGE. For the challenge dose was injected according to the individual weight of each animal (g/5 μ L). The subgroup EC30^{-L50} obtained 50% of survival in the subgroup EC30^{-L50x10} her survival was of the 33%. For the sub-groups without EC30 and lethal dose and were injected with sterile PBS, there was a 100% survival. Subgroups were not fed EC30 and lethal doses of *aeromonas* found a mortality rate of 100%. The modulation of the microbiota using the EC30 in the DGGE technique were observed smaller variety of species the dendrogram retrieved, you can say that animals fed with *Enterococcus casseliflavus* EC30 been subjected to substantial modulation of intestinal microbiota in comparison with group who did not receive EC30. The results of this study demonstrate that the could *Enterococcus casseliflavus* EC30 adhered to the intestinal mucosa and remained even after.

Keywords: Bacteria Lactic acid, *Enterococcus casseliflavus* EC30, *Aeromonas*, DGGE, Microbiota modulation, Nile Tilapia.

1.0 Introdução

A técnica de DGGE, realiza a análise genética, podendo ser usada para detecção das possíveis modificações em uma única base e ou polimorfismo no DNA gênomico, DNA clonal e ainda o DNA amplificado através das técnica de PCR. Com o uso desta técnica é possível rastrear bactérias presentes intestinais e as possíveis alterações da microbiota intestinal, quando se faz uso de uma suplementação na ração com probiótico (BASSANTA et al., 2008; DIMITROUGLOU et al., 2011; LAUKOVA et al., 2012).

Este método eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), tem como base mostrar as diferenças de comportamento na desnaturação dos fragmentos DNA de dupla cadeia, separando as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico e ou peso molecular, e identificando estas com o auxílio da espectrometria de massa, sendo muito utilizado nos estudos proteômica(MERRIFIELD et al., 2010; TAPIA-PANAGUA et al., 2014).

O estudo da proteômica é a expressão do proteoma de um organismo, ou como os seus genes se expressam, permite entender o comportamento do genes frente aos efeitos estruturais e funcionais causados por fatores ambientais, bem como; os efeitos da nutrição sobre a expressão gênica de um individuo, como é o caso dos efeitos causados no organismo devido ao uso dos probióticos (FRANZ et al., 2011; MERRIFIELD et al., 2015).

2.0 Material e Métodos

2.1 Locais de Desenvolvimento do Trabalho

O experimento foi realizado durante o doutorado sanduiche, sob supervisão Dr. Salvador Arijo Andrade, na Faculdade de Ciências do Departamento de Microbiologia, Laboratório 3 com o Grupo de Pesquisas em Biocontrole e Prevenção de Enfermidades em Aquicultura, na cidade de Málaga, Espanha de janeiro de 2016 até junho de 2016.

2. 2 Preparo da dieta

Se utilizou uma ração comercial extrusada para tilápia, 50% de proteína bruta e 7% de lipídio. A ração a ser fornecida com o probiótico, era preparada diariamente, antes de ser fornecida, através da adição de 2 mL/10g de ração estéril.

A massa bacteriana cultivada diariamente em placas de Petri no ágar MRS 24h/37°C, era ressuspensa em caldo MRS estéril e ajusta no espectrofotômetro, para concentração 10^9 UFC/mL⁻¹. A dieta controle era ração com caldo MRS estéril. Este preparo era realizado duas vezes ao dia com um máximo de 1 hora antes de ser fornecida (Mendes et al., 2012). Amostras das rações fornecidas eram tomadas diariamente para análises microbiológicas com fins de confirmação da presença apenas do EC30 e inocuidade.

2.3 Teste *in vivo* alimentação com *Enterococcus casseliflavus* EC30

Foram utilizados 120 animais, com 30 dias de vida, e peso inicial de $1.2 \pm 0,8$, livre de enfermidades, produzidos pela empresa Aula del Mar, em Málaga.

Os animais foram distribuídos em 8 tanques de 60 L, equipados com aeração constante por contato, através de pedras microporosas ligadas por meio de mangueiras de silicone a minicompressores de ar de saída dupla e sistema individual de renovação de água e controle de temperaturas por termostatos a 27°C, durante todo o experimento. Após uma semana de ambientação, um grupo controle de 10 animais, foi retirado para amostragem inicial da DGGE, após jejum de 24 h para esvaziamento intestinal, foram anestesiados por imersão em óleo de cravo 200µL/250mL de água. A eutanásia foi realizada por meio de secção medular (NIFFER e STAMPER, 2009), higienizados externamente com álcool a 70%, e tiveram intestinos dissecados e retirados de forma asséptica para congelamento -80 °C.

Os animais eram alimentados duas vezes ao dia (10:00 e às 17:30 h), na proporção de 2% do peso vivo, a sifonagem duas vezes ao dia (11:00 e às 18:30h), com a remoção de 25% da água e retirada das fezes e eventuais sobras de alimento. Os parâmetros de qualidade da água foram aferidos a cada 7 dias. Após uma semana de ambientação, se iniciou o fornecimento dos tratamentos: T1- ração comercial e T2 - ração comercial suplementada com EC30.

O delineamento completamente casualizado (DIC), onde temos 2 tratamentos e 4 repetições. Cada repetição continha 15 animais, totalizando 60 animais, por tratamento. Os animais foram alimentados por 14 dias com os tratamentos com e sem EC30 e então submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila*.

2.4 Desafio com *Aeromonas hydrophila* após alimentação com EC30

Para o desafio foram utilizados 48 animais, sendo 24 alimentados por 14 dias EC30 e 24 que não receberam. No desafio o animal foi utilizado como repetição para cada dose inoculada, logo foram 6 repetições para as seguintes doses: DL₅₀; DL₅₀¹⁰; Injetados com PBS estéril; Não injetados.

A massa bacteriana do patógeno aeromonas foi cultivada em placas de Petri no ágar TSA 24h/37°C e foi ressuspensa em PBS estéril, sendo ajusta no espectofotômetro, nas seguintes concentrações: L⁵⁰ = 10⁷ UFC/mL⁻¹ e L^{50x10} = 10⁸ UFC/mL⁻¹ (TASHIBANA et al., 2014). A dose injetada em cada animal foi de 5µL/g de peso vivo (SILVA et al., 2012).

Para injetar o patógeno, os animais foram anestesiados com óleo de cravo (100µL/ 250mL H₂O). Amostras das suspensões injetadas para retiradas para análises microbiológicas de inocuidade.

Ao final todos os animais restantes foram submetido a anestesia com óleo de cravo (200µL/ 250mL H₂O) e sacrificados por secção medular, os intestinos retirados de forma aséptica pesados e em seguida congelados em microtubos a -20°C, para posterior análise do mapeamento intestinal através da técnica de DGGE.

2.5 Técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

2.5.1 Amostras e Extração do DNA intestinal

Foram utilizadas 42 amostras de intestinos de alevinos de tilápias, sendo: 21 de animas alimentados com EC30 e 21 de animais que não receberam o EC30. Para retirada dos intestinos os animais foram anestesiados com óleo de cravo (200µL/ 250mL H₂O) e sacrificados por secção medular, os intestinos retirados de forma asséptica pesados e em seguida congelados em microtubos a -20°C.

Foram retirados um total de 5 amostras por tratamentos em cada dia de coleta (0, 3, 6, 9, 15, 22, 30). As biometrias forma em balança analítica com precisão de 0,001g, onde os animais eram pesados após anestesia e seus intestinos retirados para realização do mapeamento da diversidade genética a nível de microbiota intestinal.

Os intestinos preservados a -20 °C, foram descongelados gradualmente., Foi utilizada uma amostra de 50 mg cerca de 1/3 de cada intestino, para extração do DNA

microbiano intestinal. O restante da amostra foi recongelado a -20°C . Para extração do DNA bacteriano intestinal seguiu-se o protocolo descrito por Martinez et al. (1998), com base em uma precipitação de sal com pequenas modificações, como descrito a seguir.

As amostras do intestino foram ressuspensas e homogeneizadas em 300 μL de tampão de ressuspensão e 300 μL de tampão lise (ver anexo).

Depois de se agitar a mistura vigorosamente, 32 μL foram adicionados a uma solução de 6M de NaCl e proteinase K (150 μL - 1 mL) e incubou-se a 55°C durante 2 horas, em seguida as amostras foram levadas para freezer a -20°C por 10 min., para precipitação do conteúdo e então procedeu-se a centrifugação por 12.000 x g - 3 min.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado um volume de cerca de 600 μL de isopropanol, e realizada a inversão (homogeneização) 25 vezes, incubou a temperatura ambiente durante 10 min. Descartou-se o precipitado e se adicionou 500 μL de etanol a 70% resfriado previamente a -20°C . As amostras foram centrifugadas a 12000 x g durante 2 min e o sobrenadante descartado, os peletes foram deixados para secar próximo à chama em temperatura ambiente.

O DNA extraído foi ressuspendido em 20 μL de água quimicamente pura, estéril e livre de DNase e RNase. Para se obter um DNA livre de impurezas que, podem inibir as reações de PCR. Se conservou em -20°C para posterior realização da técnica de DGGE, após realização da PCR e confirmação da integridade do DNA em gel de agarose 1% de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Antes de se proceder a PCR o DNA foi quantificado para ajustes de concentração das amostras de DNA e para verificar sua pureza. Esta foi determinada a partir da medida de absorvância (A) a 260 nm e as relações $A_{260\text{nm}} / A_{260\text{nm}} 280\text{ nm}$ e $/ A_{230\text{nm}}$ usando NanoDrop TM 1000 (ThermoFisher Scientific), considerando-se valores entre 1,8-1,9 absorvância apropriado. As amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de 100 ng μL^{-1} , o que procedeu-se a reação em cadeia (PCR). A qualidade e integridade do DNA, foi visualizada em gel de agarose 1% utilizando-se o brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como revelador.

Como padrão de peso molecular foi usado GeneRuler Mais 100 DNA bp (Thermo Scientific). A eletroforese foi realizada com tensão constante (100 V) durante 40 minutos sobre um gel de agarose a 1% em Tris-borato-tampão EDTA (TBE). A

amplificação de sequências de 500 pb das regiões de genes V6-V8 16S rRNA universal F-CG-968 (foram utilizados os iniciadores 5' 'GGGAACGCGAAGAACCCTTAC - 3 '), e 1401-RV (5' CGGTGTGTACAAGACCC-3 ') (Kim e Austin, 2006), sendo o primeiro nucleótido incorporado com cauda CG.

2.5.2 Reações de Amplificação

Foram realizadas num volume de 50 µl, utilizando tubos de polipropileno estéreis thin-walled 0,2 mL de capacidade. A mistura de PCR continha 1,25 U de Dream *Taq* polimerase (Thermo Scientific, Madrid, Espanha), 20 µM de Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl², 200 µM de cada dNTP (trifosfato de dinucleótido), 5 pmol de cada iniciador, água estéril PCR ou MiliQ, pura e livre de DNase, para as amostras controlo e 1 µL de DNA de um cultivo puros como amostra controle e DNA 11 µL de cada amostra experimental.

Os ciclos realizados no termociclador de modelo T1 (Whatman Biometra, Gottingen, Alemanha) foram os seguintes: 1 de 94 °C durante 2 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos para desnaturação do DNA, um ciclo de 56 °C durante 40 s para o anelamento das fitas, e para a extensão por 1 min 72 °C, seguido de um ciclo final de 72 °C durante 5 min. Após a obtenção das amplificações o PCR, verificou-se em em gel com 1% de agarose em TBE, por comparação dos tamanhos dos produtos amplificados com um padrão de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Plus (Thermo Scientific).

2.5.3 Eletroforese

Os produtos de PCR das amostras de intestino obtidas no teste em animal vivo foram separados através da técnica de DGGE, de acordo com as especificações de Muyzer et al. (1993), utilizando-se um sistema de computador Dcode TM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A eletroforese foi efetuada em géis (dimensões 16 x 10 x 0,01 cm) de 8% de poliacrilamida (37: 5: 1 de acrilamida-bisacrilamida) (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) utilizando um gradiente de desnaturação de 30 a 55% de uréia e formamida, aumentando na direção da electroforese.

A solução desnaturante continha 100% 7 M ureia e 40% (v/v) de formamida desionizada. Os produtos da PCR (6 µL), juntamente com 2 µL tampão de carga, foram

carregados sobre os géis e colocados a uma voltagem de 100 V durante 10 min e 50 V durante 16 h (Sambrook et al., 1989), a uma temperatura constante de 60 °C, por toda a noite.

Em seguida, os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo Sanguinetti et al. (1994) , e fotografados para posterior análise das bandas reveladas, bem como retirada de algumas bandas para amplificação da PCR e posterior identificação.

2.5.4 Padrões de DGGE

As imagens dos géis manchados foram digitalizadas com uma resolução de 300 dpi e analisados com o programa de análise de imagem FPQuest 4,5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Foram determinadas as quantidade de bandas (S), e as suas intensidades (ni), bem como a soma de todas as intensidades (N) de cada amostra (Fromin et al., 2002). As semelhanças entre os padrões de DGGE foram determinadas pelo coeficiente de Pearson (Konstantinov et al., 2006) e, os valores obtidos em cada tratamento foram comparados usando um teste de intervalo múltiplo para cada tratamento.

Os dendrogramas foram realizadas por o sistema de agrupamento "não ponderado, Métodos de Par de Grupos, usando médias aritméticas" (UPGMA). As análise dos padrões de bandas dos géis de DGGE permitiu a visualização de diferentes parâmetros ecológicos.

Logo, a abundância de indivíduos por banda foi quantificada com base na intensidade das mesmas em relação à intensidade total da banda padrão, obtida a partir da análise das imagem do gel de DGGE. Destes valores ecológicos foram calculados os seguintes parâmetros:

1. **Índice de Diversidade de Shannon (H')** (Shannon e Weaver, 1949), calculado de acordo com expressão:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

em que $P_i = n_i / N$, n_i = número de exemplares de cada espécie, N = número total de Exemplares de todas as espécies.

2. **Riqueza de espécies (R)**, estimado como o número total de bandas.

$$R = \sum b$$

em que $b =$ é cada uma das bandas presentes no gel DGGE.

3. **Habitabilidade (Rr)**, calculado como o número total de bandas multiplicado pela porcentagem de gradiente desnaturante dos agente uréia / fornecida do gel necessários para descrever a diversidade total da amostra analisada (Marzorati et al., 2008).

$$Rr = N^2 \times D_g$$

onde $N =$ número total de bandas em cada poço, $D_g =$ gradiente desnaturante entre a primeira e a última banda da poço.

2.5.5 Sequenciação das Bandas Obtida nos Géis de DGGE

Das bandas predominantes nos géis de DGGE se extraiu o DNA, a partir do gel por cortes realizados das bandas com ajuda de uma lâmina de bisturi, em seguida foram colocados em microtubos estéreis e cobertas com 30 μ L de água MiliQ estéril (água estéril quimicamente pura livre de DNase) e incubados 24 h a 4 °C.

O fragmento de DNA diluidos, foram amplificado por PCR em novo gel, utilizando os iniciadores 968-F sem cauda GC (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3 ') e 1401- Rv. A amplificação foi realizada em um termociclador T1 (Biometra Whatman,Gottingen, Alemanha) e incluiu em um ciclo inicial de 94 °C - 2 min, 28 ciclos de 95 °C - 30 s para desnaturar, 56 °C - 40 s de reconhecimento e um ciclo final de 72 °C - 5 min para extensão.

O produto da PCR foi verificado em gel de agarose (anexo) e o produto remanescente foi purificado utilizando o kit High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche). Depois de se verificar a pureza e concentração de DNA obtido, as amostras foram enviadas para sequenciamento pela técnica de sequenciamento capilar para Macrogen® (Coreia do Sul), (até o momento em análise pelo laboratório Macrogen).

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Desafio com *Aeromona hydrophila*

Durante todo o período do teste de desafio, com o EC30, os valores de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, mantiveram-se estáveis, no entanto a temperatura mesmo estavam manteve-se baixa para a de conforto para da tilápia (COSTA et al., 2014). Foi detectada a presença de bactérias ácido-láticas EC30 na água das unidades

experimentais alimentadas com dieta suplementada, após o quarto dia de suplementação.

Este resultado corroborou o de Jatobá et al.(2015) , que ofereceu dieta probiótica para tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e observou a presença de bactérias ácido-láticas na água.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que ganho de peso final e as taxas de crescimento específicos de juvenis de tilápia alimentados por 14 dias com uma dieta comercial e dieta suplementada EC 30 não demonstraram diferença significativa. A sobrevivência após 15 dias foi de 100% para todos tratamentos.

No desafio com *Aeromonas hydrophila*, a sobrevivência dos animais que receberam o EC30 foi de 33% para o grupo que recebeu a dose L50x10 e 50% para o grupo que recebeu a dose L50, sendo 100% para os que receberam apenas PBS e os que não foram injetados.

O grupo que recebeu a dieta controle por 14 dias também foram inoculados com aeromonas tendo uma taxa de mortalidade de 100% para as duas doses injetadas. concentração de 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹, L50 e L50x10, respectivamente.

Cornelio et al. (2013), trabalhando com tilápias do nilo, suplementadas com probióticos, observou também aumento da resistência da tilápia após a infecção pelo patógeno *Aeromonas hydrophila*, verificando que não houve mortalidade dos peixes que receberam injeção apenas da solução salina (grupo-controle), como neste trabalho os que receberam PBS estéril, e nos peixes infectados, a mortalidade diminuiu significativamente após 96 horas, este verificou que a houve uma redução de 56% no tratamento controle, sem suplementação; 30%, com a suplementação da bactéria na ração; 33%, com a suplementação da levedura na água, esses resultado, está de acordo com o observado neste estudo, onde se verificou mortalidade até o 4 dia, mostram que a bactéria promoveu aumento de resistência da tilápia à infecção por patógeno.

Alguns possíveis mecanismos de ação dos probióticos, para aumento de resistência após infecção, foram descritos por Balcázar et al. (2008), em estudo com truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*). Os autores verificaram que os microrganismos probióticos mostraram grande habilidade de aderir ao muco intestinal, o que causou significativa redução de adesão de patógenos, e sugeriram que há possibilidade de

secreção de substâncias antimicrobianas pelos microrganismos probióticos, além da exclusão por competição de nutrientes (CORNELIO et al., 2013).

Talvez o critério mais importante para a seleção de um potencial probiótico seja a capacidade da bactéria de colonizar o intestino do hospedeiro (MERRIFIELD et al. 2010; NAYAK 2010). Portanto, o isolamento da cepa a partir do trato gastrointestinal do hospedeiro é adequado para selecionar um probionte, já que considera a adaptação que permite sua fixação aos tecidos intestinais (CARNEVALI et al. 2004). Este procedimento não restringe o potencial de um probionte ao de uma cepa transitória (O'SULLIVAN 2001), apesar de que uma cepa transitória também pode influenciar positivamente o hospedeiro (ISOLAURI E OUWEHAND 2004).

O gênero *Aeromonas* é amplamente descrito como patógeno emergente em organismos aquáticos e seres humanos (JANDA E ABBOTT 2010), mas ainda há um elo perdido entre este gene virulento e uma determinada espécie ou origem. Esta situação se torna mais evidente quando espécie é capaz de apresentar vários fatores de virulência sem mostrar potencial de virulência definitivo (MARTINO et al. 2014).

A utilização de uma bactéria, pertencente a este gênero excepcionalmente diversificado, como probiótico pode ter efeitos positivos, já que cepas probióticas competem de forma eficaz com outras bactérias. É importante notar que seria altamente desejável obter cepas probióticas da mesma espécie das patogênicas que procuram por nutrientes e espaço para se fixar no intestino do hospedeiro (GRAM E RINGØ 2005).

Sugere-se que a redução na mortalidade dos animais infectados com *Aeromonas hydrophila*, pode estar relacionada à capacidade de as bactérias-lácticas, suplementadas à ração, produzirem substâncias inibidoras (RAMÍREZ et al., 2006; VIEIRA et al., 2007), tais como: substâncias bactericidas de alto (bacteriocinas) e baixo (reuterinas) peso molecular (FOOKS E GIBSON, 2002), ácido láctico e ácido acético (VÁZQUEZ et al., 2005) e peróxido de hidrogênio (SUGITA et al., 2007). Outro possível mecanismo de inibição pode ser a exclusão competitiva por nutrientes e espaço (GÓMEZ-GIL et al., 2000), ou alteração do metabolismo microbiano no intestino (GATESOUBE, 2008).

3.2 Análise da Microbiota Intestinal de acordo com Geis

O dendrograma obtido a partir da análise de similaridade usando o coeficiente Pearson padrões de bandas dos géis de DGGE mostrados na Figura 1, 2 e 3. A incorporação na dieta de EC30 resultou em um alto percentagem de semelhança intragrupo, entre a dieta controle e a dieta com EC30, 78% e 88%, respectivamente.

Os valores de diversidade (H'), a riqueza de espécies (R) e habitabilidade (R_r) calculados a partir de padrões de análise de DGGE obtidos são mostrados na Tabela 1.

O microbiota dos animais alimentados com a dieta controle e a dieta suplementada apresentaram valores similares de R . No caso de habitabilidade, ou R_r , os valores foram significativamente maior quando a dieta foi suplementada com o probiótico.

Tabela 1. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (R_r) de la microbiota de tilapias do nilo (*O. niloticus*) alimentados con dieta comercial (controle) e dieta suplementada com *Enterococcus casseliflavus* EC30.

Dieta	H'	R	R_r
Controle	$6,5 \pm 0,6$	$35,8 \pm 0,3$	$78,0 \pm 0,0$
EC30	$6,9 \pm 0,4$	$36,1 \pm 0,1$	$88,0 \pm 0,0$

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$).

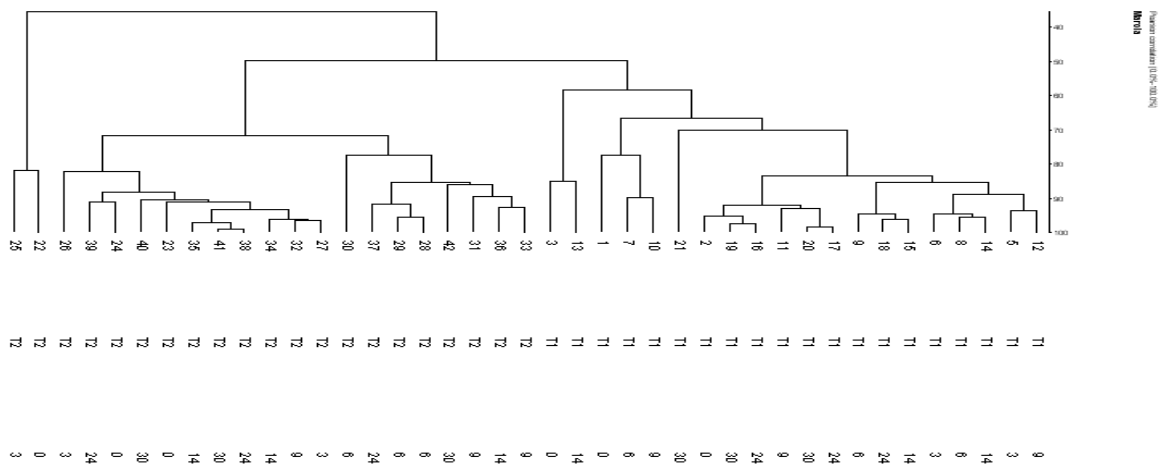


Figura 1. Dendrograma obtido a partir da análise do padrão de bandas dos géis de DGGE da microbiota intestinal de exemplares de *Oreochromis niloticus* alimentados com uma dieta comercial (Controle) e exemplares alimentados com a dieta suplementadas com *Enterococcus casseliflavus* EC30 por 30 dias e submetidos a desafio com *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36.

Varios autores demonstraram que um probiótico viável pode modular a microbiota do trato gastrointestinal em peixes e outros animais (FERGUSON et al., 2010; LIU et al., 2013.; SUN et al., 2011b.; TAPIA-PANIAGUA et al., 2010).

As alterações na microbiota do trato intestinal observadas em diversos animais aquáticos submetidos a dietas com probióticos, sugerem uma melhor “imunocompetência”, ou seja, que estes animais estão mais preparados para combater enfermidade ou adversidade no ambiente de cultivo que outros que não receberam a dieta suplementada, como foi verificado neste trabalho, quando os animais foram desafiados (MERRIFIELD et al., 2010; RINGO et al., 2010; DE MEDINA et al., 2013; TASHIBANA et al., 20014).

Utilizando técnicas de PCR-DGGE, Tapia-Paniagua et al. (2010) observaram que o administração dietética de *Shewanella putrefaciens* PDP11 exerceu grande influência sobre o epitélio da microbiota, estabilizando a comunidade bacteriana em peixes *Solea senegalensis*, já em testes com tilápias Ferguson et al. (2010), administrando uma dieta suplementada com *Pediococcus acidilactici* durante 32 dias, observou a redução significativa da diversidade microbiana intestinal. Recentemente, Liu et al. (2013) testaram os *Lactobacillus brevis* JCM 1170 (HALB) e o *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 (LALB), observando que o primeiro demonstrou alta aderência a mucosa dos juvenis tilápia, enquanto que o segundo *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 (LALB) obteve uma baixa aderência da mucosa.

Observa-se ainda que ao ofertar bactérias viáveis aos animais a microbiota pode ser modulada favorecendo o aumento das comunidades de outros possíveis patógenos (RINGO et al., 2007; TAPIA-PANIAGUA et al. 2010; YANG et al., 2012; SUN et al., 2014).

Com relação ao desempenho zootécnico dos animais, quanto ao ganho de peso não foi observada diferença significativa.

4.0 Conclusões

O *Enterococcus casseliflavus* EC30 neste estudo, utilizado como probiótico para alevinos de tilápia do Nilo conseguiu se fixar e proliferar na microbiota intestinal.

Enterococcus Caseliflavus EC30 exerceu função probiótica para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochomis niloticus*).

5.0 Considerações Finais

O EC30 por representar parte da microbiota natural de alevinos tilápias e que faz parte desta mesmo pós suspensão do alimento suplementado, atuando de maneira sutil na modulação da microbiota intestinal permitindo uma ampla diversidade de outros microrganismos.

Entretanto, para ser indicado como probiótico de uso comercial é necessária a realização mais estudos, em diversas fases e manejos de produção, bem como um estudo mais detalhado e amplo da microbiota após modulação.

Observamos que a microbiota modulada de maneira sutil, mantendo sua diversidade pode ser uma consequência desejável pois, quanto maior a diversidade microbiana existente maior o incremento quanto a produtividade, eficiência alimentar, sem alterar a qualidade de água do sistema de produção e estímulo ao sistema imune.

REFERÊNCIAS

BASANTA, A.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ-SALA, B.; HERRANZ, C.; HERNÁNDEZ, P.E.; CINTAS, L.M. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p. 293–307, 2008.

BUNTIN, N.; CHANTHACHUM, S.; HONGPATTARAKERE, T. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiótico. Songklanakarin **Journal of Science and Technology**, v. 30 (Suppl.1), p. 141-148, 2008.

CARVALHO, JV; LIRA, AD; COSTA, SP; MOREIRA ELT, PINTO, LFB; ABREU RD; ALBINATI, RCB. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do -Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, ;12(1):176-187,2011.

DIMITROGLOU, A; MERRIFIELD, DL; CARNEVALI, O; PICCHIETTI, S; AVELLA, M; DANIELS, CL; GÜROY, D; DAVIES, SJ. Microbial manipulations to improve fish health and production: A Mediterranean perspective. **Fish and Shelfish Immunology**, 2011;30:1-16. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.009>. Acesso em 22 de agosto de 2016.

FLORES-MIRANDA, M.C.; LUNA-GONZALEZ, A.; CAMPA-CÓRDOVA, A.J.; GONZALEZ-OCAMPO, H.A.; FIERRO-CORONADO, J.A.; PARTIDA-ARANGURE, B.O. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. **Aquaculture**, v.320, p.51-55, 2011.

FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, n.151, p.125–140, 2011.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 515-528, 2010.

KRUMMENAUER D, ABREU PC, LARA G, POERSCH L, ENCARNACAO P, WASIELESKY JR W. The Effect of Probiotic in *Litopenaeus vannamei* Biofloc Technology Culture System contaminated with *Vibrio parahaemolyticus*. **Abstract World Aquaculture Conference**, Mexico, 2009.

LAUKOVÁ, A. Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing *Enterococcus* and their bacteriocins In: LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V. Lactic Acid Bacteria – **Microbiological and functional aspects**. 4 ed, Boca Raton, Londres: RC, p.39-61,2012.

LAVORANTE, B. R. B. O; SANTOS P. N.; MENDES, P. T. S.; MENDES, E. S. Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n. 7, p. 738-745, 2009.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L.. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1201-1207, 2008.

MENDES, E. S.; LIRA, S.; GÓES, M. N. B.; DOURADO, J; MENDES, P. P; BEZERRA, C. A. *Vibrio* spp. isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1191-1199, 2009.

MERRIFIELD, D L; DIMITROGLOU, A; FOEY, A; DAVIES, S.J; BAKER, RTM; BOGWALG, J; CASTEX, M; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, 2010;302:1-18. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>. Acesso em 2 de agosto de 2016.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G.A.; PANCHENIAK, E.M.G.; SOCCOL, E.F.R.C.. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v.264, p.70-78, 2006.

SUZER, C; ÇOBAN, D; KAMACI, HO; SAKA, S; FIRAT, K; OTGUCUOĐLU, O; KÜÇÜKSARI, H. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities.

Aquaculture,;280:140–145,2008Disponívelem:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.020>. Acesso em 20 dezembro de 2016

STERN, N.J.; SVETOCH, E.A.; ERUSLANOV, B.V.; PERELYGIN, V.V.; 388 MITSEVICH, E.V.; MITSEVICH, I. P.; POKHILENKO, V.D.; LEVCHUK, V.P.; SVETOCH, O.E.; SEAL B. S. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 50(9), 3111-3116, 2006.

VIEIRA, FN; JATOBÁ, A; MOURIÑO, JLP; VIEIRA, PA; SOARES, M; SILVA, BC; SEIFFERT, WQ; MARTINS, ML; VINATEA, LA. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,;48(8):998-1004,2013.Disponível:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800027>. Acesso em 20 agosto de 2016.

VERSCHUERE, L; ROMBAUT, G; SORGELOOS, P; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular**

Biology Reviews, 2000;64:655-671. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99008/>. Acesso em 20 de maio de 2014.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T.
Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. **Journal of Fish Diseases**, v.27, p.319-326, 2004.