

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO
INTESTINO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Suzana Kotzent

Bióloga

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO
INTESTINO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Suzana Kotzent

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabiana Pilarski

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

2017

Kotzent, Suzana
K87b Bactérias com potencial probiótico do intestino de tambaqui
(*Colossoma macropomum*) / Suzana Kotzent. -- Jaboticabal, 2017
vi, 48 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: José Luiz Pedreira Mouriño, Manoel Victor
Franco Lemos
Bibliografia

1. Aquicultura. 2. *Enterococcus hirae*. 3. *Lactococcus lactis*. 4.
Pediococcus pentosaceus. 5. *Staphylococcus hominis* I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO INTESTINO DE TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*)

AUTORA: SUZANA KOTZENT

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
Centro de Aquicultura - CAUNESP / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JOSE LUIZ PEDREIRA MOURIÑO
UFSC / Florianópolis, SC

Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Suzana Kotzent - Nascida em Ribeirão Preto/SP, no dia 26 de dezembro de 1988, graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Universidade Santa Cecília – Santos/SP, em 2010. Em março de 2015 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal (SP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Fabiana Pilarski pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao Luís Carlos Fernandes Junior pelo apoio, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus pais Claudia e Francisco, aos meus irmãos Pedro, Marina e Gabriela e minha avó Narmia pelo apoio e torcida.

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da UNESP: Valdecir (Peixes Ornamentais), Márcio (Ranicultura), Silvinha (Laboratório Central) e Elaine, por estarem sempre à disposição para ajudar.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura – CAUNESP, pela ajuda no trabalho e pelo companheirismo durante todo este tempo.

Aos professores das disciplinas cursadas pelos ensinamentos.

Aos membros das Bancas de Qualificação: Everlon Cid Rigobelo e Diogo Teruo Hashimoto e de Defesa: José Luiz Pedreira Mouriño e Manoel Victor Franco Lemos, pelas correções e ensinamentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de tabelas.....	v
Lista de figuras.....	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	
Introdução.....	1
Objetivo.....	2
Revisão de Literatura.....	2
Aquicultura	2
Tabaqui: Características e Status Sanitário.....	3
Probióticos na Aquicultura: Status Atual e Método de Seleção de Potenciais Probióticos.....	5
<i>Staphylococcus hominis</i>	9
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10
<i>Enterococcus hirae</i>	10
<i>Lactococcus lactis</i>	11
Referência	12
CAPÍTULO 2 – Seleção preliminar de candidatos à probióticos para <i>Colossoma macropomum</i>	
Resumo.....	24
Introdução	25
Material e Métodos.....	26
Resultados.....	31
Discussão.....	39
Referências.....	40
CAPÍTULO 3 – Considerações finais.....	48



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Utilização de bactérias ácido-lácticas probióticas isoladas do trato intestinal de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**", protocolo nº 1615/16, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 16 de fevereiro de 2016.

Vigência do Projeto	28/02/2016 a 30/02/2017
Espécie / Linhagem	<i>Colossoma macropomum</i>
Nº de animais	495
Peso / Idade	5-10g
Sexo	Indefinido
Origem	Laboratório de Reprodução de peixes nativos - CAUNESP

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO INTESTINO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

RESUMO – Os probióticos são microrganismos vivos que afetam de forma benéfica o hospedeiro ou o ambiente. Na aquicultura podem ser usados tanto na água como na ração, mas seu uso na alimentação é destacado como uma das principais medidas profiláticas. As doenças bacterianas são consideradas um dos principais entraves no crescimento da aquicultura, e assim, há a necessidade urgente no desenvolvimento de probióticos. O tambaqui *Colossoma macropomum* é a espécie nativa mais produzida no Brasil, e apesar de sua importância econômica, não há estudos que estabeleçam os microrganismos com potencial probiótico para esta espécie de peixe. Neste trabalho foi possível identificar e caracterizar bactérias autóctones com potencial probiótico para o tambaqui a partir de testes de: caracterização morfológica, catalase, tolerância à bile, antagonismo frente à patógenos, sensibilidade a antimicrobianos e sequenciamento do gene 16S rRNA. As cepas selecionadas foram: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus saprophyticus*. Todas as cepas foram tolerantes aos ácidos biliares do tambaqui e capazes de inibir o crescimento dos patógenos *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae* e *Aeromonas hydrophila*. Todas as cepas foram parcialmente resistentes contra sete antibióticos. Como as cepas de *S. saprophyticus* e *E. faecalis* apresentaram menores valores no teste de antagonismo e por estas bactérias serem relatadas como agentes zoonóticos, concluímos este estudo selecionando quatro potenciais cepas: *E. hirae*, *L. lactis*, *P. pentosaceus*, *S. hominis*. Este é o primeiro estudo a referir o potencial uso probiótico de cepas autóctones para o tambaqui.

Palavras-chave: aquicultura, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis*

BACTERIA WITH PROBIOTIC POTENTIAL OF THE TAMBAQUI INTESTINE (*Colossoma macropomum*)

ABSTRACT - Probiotics are living microorganisms that beneficially affect the host or the environment. In aquaculture it can be used in both water and feed, but its use in feed is highlighted as one of the main prophylactic measures. Bacterial diseases are considered to be one of the major obstacles to the growth of aquaculture, and thus, there is an urgent need for the development of probiotics. The tambaqui *Colossoma macropomum* is the most produced native species in Brazil, and despite its economic importance, there are no studies that establish the microorganisms with probiotic potential for this fish species. In this study it was possible to identify and characterize autochthonous bacteria with probiotic potential for tambaqui from tests of: morphological characterization, catalase, bile tolerance, antagonism of pathogens, antimicrobial susceptibility and 16S rRNA gene sequencing. The selected strains were: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*. All strains were tolerant to acids bile from tambaqui and capable of inhibiting the growth of *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila* pathogens. All strains were partially resistant against seven antibiotics. Since the strains of *S. saprophyticus* and *E. faecalis* presented lower values in the test of antagonism and because these bacteria were reported as zoonotic agents, we conclude this study selecting four potential strains: *E. hirae*, *L. lactis*, *P. pentosaceus*, *S. hominis*. This is the first study to mention the potential probiotic use of autochthonous strains for tambaqui.

Keywords: aquaculture, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis*

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1.** Identificação molecular dos isolados bacterianos intestinais de tambaqui *Colossoma macropomum*.....33
- Tabela 2.** Tolerância das cepas bacterianas a duas concentrações de bile de tambaqui *Colossoma macropomum*. Valores em UFC/mL.....34
- Tabela 3.** Atividade antagonista dos isolados probióticos contra os patógenos: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas fulva*. Valores dos diâmetros dos halos de inibição em mm.....36
- Tabela 4.** Atividade antibacteriana dos isolados probióticos contra os patógenos: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas fulva*. Valores dos diâmetros dos halos de inibição em mm.....37
- Tabela 5.** Susceptibilidade à antimicrobianos: Enrofloxacina (5µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Sulfazotrim (25 µg), Amoxicilina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg). Valor do halo de inibição em mm.....38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cepa de <i>Aeromonas hydrophila</i> , demonstrando resistência para alguns antimicrobianos na primeira foto e na segunda foto aparecimento de algumas colônias resistentes.....	3
Figura 2. Placas mostrando o teste de ação antagonista das cepas probióticas (no botão de ágar) contra a cepa patogênica (desenvolvida na placa), medida através do halo formado em volta do botão.....	7
Figura 3. Placas mostrando hemólise, as cepas 12 e 77 são gama-hemólise, as cepas 9, 10, 11 e 80 são alfa-hemólise e as cepas 78 e 79 são beta-hemólise.....	7

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

A aquicultura é um setor da produção animal que vem crescendo rapidamente e está se tornando um dos principais contribuintes da produção mundial de alimentos (Zorriehzahra et al., 2016). No Brasil, a demanda pelo pescado vem aumentando muito nos últimos anos, e esta procura faz com que produtores ampliem a produção na mesma área de cultivo. Considerando o aspecto sanitário aquícola, o adensamento, faz com que a carga de matéria orgânica presente na água se intensifique propiciando a ocorrência de doenças associadas às altas densidades.

Dentre essas enfermidades, destacam-se as bacterioses causadas por *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae*. Para o controle dessas doenças, é feito o uso de antibióticos, que podem ser incorporados à ração (para animais de engorda) ou na água de cultivo (para alevinos). Porém a utilização destes antimicrobianos causa um grande impacto no ambiente aquático, devido aos resíduos liberados na água, causam seleção de microrganismos resistentes, além de deixar resíduos nas carcaças que são uma barreira para exportação para os Estados Unidos e Europa (Figueiredo; Leal, 2008).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie nativa mais produzida no país, e comumente produzida em outros países da América do Sul, possui várias características produtivas desejáveis, como ser domesticada, onívora e de fácil reprodução, com grande potencial para alcançar altos níveis de produção (Valladão; Gallani; Pilarski, 2016). Porém, é uma espécie que não tolera grandes variações térmicas e sofre com o aparecimento de enfermidades (Moro et al., 2013).

O uso de probióticos para aquicultura e para esta espécie de peixe é uma alternativa profilática viável ao uso de quimioterápicos. Já que os probióticos estão entre os alimentos funcionais mais utilizados na aquicultura, assim como os prebióticos e os imunostimulantes.

Objetivo

Em vista da necessidade de produtos profiláticos para serem utilizados na produção de tabaquis, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar cepas autóctones com potencial probiótico.

Revisão de Literatura

Aquicultura

A aquicultura é o segmento da produção animal que mais cresce no cenário mundial, o crescimento anual médio é de 8,8% desde 1970, superando as taxas de crescimento da bovinocultura, avicultura e suinocultura (Crepaldi et al., 2007). A produção mundial é liderada por países asiáticos, principalmente a China, no ranking mundial o Brasil se encontra na décima quarta posição (FAO, 2016). Dentre os países da América do Sul, o Brasil é o segundo país mais produtivo do setor, perdendo apenas para o Chile (Brasil, 2013).

Com a crescente procura por pescado, há intensificação nos sistemas de produção, elevando a densidade de animais. Esta intensificação expõe os peixes a alterações na qualidade de água e a intensivas práticas de manejo (Chagas et al., 2009), isso causa estresse nos animais, causando desequilíbrio da tríade patógeno – hospedeiro – ambiente (Toranzo et al., 2004). O estresse de cultivo é inerente na aquicultura, podendo imunossuprimir os animais e deixando-os susceptíveis a diversos agentes patogênicos. Geralmente os agentes patogênicos primários são parasitos, que abrem porta de entrada para patógenos secundários como bactérias e fungos.

As principais bactérias causadoras de doenças na aquicultura e responsáveis por grandes perdas econômicas são *Aeromonas* móveis, *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus agalactiae* (Figueiredo; Leal, 2008). Na tentativa de controle das doenças, os produtores utilizam, de forma indiscriminada, um grande número de

antimicrobianos, que colocam em risco toda a cadeia produtiva, por deixar resíduos no pescado, além de comprometer a saúde dos peixes e o meio ambiente, podendo provocar o aparecimento de cepas resistentes a esses medicamentos (Figura 1) (Levy; Marshall, 2004). Em função destes e outros problemas advindos da utilização de antimicrobianos, sejam de ordem econômica, metodológica ou sanitária, devem ser estudadas alternativas que promovam a diminuição da utilização de quimioterápicos na aquicultura, sem causar perdas de produtividade e qualidade final do pescado (Meurer, 2005).

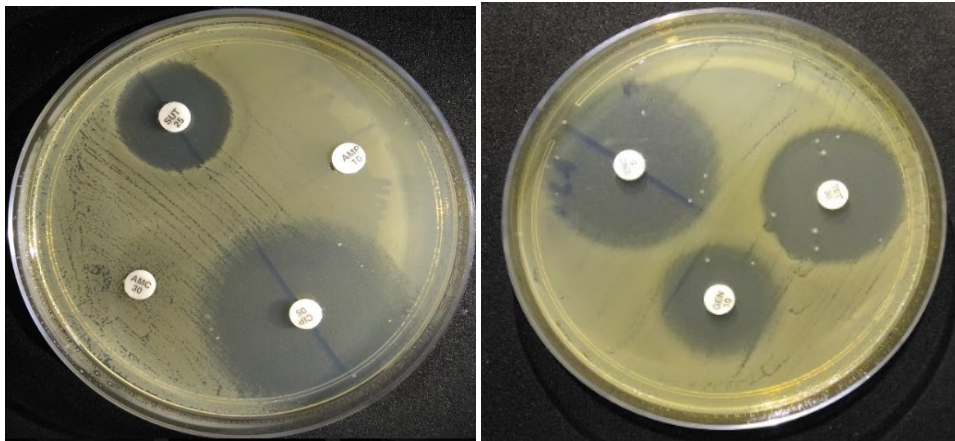


Figura 1. Cepa de *Aeromonas hydrophila*, demonstrando resistência para alguns antimicrobianos na primeira foto e na segunda foto aparecimento de algumas colônias resistentes.

Como alternativa ao uso de antimicrobianos, a utilização de alimentos funcionais vem se intensificando, pois favorecem não só a nutrição básica, mas também promovem o aumento da eficiência alimentar e taxa de crescimento, associados muitas vezes à melhoria da saúde desses animais. Dentre os alimentos estratégicos utilizados na aquicultura, estão os imunonutrientes (vitaminas e minerais), imunoestimulantes, prebióticos e os probióticos (Oliveira et al., 2002).

Tambaqui: Características e Status Sanitário

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), é um peixe da Classe Osteichthyes, Subclasse Actinopterygii, Ordem Characiformes, Família Characidae e Subfamília Serrasalminae. É uma espécie nativa da América do Sul, dos rios Amazonas e Orinoco. É a segunda maior espécie de peixe de escamas da América

do Sul (podendo medir 1 metro e pesar até 30 quilos), perdendo apenas para o *Arapaima gigas*. O tambaqui é a segunda espécie de peixe mais produzida no Brasil, perdendo apenas para *Oreochromis niloticus*, uma espécie exótica (Brasil, 2013).

Na natureza, habita águas escuras ricas em nutrientes, com temperaturas elevadas, entre 25°C a 34°C, é uma espécie resistente a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (Embrapa, 2011). É uma espécie onívora com tendência a consumir sementes, folhas ou frutos (Baldisserotto; Gomes, 2005), e diferente do parente próximo *Piaractus mesopotamicus*, o tambaqui consegue aproveitar alimentos naturais como o zooplâncton mesmo quando adultos, por possuírem rastros branquiais bem desenvolvidos (Lima; Golding, 1998), assim apresentando o maior crescimento dentre os peixes redondos nativos (Valladão; Gallani; Pilarski, 2016). Esta característica faz desta espécie uma das de maior interesse entre pesquisadores e produtores, além da fácil adaptação à produção intensiva e principalmente, por sua carne ser muito apreciada e com alto valor nutricional (Mendonça et al., 2012). Além de ser a espécie mais produzida na região Norte do Brasil, sua criação tem se expandido nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste (Ibama, 2005).

Esta espécie é susceptível a ectoparasitas, endoparasitas e bacterioses, principalmente quando é criada fora da região Norte do país, onde as temperaturas são mais amenas e oscilam mais durante o dia (Moro et al. 2013). De fato, um dos principais fatores limitantes em qualquer cultivo intensivo, não só no de tambaqui, é a perda de animais devido às enfermidades. Mas em aquicultura este fator é ainda mais agravante, pois as doenças que afetam os peixes são facilmente transmitidas de um animal para o outro, causando graves perdas econômicas em intervalos de tempo extremamente curtos (Somerset et al., 2005).

Uma das alternativas seria o desenvolvimento de produtos sustentáveis específicos para a espécie. Os métodos tradicionais de tratamento, como o uso de antibióticos, têm sido questionados na aquicultura, já que seu uso vai além do óbvio no tratamento de enfermidades, mas também é utilizado objetivando a prevenção de doenças (profilaxia) e aumento do ganho de peso (Van den Bogaard; Stobberingh; 2000 e Kesarcodi-Watson et al. 2008). Os métodos preventivos convencionais como

o uso de probióticos e imunostimulantes têm ganhado cada vez mais destaque no setor.

Dentre os patógenos oportunistas de peixes de água doce, a bactéria *Aeromonas hydrophila* é um dos mais importantes, causando quadros de septicemia hemorrágica. As doenças causadas por *A. hydrophila* se destacam não só mundialmente (Zhang et al., 2014), mas também são classificadas como um dos principais agentes infecciosos de peixes redondos nativos (Sebastião, 2015).

Ainda, como a patogênese de *A. hydrophila* é considerada complexa e multifatorial (Citterio; Biavasco, 2015), uma vez que afeta o sistema de criação, é difícil de ser controlada (Jeney et al., 2011). Além disso, seus isolados apresentam características de resistência tanto para diversos antibióticos e anti-sépticos, como também contra desinfetantes (Viswanatan et al., 2015). Compreendida por múltiplas cepas, sua heterogeneidade (Cipriano; Bullock; Pyle, 1984) dificulta o desenvolvimento de vacinas (Plant; LaPatra, 2011) e também torna os métodos profiláticos extremamente complexos (Jeney et al., 2011). Desta forma, torna-se importante a otimização de métodos preventivos, como a utilização de probióticos.

Probióticos na Aquicultura: Status Atual e Método de Seleção de Novos Probióticos

O termo probiótico é originário das palavras Gregas “pro” e “bios” que em conjunto querem dizer “para a vida”. Probiótico foi definido pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) como “substâncias secretadas por um microrganismo, a qual estimula o crescimento de outro”. Posteriormente, Fuller (1989) os definiu como “produtos constituídos por microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo equilíbrio na microbiota intestinal”. Ainda, Merrifield et al. (2010) propõe que probiótico é qualquer célula microbiana viva que beneficia o hospedeiro quando fornecida através da dieta ou água de cultivo. Este benefício é alcançado através da melhora do equilíbrio da microbiota intestinal. Nesse contexto, são considerados os benefícios diretos como a imunostimulação, melhora da resistência a doenças, redução da resposta ao estresse e melhora da morfologia do trato gastrointestinal, além disso, melhora o desempenho de crescimento, a

utilização dos alimentos, causando ainda, aumento da qualidade da carne e carcaça e redução de malformações.

A utilização de probióticos é um método sustentável e promissor para o controle de doenças em peixes, pois pode ser uma alternativa ao uso de produtos químicos e antimicrobianos (Akhter et al., 2015), que é uma das grandes problemáticas na piscicultura atual. O uso abusivo de antimicrobianos coloca em risco toda a cadeia produtiva, pois pode deixar resíduos no pescado, além de comprometer a saúde de peixes e outros animais não alvos e também o meio ambiente, podendo provocar o aparecimento de cepas resistentes a esses medicamentos (Levy; Marshall 2004).

A maior problemática dos probióticos utilizados para alimentação de peixes é que os produtos disponíveis no mercado são preparados com isolados probióticos oriundos de outras espécies, como suínos e aves, e por isso, são algumas vezes considerados ineficazes (Ghosh; Sinha; Sahu, 2007 e Ramesh et al., 2015). De fato, o uso de probióticos na aquicultura pode ser feita com microrganismos de origem do próprio hospedeiro ou não (Lazado; Caipang, 2014; Lazado; Caipang; Estante, 2015), porém, a utilização desses microrganismos de origem autóctone do hospedeiro faz com que os benefícios sejam alavancados, pois os microrganismos já possuem familiaridade com o ambiente, salinidade e temperatura (Zorriehzakra et al., 2016). Por isso, a utilização de probióticos universais não é recomendada.

Os probióticos agem conferindo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro e ao ambiente (Merrifield et al., 2010; Wu et al., 2015), estas substâncias auxiliam no estabelecimento da microflora benéfica, atuando como barreira à fixação e movimentação de bactérias patogênicas, antígenos e outras substâncias nocivas ao epitélio intestinal (Lazado; Caipang, 2014). Podem ainda, agir na prevenção de enfermidades, diminuindo a carga bacteriana através da competição por pontos de alocação no epitélio ou produção de substâncias inibidoras (ácidos orgânicos e bacteriocinas), podem melhorar a imunidade inata, como o sistema de complemento sérico, atividade de lisozima, atividade de fagocitose e atividade do “burst” respiratório, sendo estas umas das principais características benéficas de seu uso na aquicultura (Srivastava; Pandey, 2015). Além disso, os probióticos modulam as citocinas liberadas pelas células imunes inatas e adaptativas (Lazado; Caipang,

2014), além de produzir enzimas digestivas suplementares (Verschuere et al., 2000), melhorando também a qualidade da água (Balcázar et al., 2006).

Para que um microrganismo seja considerado um potencial probiótico, ele deve ser selecionado com base em suas características e na sua resposta a alguns testes específicos como, conseguir colonizar o trato gastrointestinal do hospedeiro, ser antagonista a algumas cepas patogênicas de interesse (Figura 2), também é importante que seja tolerante à bile, para conseguir sobreviver e se desenvolver no trato gastrointestinal do animal (Balcázar et al., 2008), ela não deve ser hemolítica (Figura 3), pois a hemolisina é um fator de virulência comum entre os patógenos, provocado anemia e edema no hospedeiro para tornar o ferro disponível para seu metabolismo (Ouwehand et al., 2005).

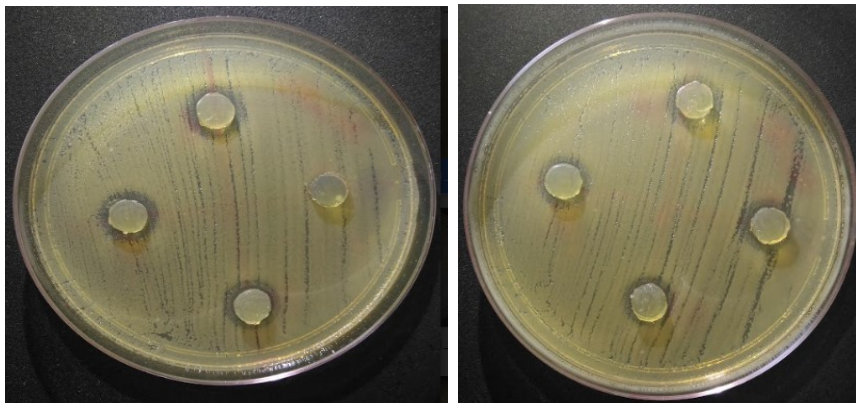


Figura 2. Placas mostrando o teste de ação antagonista das cepas probióticas (no botão de ágar) contra a cepa patogênica (desenvolvida na placa), medida através do halo formado em volta do botão.

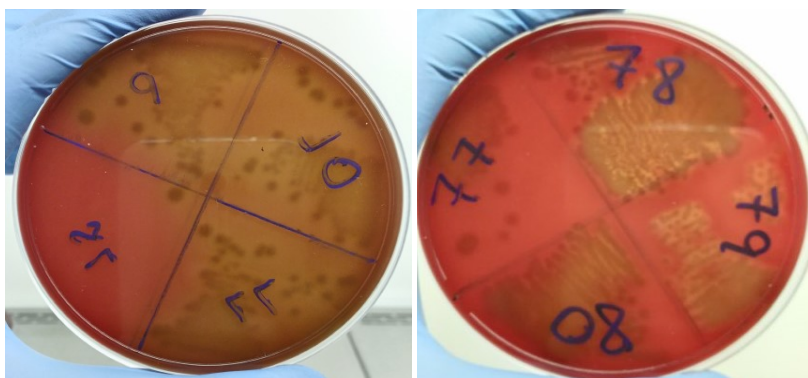


Figura 3. Placas mostrando hemólise, as cepas 12 e 77 são gama-hemólise, as cepas 9, 10, 11 e 80 são alfa-hemólise e as cepas 78 e 79 são beta-hemólise.

Alguns gêneros de microrganismos que já foram usados como probióticos são *Saccharomyces*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Shewanella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Aeromonas* (Nayak, 2010).

Vários microrganismos já foram testados e diversos autores relatam seus efeitos benéficos. Sugita et al. (2007) a exemplo, isolou duas cepas de *L. lactis* do intestino de *Silurus asotus* e observou que as ambas podiam inibir o crescimento de *A. hydrophila* através da produção de peróxido de hidrogênio, demonstraram assim, potencial para serem utilizadas como probiótico para esta espécie de peixe.

Nandi et al. (2016) isolou duas cepas de *Bacillus sp.* do trato gastrointestinal de quatro espécies de peixes de água doce, as quais apresentaram boa atividade antagonista contra *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sóbria* e *A. fluorescens*, além de produzirem enzimas digestivas, não serem hemolíticas, resistentes à bile e exibirem atividade antimicrobiana contra patógenos potentes de peixes.

Thankappan et al. (2015) isolou *Bacillus spp.* do trato gastrointestinal de *Labeo rohita*, os isolados foram testados *in vitro*, com os seguintes testes, atividade antimicrobiana, tolerância à baixo pH e sal biliar, ensaio de hidrofobicidade, ensaio de autoagregação, tolerância ao suco gástrico, susceptibilidade à antibióticos, atividade proteolítica e amilolítica, catalase e teste hemolítico e *in vivo*, onde foram inoculados com 10^8 UFC/mL⁻¹, o teste de patogenicidade, confirmou a segurança dos isolados probióticos.

Mouriño et al. (2016) isolou *Weissella cibaria* do intestinos do híbrido de *Pseudoplatystoma reticulatum* X *Pseudoplatystoma corruscans*, obtendo bons resultados *in vitro*, onde testou seu antagonismo contra *A. hydrophila* e outras cepas patogênicas para esta espécie de peixe, analisou ainda a fermentação de carboidratos e *in vivo*, foi adicionada em dieta comercial na concentração de 10^6 UFC/g⁻¹, a contagem de glóbulos vermelhos em peixes alimentados aumentou significativamente em relação aos peixes não alimentados, desta forma concluindo que esta espécie bacteriana é promissora para a aquicultura de surubim.

Outros gêneros como *Staphylococcus*, *Pediococcus* e *Enterococcus* também são promissores para utilização como probiótico.

Staphylococcus hominis

Staphylococcus hominis é uma bactéria do Filo: Firmicutes, Classe: Bacilli, Ordem: Bacillales e Família: Staphylococcaceae. São células esféricas com 1,0 - 1,5 µm de diâmetro, sua apresentação é individual, aos pares ou em arranjos tétrades. São Gram-positivos, imóveis, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não-hemolíticos, quimiorganotróficos com metabolismo respiratório e fermentativo. As colônias são geralmente opacas, podendo variar sua coloração (branca, creme, amarela ou laranja), geralmente catalase positiva. A temperatura ótima varia entre 30°C a 37°C (Kloos; Schleifer, 1975). Estão entre os microrganismos não esporulados mais resistentes.

Espécies deste gênero podem ser classificadas como *Staphylococcus* coagulase-positivo (CoPS) ou *Staphylococcus* coagulase-negativo (CoNS). São relatados como microbiota normal de mamíferos e aves, embora possam se comportar como patógenos oportunistas que podem causar pequenas ou graves infecções (Gómez et al., 2016). *Staphylococcus hominis* foi isolada pela primeira vez por Kloos e Schleifer (1975) da pele humana e é um *Staphylococcus* coagulase-negativa. Esta bactéria já foi utilizada como probiótico contra *Staphylococcus aureus* isolados da vagina de mulheres saudáveis (Sung et al., 2010), mas ainda não há relatos desta espécie sendo utilizada diretamente na piscicultura. Porém, Rajeswari et al. (2016) descreve um metabólito secundário de *S. hominis*, que é um biossurfactante fosfolipopeptídico que foi utilizado em *Oreochromis mossambicus* como um imunoestimulante promissor, que pode ser utilizado na aquicultura para prevenir doenças e surtos de doenças.

O efeito de uma espécie probiótica sobre a flora intestinal é provavelmente determinado pela produção de bacteriocinas (Angelakis, 2016). A bacteriocina de *S. hominis* é a homicina, um peptídeo antimicrobiano que segundo Kim et al. (2010) pode ser um terapêutico alternativo ao uso de alguns antibióticos, pois exibe espectro antibacteriano contra várias espécies Gram-positivas que são resistentes a antibióticos.

Pediococcus pentosaceus

Pediococcus pentosaceus é uma espécie bacteriana do Filo: Firmicutes, Classe: Bacilli, Ordem: Lactobacillales e Família: Lactobacillaceae. São cocos, medem de 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, apresenta-se em forma tetraédricas, pois sua divisão ocorre em duas direções. São Gram-positivos, imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, não-hemolíticos, caracterizadas como ácido-lácticas, a temperatura para seu crescimento pode variar de 35°C a 40°C.

A pediocina, uma das bacteriocinas produzidas por *P. pentosaceus* é muito associada à fermentação de alguns alimentos como chucrute, pepinos em conserva, azeitonas e missô, a fermentação tem efeito de preservação, como também ajuda na melhora nutricional e nas propriedades físico-químicas dos alimentos, otimizando a qualidade nutricional e desempenho funcional da matéria prima (Knorr, 1998).

Xu et al. (2010) descreve a utilização da pentocina, outra bacteriocina produzida por *P. pentosaceus* na conservação de salsicha de carpa prateada, por conta da produção de ácidos orgânicos (ácido láctico), contribuindo para melhora da textura da carne, sabor e inibe crescimento de microrganismos indesejáveis.

Na aquicultura *P. pentosaceus* já foi utilizada na alimentação de *Epinephelus coioides*, inibindo o crescimento de *Vibrio anguillarum* em seu intestino e aumentando a taxa de crescimento, além de melhorar a imunidade inata. Em *Rachycentron canadum*, a alimentação com *P. pentosaceus* aumentou significativamente a taxa de crescimento e a taxa de sobrevivência de animais desafiados contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Xing et al., 2013). Entretanto, na aquicultura continental não há relatos, até o momento, da utilização desta espécie como probiótico.

Enterococcus hirae

Enterococcus hirae é uma espécie bacteriana do Filo: Firmicutes, Classe: Bacilli, Ordem: Lactobacillales e Família: Enterococcaceae. São cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados, não-hemolíticos, ácido-láctico,

conseguem viver em temperaturas de 5°C a 65°C, porém para seu crescimento ótimo, a temperatura deve estar entorno de 35°C e pH entre 4,5 a 10, com o pH ótimo em torno de 7,0. Com estas características conseguem sobreviver numa ampla gama de habitats (Fisher; Phillips, 2009; Gupta; Tiwari, 2015).

Sua bacteriocina é conhecida como hircina, é bastante estudada por possuir atividade antibacteriana contra patógenos transmitidos por alimentos, como a *Listeria monocytogenes* (Sánchez et al., 2008).

Foi descrita pela primeira vez por Farrow e Collins (1985) causando depressão no crescimento de galinhas jovens. *Enterococcus hirae* pode causar enteropatias em ratos (Etheridge; Vonderfecht, 1992), diarreia em cachorros filhotes (Collins et al., 1988) e em pintinhos (Kondo et al., 1997). Há também um único relato desta espécie causando enteropatia, colangite e pancreatite em gato (Lapointe et al. 2000). Apesar de ser encontrada na flora intestinal humana, raramente esta associada a infecções (Blaimont; Charlier; Wauters, 1995).

Arokiyaraj et al. (2014) isolou *E. hirae* de rúmen bovino que demonstrou propriedades anti-microbianas e anti-inflamatórias, além de outras propriedades positivas de potencial probiótico. Concluindo que podem ser utilizadas como alimento probiótico para controle das infecções intestinais, na digestão, além de melhorar o sistema imunológico do hospedeiro.

Não há relatos na literatura desta espécie bacteriana sendo utilizada na aquicultura.

Lactococcus lactis

Lactococcus lactis é uma espécie bacteriana do Filo: Firmicutes, Classe: Bacilli, Ordem: Lactobacillales e Família: Streptococcaceae. São cocos Gram-positivos, medem de 0,5 a 1,5 µm, não esporulados, imóveis, hemólise-negativa, são ácido-lácticos, crescem em temperaturas entre 30°C e 40°C, com a temperatura ótima em torno de 37°C.

Segundo Ringø e Gatesoupe (1998), a nisina, bacteriocina da *L. lactis* é a bacteriocina mais conhecida e estudada. Esta bacteriocina é a única utilizada comercialmente como agente natural de conservação de alimentos (Moreno;

Lerayer; Leitão, 1999). Amplamente utilizada no emprego de fabricação de queijos, manteiga e leite coalhado (Nascimento; Moreno; Kuaye, 2008 e Mierau; Kleerebezem, 2005).

Lee et al. (2015) isolou *L. lactis* de kimchi (comida típica coreana), com potencial probiótico para humanos, além de efeitos antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno, mantendo equilíbrio da flora intestinal. Estes resultados provam o potencial para aplicação e desenvolvimento de produtos com esta espécie.

Segundo Balcázar et al. (2008) *L. lactis*, foi isolada de *Oncorhynchus mykiss* e possui características positivas para ser utilizada como probiótico na aquicultura. Sugita et al. (2007) também observou características probióticas em duas cepas de *L. lactis* isoladas de *Silurus asotus*, além de terem inibido o crescimento de *A. hydrophila*. Zhou, Wang e Yao (2010) descrevem atividade antimicrobiana de *L. lactis*, isolada de *O. niloticus* sobre *A. hydrophila*, além de aumentar o ganho de peso e as respostas imunológicas.

REFERENCIAS:

AKHTER, N.; WU, B.; MEMON, A. M.; MOHSIN, M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45 n. 2, p. 733–741, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>.

ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. **Microbial Pathogenesis**. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002>.

AROKIYARAJ, S.; IBRAHIM, V.; ISLAM, H.; BHARANIDHARAN, R.; RAVEENDAR, S.; LEE, J.; KIM, D. H.; OH, Y. K.; KIM, EK.; KIM, K. H. Antibacterial, anti-inflammatory and probiotic potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 2111–2118, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1625-0>.

BALCÁZAR, J. L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173–186, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.

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. 278, n. 1-4, p. 188–191, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora UFMS, Santa Maria, RS, 2005.

BLAIMONT, B.; CHARLIER, J.; WAUTERS, G. Comparative distribution of *Enterococcus* species in faeces and clinical samples. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 8, p. 87–92, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/08910609509140084>.

BRASIL, 2013. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Ministério da pesca e aquicultura, 2011. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br>> Publicado em 13 de setembro de 2013.

CHAGAS, E. C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T. E. H. P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: Tavares-Dias, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Embrapa, 2009. p. 132-225.

CIPRIANO, R. C.; BULLOCK, G. L.; PYLE, S. W. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **US Fish & Wildlife Publications**, p. 134, 1984.

CITTERIO, B.; BIAVASCO, F. *Aeromonas hydrophila* virulence. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 417-418, 2015.

COLLINS, G. E.; BERGELAND, M. E.; LINDEMAN, C. J.; DUIMSTRA J. R. *Enterococcus (Streptococcus) durans* adherence in the small intestine of a diarrheic pup. **Veterinary Pathology**, v. 25, n. 5, p. 396–398, 1988.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. A situação da aqüicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, p. 81-85, 2007.

EMBRAPA. **Revisão de Literatura: Exigências nutricionais do tabaqui – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros**. ISSN: 1517-3135, 2011 Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/931300/1/Doc91.pdf>. Acessado dia: 15/12/2016.

ETHERIDGE, M. E.; VONDERFECHT, S. L. Diarrhea caused by a slow-growing *Enterococcus*-like agent in neonatal rats. **Laboratory Animal Science**, v. 42, n.6, p. 548–550, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 204, 2016. Disponível em: <<http://fao.org/3/a-i5555e.pdf>> Acessado em: 08 de Março de 2017.

FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. "Enterococcus hirae, a New Species That Includes Amino Acid Assay Strain NCDO 1258 and Strains Causing Growth Depression in Young Chickens". **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 1, p. 73–75, 1985. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-35-1-73>.

FIGUEIREDO, H. S.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37, p. 08-14, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008001300002>.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-57, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>.

FULLER, R. Probiotics in man and animal. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Isolation of putative probionts from the intestines of Indian major carps. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 59, n. 3, p. 127-132, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10524/19220>

GÓMEZ, P.; CASADO, C.; SÁENZ, Y.; RUIZ- RIPA, L.; ESTEPA, V.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Diversity of species and antimicrobial resistance determinants of staphylococci in superficial waters in Spain. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 1, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw208>

GUPTA, A.; TIWARI, S. K. Probiotic potential of bacteriocin-producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2333–2342, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1075-4>

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Produção brasileira da aquicultura continental, por estado e espécie, para o ano de 2005: Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil – Ano 2005**. Brasília: SEAP, p. 101, 2005.

JENEY, G.; ARDO, L.; RONYAI, A.; BERCSÉNYI, M.; JENEY, Z. Resistance of genetically different common carp, *Cyprinus carpio* L., families against experimental bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of fish diseases**, v. 34, n. 1, p. 65-70, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01211.x>.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; JOSIE LATEGAN, M.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274 n. 1, p. 1-14, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>.

KIM, P. I.; SOHNG, J. K.; SUNG, C.; JOO, H. S.; KIM, E. M.; YAMAGUCHI, T.; PARK, D.; KIM, B. G. Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominicin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 2, p. 133-138, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.024>.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 25, p. 62-79, 1975. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-25-1-62>.

KONDO, H.; ABE, N.; TSUKUDA, K.; WADA, Y. Adherence of *Enterococcus hirae* to the duodenal epithelium of chicks with diarrhoea. **Avian Pathology**, v. 26, n. 1, p. 189–194, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/03079459708419204>.

KNORR, D. Technological aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 295–306, 1998. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00051-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00051-X).

LAPOINTE, J. M.; HIGGINS, R.; BARRETTE, M.; MILETTE, S. *Enterococcus hirae* enteropathy with ascending cholangitis and pancreatitis in a kitten. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 282–284, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1354/vp.37-3-282>.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. **Aquaculture**, v. 424-425, p. 53-62, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.040>.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 990-998, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12414>.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M.; ESTANTE, E. G. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 1, p. 2-12, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>.

LEE, N. K.; HAN, K. J.; SON, S. H.; EOM, S. J.; LEE, S. K.; PAI, H. D. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi **LWT. Food Science and Technology**. v. 64, n. 2, p. 1036–1041, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.019>.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 1, p. 122-129, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1145>.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.147.3659.747>.

LIMA, C. A.; GOLDINNG, M. **Os frutos do tambaqui; ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Sociedade Civil Mamirauá, 1998. Brasília: CNPq. 8-20. Tefé, AM.

MENDONÇA, P. P.; VIDAL, M. V. J.; POLESE, M. F.; SANTOS, M. V. B.; REZENDE, F. P.; ANDRADE, D. R. Morphometrical development of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) under different photoperiods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000600003>.

MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER R. T. M.; BOGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1, p. 1-18, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; KAVATA, L. B.; LACERDA, C. H. F. Nível de arraçoamento para alevinos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 1835-1840, 2005.

MIERAU, I. E.; KLEEREBEZEM, M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 705–717, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0107-6>.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n.2, p. 130-136, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37141999000200008>.

MORO, GIOVANNI VITTI et al. In: **Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos**, editores técnicos, Ana Paula Oeda Rodrigues... [et al.]. Brasília, DF: Embrapa, 2013, p. 440.

MOURIÑO, J. L. P.; PEREIRA, G. V.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A. B.; USHIZIMA, T. T.; SILVA, B. C.; SEIFFERT, W. Q.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M.L. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 166–171, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.001>.

NANDI, A.; DAN, S. K.; BANERJEE, G.; GOSH, P.; GOSH, K.; RINGØ, E.; RAY, A. K. Probiotic Potential of Autochthonous Bacteria Isolated from the Gastrointestinal Tract of Four Freshwater Teleosts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-10, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-016-9228-8>.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**. v. 41, p. 1553-1573, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 1, p. 1-2, 2002.

OUWEHAND, A.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; HUYS, G.; SWINGS, J.; VANCANNEYT, M.; LAHTEENMAKI, A. The safety of probiotics in foods in Europe and its legislation. **Probiotics in food safety and human health**, p. 405–429, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1201/9781420027570.ch18>.

PLAN, K. P.; LAPATRA, S. E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1256-1262, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>.

RAJESWARI, V.; PRIYADARSHINI, S. K.; SARANYA, V.; SUGUNA, P.; SHENBAGARATHAI, R. Immunostimulation by phospholipopeptide biosurfactant from *Staphylococcus hominis* in *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 48, p. 244–253, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.006>.

RAMESH, D.; VINOTHKANNA, A.; RAI, A. K.; VIGNESH, V. S. Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 268-276, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.018>.

RINGØ, E.; GATESOUBE, F. J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, n. 3, p. 177-203, 1998. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8).

SÁNCHEZ, J.; BORRERO, J.; GÓMEZ-SALA, B.; BASANTA, A.; HERRANZ, C.; CINTAS, L. M. E.; HERNÁNDEZ, P. E. Cloning and Heterologous Production of Hiracin JM79, a Sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in Lactic Acid Bacteria and *Pichia pastoris*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2471-2479, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02559-07>.

SEBASTIÃO, F. A. **Avaliação da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de infecções por *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* em peixes.** 136 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2015.

SOMMERSET, I et al. **Vaccines for fish in aquaculture.** Future Drugs Ltd., 1st edition. 2005.

SUGITA, H.; OHTA, K.; KURUMA, A.; SAGESAKA, T.; An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 9, p. 1002–1004, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01765.x>.

SUNG, C.; KIM, B. G.; KIM, S.; JOO, H. S.; KIM, P. I. Probiotic potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 as anti-*Staphylococcus aureus* agent isolated from the vaginal microbiota of a healthy woman. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 908–916, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04485.x>.

SRIVASTAVA, P. K.; PANDEY, A.K. Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. **Biochemical Cellular Archives**, v. 15, n. 1, p. 47-73, 2015.

THANKAPPAN, B.; RAMESH, D.; RAMKUMAR, S.; NATARAJASEENIVASAN, K.; ANBARASU, K. Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita*- towards to identify novel probiotics against fish pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 340-353, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1270-y>.

TORANZO, A. E.; BARJA, J. L.; DOPAZO, C. P.; ROMALDE, J. L. Enfermedades bacterianas y víricas de peces marinos. In: Ranzani-Paiva, M. J.; Takemoto, R. M.; Lizama, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**, 2004, p. 03-52.

WU, Z. Q.; JIANG, C.; LING, F.; WANG, G. X. Effects of dietary supplementation of intestinal autochthonous bacteria on the innate and diseases resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Aquaculture** v. 438, n. 1, p. 105-114, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.041>.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 0, p. 1-19, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12164>

VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 327–335, 2000.

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

VISWANATAN, S.; MANIKANDAN, S.; HANIFFA, A.; CHAIRMAN, K. Evaluation of resistance against Antibiotics, Antiseptics and Disinfectants in *Aeromonas hydrophila* isolated from Marketed Fishes. **Pharmaceutical and Biological Evaluations**, v. 2, n. 2, p. 40-46, 2015.

XING, C. F.; HU, H. H.; HUANG, J. B.; FANG, H. C.; KAI, Y. H.; WU, Y. C.; CHI, S. C. Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1122-1128, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.021>.

XU, Y.; XIA, W.; YANG, F.; NIE, X. Physical and chemical changes of silver carp sausages during fermentation with *Pediococcus pentosaceus*. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 633-637, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.023>.

ZHANG, Y. Y.; LIU, B.; GE, X. P.; LIU, W. B.; XIE, J.; REN, M.; CUI, Y. T.; XIA, S. L.; CHEN, R.; ZHOU, Q.; PAN, L.; YU, Y. The influence of various feeding patterns of emodin on growth, non-specific immune responses, and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 1, p. 187-193, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.028>.

ZHOU, X.; WANG, Y.; YAO, J.; LI, W. Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 2, n. 7, p. 73-80, 2010.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; DELSHAD, S. T.; ADEL, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; LAZADO, C. C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>

CAPÍTULO 2 - Seleção preliminar de candidatos à probióticos para *Colossoma macropomum*

(Normas da Revista: Archives of Microbiology)

Resumo - Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar bactérias com potencial probiótico presentes na microbiota natural do tambaqui. Foram selecionados apenas os isolados Gram-positivos e hemólise-negativa. Foram realizados testes de diferenciação morfológica, seqüenciamento, catalase, tolerância à bile, antagonismo frente à patógenos, e teste de susceptibilidade a antimicrobiano. Seis cepas foram selecionadas e identificadas por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus saprophyticus*. As seis cepas confirmaram capacidade de resistir aos ácidos do trato intestinal. Todos os isolados inibiram o crescimento dos patógenos *Enterococcus casseliflavus* e *Lactococcus garvieae* no teste de antagonismo. Contra *Aeromonas hydrophila*, as cepas de *L. lactis* e *E. hirae* se destacaram inibindo o crescimento deste patógeno. Todas as cepas foram parcialmente resistentes contra os sete antibióticos testados. Como conclusão, a partir dos isolados iniciais, pelo menos quatro cepas (*S. hominis*, *L. lactis*, *P. pentosaceus* e *E. hirae*) se mostraram potenciais para serem testadas como probiótico em dietas de tambaquis.

Palavras-chave: aditivos alimentares, aquicultura, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*

Introdução

Probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em doses adequadas, provêm benefícios à saúde do hospedeiro (Kesarcodi-Watson et al. 2008). Diversas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* foram isoladas com sucesso do intestino de peixes, e atualmente são conhecidas como os principais grupos de bactérias probióticas na aquicultura (Ringø e Gatesoupe 1998; Irianto et al. 2002; Balcázar et al. 2006). No entanto, alguns estudos têm revelado novos isolados com grande potencial para uso, como as bactérias do gênero *Staphylococcus* (Rajeswari et al. 2016) e do gênero *Pediococcus* (Xing et al. 2013). Conforme o conhecimento sobre as espécies de peixes de interesse econômico vai avançando, como o tambaqui *Colossoma macropomum*, diferentes cepas com atividades probióticas promissoras devem ser descritas.

A maior problemática envolvendo o uso de probióticos na aquicultura é que muitos produtos disponíveis no mercado são considerados ineficazes, já que a maioria é preparada com isolados probióticos de outros animais, e não específicos para as espécies de peixes (Ghosh et al. 2007; Ramesh et al. 2015). Para isso, técnicas microbiológicas de isolamento e caracterização de cepas como testes de gram, morfologia, catalase, antagonismo, hemólise, tolerância à bile, colonização e segurança das cepas são empregados, possibilitando a seleção das bactérias com melhor potencial probiótico (Nikoskelainen et al. 2001; Vine et al. 2004; Balouiri et al. 2016). Tais técnicas são essenciais e podem prover informações relevantes sobre cepas do próprio hospedeiro de interesse, além de possibilitar a descoberta de novos microrganismos úteis para a produção animal.

O tambaqui é um peixe amazônico, que atualmente representa uma das principais espécies de peixe cultivado em água continental na América do Sul (IBGE 2014; Valladão et al. 2016). Apesar do seu grande potencial produtivo, essa espécie é sensível às variações térmicas (Moro et al. 2013) e está susceptível aos problemas sanitários intrínsecos ao ambiente produtivo, sendo amplamente afetada por diferentes parasitos e bactérias (Valladão et al. 2016) que podem gerar graves perdas econômicas.

Uma das estratégias de prevenção de enfermidades na aquicultura é a

utilização de probióticos, no entanto, não foram encontrados trabalhos sobre a seleção de probióticos a partir da microbiota deste peixe. Alguns pesquisadores descreveram o efeito de probióticos comerciais isolados de outros animais na alimentação do tambaqui (Ferreira et al. 2014; Azevedo et al. 2016), no entanto, o uso de cepas provenientes do próprio hospedeiro ainda não foi avaliado.

Em vista da necessidade de produtos para serem utilizados na aquicultura, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar cepas com potencial probiótico do intestino de tambaquis.

Material e Métodos

Isolamento das bactérias com potencial probiótico

Tambaquis juvenis saudáveis (sem tratamento prévio com produtos químicos ou antibióticos) $n=12$, pesando $93,65 \pm 51,65$ e medindo $16,36 \pm 2,52$, foram coletados de tanques escavados, do Departamento de Genética e Reprodução do Centro de Aquicultura da Unesp (Jaboticabal/SP). Os métodos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética – CEUA/UNESP - Jaboticabal (Protocolo nº 1615/16).

Os animais foram eutanasiados através do aprofundamento do plano anestésico em benzocaína 0,1g/L, lavados, limpos com álcool 70% e necropsiados em fluxo laminar. Os intestinos foram retirados assepticamente, abertos e lavados com solução salina estéril (0,65%) para retirada de fezes e possíveis bactérias alóctones (bactérias não fixadoras) do trato intestinal. Foi realizado três tipos de diluições: na primeira o intestino foi depositado em tubo tipo falcon (15 mL) e foi acrescentada a solução salina (0,65%) na proporção 1:1, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Himedia[®], Índia) e em M17 Agar Base (M17, Himedia[®], Índia), foram incubados em estufa a 35°C por 48 h. Na segunda diluição, uma alíquota de 50 µL da diluição anterior de 1:1 foi acrescentada em 5 mL de caldo MRS (Micromed, Brasil). Na terceira, o intestino previamente homogeneizado em solução salina 1:1 foi retirado desta solução e colocado em

outro tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo MRS. Foram incubados a 35°C por 24 h. As duas últimas diluições foram realizadas para enriquecimento das amostras. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi plaqueada em ágar MRS e outra em M17. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 h, depois as colônias foram repicadas em ágar MRS para isolamento bacteriano.

As colônias foram selecionadas a partir de características analisadas através do método de coloração de Gram.

Teste hemolítico

O teste de atividade hemolítica foi realizado para excluir possíveis candidatos patogênicos. Todos os isolados selecionados pelo teste de Gram, foram estriados (método de esgotamento) em ágar Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia, Brasil) enriquecido com 5% de sangue ovino, incubados a 35°C por 48 h. A observação da atividade hemolítica foi realizada através do aparecimento da zona de hemólise em torno das colônias recém crescidas.

Diferenciação morfológica e identificação molecular dos isolados com potencial probiótico

Os isolados pré-selecionados pelo teste da hemólise foram plaqueados em Agar MRS e incubados a 35°C por 48 h para realizar a caracterização dos isolados a partir de características morfológicas macroscópicas como o tamanho, aspecto, coloração e elevação das colônias, e a partir da morfologia microscópica das bactérias coradas pela técnica de Gram.

Os isolados diferenciados foram identificados por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA de cada isolado foi extraído utilizando Kit para extração (DNeasy® Blood&Tissue, Qiagen) seguindo a metodologia para bactérias gram positivas descrita pelo fabricante. Oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-CCAGAATTCAGAGTTTGATCMTGGCTCA-3') e 1492R (5'-ACCAAGCTTTACGGYTACCTTGTTAGGACTT-3') foram utilizados e a reação em

cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador (ProFlex, PCR System) seguindo as condições de 95 °C (5 min) para desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C (30 s), anelamento a 51 °C (30 s), extensão a 72 °C (2 min), e extensão final a 72 °C (10 min). Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1% e sequenciados através do método de Sanger usando o equipamento ABI 3730 XL DNA Analyzer (AppliedBiosystems, Foster City, California). As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e identificadas a partir de 100% de similaridade com as sequências do banco de dados e então foi fornecido o número de acesso de cada sequência de nucleotídeos.

Teste da catalase

O teste da catalase foi utilizado para caracterizar os isolados previamente sequenciados. Para este teste, cada colônia foi depositada em uma lâmina de vidro seguida pela deposição de uma gota de peróxido de hidrogênio (10 vol.). As colônias que reagiram formando bolhas de gás (transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio) foram consideradas catalase positiva.

Teste de tolerância à bile

O teste de tolerância à bile foi realizado seguindo o protocolo de Nikoskelainen et al. (2001). A bile foi coletada diretamente da vesícula biliar de tumbanis saudáveis e armazenada a -20°C para posterior utilização. Para o teste, as bactérias com potencial probiótico cresceram em caldo MRS durante 24 h, logo após, foram centrifugadas e lavadas com PBS e então foram ressuspensas em PBS na concentração 10^7 UFC/mL, a qual foi incubada em PBS estéril contendo 5 e 10% de bile a 35°C por 2 h, foram realizadas diluições seriadas até chegar na concentração de 10^3 UFC/mL e então, foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas a 35°C por 48 h para contagem de UFCs viáveis.

Antagonismo frente à patógenos e Teste de atividade antimicrobiana dos isolados

O teste de antagonismo foi realizado seguindo o protocolo de Ramírez et al. (2006). Em detalhes, as bactérias com potencial probiótico na concentração 10^8 UFC/mL foram plaqueadas em ágar MRS com auxílio de um swab estéril, e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Um disco de 8 mm foi retirado com auxílio de um cortador estéril. Este botão foi retirado e então virado em cima de uma placa de Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid, Inglaterra) previamente inoculada com um dos patógenos (na concentração 10^8 UFC/mL) a seguir: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas fulva* (Biblioteca de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos). Foi analisada a zona de inibição formada a partir de cada botão (descontando o tamanho do botão). Este método de difusão de botão de ágar foi realizado para destacar o antagonismo entre os microrganismos.

Similarmente ao teste do antagonismo, o teste de atividade antimicrobiana dos probióticos, foi realizado seguindo protocolo de Balouiri et al. (2016). As bactérias patogênicas *A. hydrophila*, *A. veronii*, *E. casseliflavus*, *L. garvieae*, *P. fulva* foram plaqueadas em TSA na concentração 10^8 UFC/mL. Com um furador estéril, foi retirado um disco com 8 mm de diâmetro. No poço foi acrescentado 100 μL de caldo MRS contendo 10^8 UFC/mL de cada isolado probiótico, as placas foram incubadas a 35°C por 24 h. Foi analisada a zona de inibição formada a partir de cada isolado probiótico.

Susceptibilidade dos isolados à antimicrobianos

Para o teste da sensibilidade das bactérias candidatas a probiótico, foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Enrofloxacina (5 μg , Cefar, Brasil), Amoxicilina (30 μg , Laborclin[®], Brasil), Ampicilina (10 μg , Laborclin[®], Brasil), Ciprofloxacina (5 μg , Laborclin[®], Brasil), Gentamicina (10 μg , Laborclin[®], Brasil), Sulfazotrim (25 μg , Laborclin[®], Brasil) e Tetraciclina (30 μg , DME, Brasil).

O método de disco-difusão em Agar Mueller Hinton (MHA, Himedia[®], India) foi realizado de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Uma suspensão de cada isolado probiótico foi ajustada à concentração 10^8 UFC/mL. Com um swab estéril, a suspensão foi inoculada em MHA. Os discos com os antimicrobianos foram colocados em cada placa e incubados a 35°C por 48 h, seguindo protocolo de Thankappan et al. (2015). Os isolados foram caracterizados como resistentes ou sensíveis a cada antimicrobiano dependendo do diâmetro do halo de inibição.

Teste de segurança dos isolados probióticos

Para conhecimento da seguridade do uso das cepas candidatas a probióticos na alimentação dos peixes, foram realizados desafios com teste *in vivo* utilizando todas as bactérias que foram caracterizadas nos testes anteriores, a fim de avaliar qualquer alteração comportamental, sinais clínicos ou até mesmo mortalidade dos animais.

Foram utilizados 120 tambaquis juvenis saudáveis obtidos do Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Os peixes foram mantidos em 20 tanques de 500 L, com aeração e fluxo contínuos de água e alimentação comercial (Nutripiscis - umidade 100 g/kg; proteína bruta 240 g/kg; extrato etéreo 40 g/kg; fibra bruta 100 g/kg; matéria mineral 140 g/kg; cálcio 20 g/kg; fósforo 10 g/kg; vitamina C 150 mg/kg) à vontade durante todo o período de aclimação. Os peixes pesando $87,27 \pm 8,67$ gramas e medindo $14,71 \pm 0,70$ centímetros de comprimento padrão e $18,05 \pm 0,78$ centímetros de comprimento total foram divididos ao acaso em 5 tratamentos: grupo controle: inoculado com PBS, grupo 1: inoculado com *P. pentosaceus*, grupo 2: inoculado com *L. lactis*, grupo 3: inoculado com *E. hirae* e grupo 4: inoculado com *S. hominis*.

As bactérias *P. pentosaceus*, *L. lactis*, *E. hirae* e *S. hominis*, além do PBS estéril, foram inoculados intraperitonealmente na proporção de 0,1 mL para cada 10 gramas de peixe, previamente anestesiados em benzocaína (Sigma) 0.1g/L de água. Para preparo do inóculo, as 4 cepas cresceram em caldo MRS por 48 h, depois foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS estéril para quantificação de

UFC/mL. A concentração foi ajustada em leitura de 600 nanômetros (nm) em espectrofotômetro (Shimadzu, Brasil) até chegar à concentração de 10^8 UFC/mL para cada cepa.

Após a inoculação, os peixes foram mantidos com alimentação comercial diariamente até a saciedade aparente. Os peixes foram observados durante 15 dias.

Os parâmetros da água monitorados semanalmente durante o período experimental foram: temperatura $29,93 \pm 0,50$ °C; oxigênio dissolvido $4,99 \pm 0,73$ mg L⁻¹ e pH $7,58 \pm 0,18$, medidas com sonda multiparâmetros Multiparameter Water Quality Checker – Horiba.

Resultados

Isolamento das bactérias com potencial probiótico

Nesta etapa inicial, o crescimento total de isolados Gram-positivos foi de 152, os quais foram considerados aptos a continuar a sequência de testes.

Teste hemolítico

A análise dos halos no teste hemolítico mostrou que 114 isolados apresentaram alguma forma de hemólise (beta-hemólise ou alfa-hemólise), 7 não foram possíveis de repicar e apenas 31 apresentaram gama-hemólise, os quais foram caracterizados pela ausência de hemólise. Esta característica é importante para os potenciais probióticos e estes 31 isolados foram separados para os testes seguintes.

Diferenciação morfológica e identificação molecular dos isolados com potencial probiótico

Dos 31 isolados, apenas 6 apresentaram diferenças entre si em relação ao tamanho, aspecto, coloração e elevação da colônia e no formato da célula no Gram.

As bactérias foram identificadas como *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus hominis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*, todas as cepas identificadas tiveram 100% de similaridade com sequências do banco de dados e o número de acesso foi gerado pelo GenBank (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação molecular dos isolados bacterianos intestinais de tambaqui *Colossoma macropomum*

Sequenciamento			
Cepa	Espécies	Identidade	Número de acesso
SK58	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	KY305683
SK83	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	KY305684
SK95	<i>Enterococcus hirae</i>	100%	KY305685
SK122	<i>Staphylococcus hominis</i>	100%	KY305686
SK143	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	KY305687
SK150	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100%	KY305688

Teste da catalase

No teste, as bactérias *P. pentosaceus*, *S. hominis* e *S. saprophyticus* foram caracterizadas como catalase positiva, transformando o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. As outros 3 espécies, *L. lactis*, *E. hirae* e *E. faecalis*, foram caracterizadas como catalase negativas, não apresentando nenhum tipo de reação (aparecimento de bolhas).

Teste de tolerância à bile

Neste teste, foi confirmada a capacidade de resistir aos ácidos do trato intestinal, todos os isolados foram tolerantes aos ácidos biliares específicos para o tambaqui (Tabela 2) sendo pouco alterado mesmo em alta concentração da bile (10%).

Tabela 2. Tolerância das cepas bacterianas a duas concentrações de bile de tambaqui *Colossoma macropomum*. Valores em UFC/mL

Isolados	Tolerância à Bile	
	5%	10%
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	$8,4 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$
<i>Lactococcus lactis</i>	$8,6 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$
<i>Enterococcus hirae</i>	$6,1 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$
<i>Staphylococcus hominis</i>	$4,6 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$5,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	$8,4 \times 10^5$	$8,7 \times 10^5$

Antagonismo frente à patógenos e Teste de atividade antimicrobiana dos isolados

No teste de antagonismo frente à patógenos, na inibição à *A. hydrophila*, as bactérias *E. hirae* e *L. lactis* apresentaram maior zona de inibição comparadas aos outros isolados. Neste teste, todas as bactérias candidatas à probiótico apresentaram pequeno ou nenhum efeito contra *A. veronii* e *P. fulva*, mas com forte efeito contra *E. casseliflavus* e *L. garvieae* (Tabela 3).

No teste de atividade antimicrobiana, a bactéria *S. hominis* apresentou o maior halo de inibição contra *A. hydrophila*, seguida pelas bactérias *P. pentosaceus*, *L. lactis* e *E. hirae*. Todos os probióticos testados não inibiram o crescimento de *E. casseliflavus* e *L. garvieae* (Tabela 4).

Susceptibilidade dos isolados à antimicrobianos

Neste teste de susceptibilidade à antimicrobianos os resultados foram bastante variáveis, dependendo da bactéria e do antibiótico testados (Tabela 5). Em geral, todas as bactérias foram sensíveis à Enrofloxacina, exceto a *P. pentosaceus* que apresentou um menor halo de inibição. Para a Gentamicina, a sensibilidade foi maior para *P. pentosaceus*, para as demais, os halos foram menores, apresentando maior resistência. Para a Tetraciclina e Ciprofloxacina, *P. pentosaceus* foi resistente e todos os demais isolados apresentaram halos menores. Para a Ampicilina, Sulfazotrim e Amoxicilina, todas as cepas foram sensíveis.

Tabela 3. Atividade antagonista dos isolados probióticos contra os patógenos: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas fulva*. Valores dos diâmetros dos halos de inibição em mm.

Isolados	Zona de inibição					Média
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>P. fulva</i>	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4	1	4	5	0	2,8
<i>Lactococcus lactis</i>	6	1	6	6	0	3,8
<i>Enterococcus hirae</i>	6	1	6	5	0	3,6
<i>Staphylococcus hominis</i>	5	1	5	6	0	3,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1	5	6	0	3,4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5	1	5	4	0	3,0

Tabela 4. Atividade antibacteriana dos isolados probióticos contra os patógenos: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas fulva*. Valores dos diâmetros dos halos de inibição em mm.

Isolados	Zona de Inibição					Média
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>P. fulva</i>	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5	3	0	0	4	2,4
<i>Lactococcus lactis</i>	5	2	0	0	4	2,2
<i>Enterococcus hirae</i>	5	2	0	0	3	2
<i>Staphylococcus hominis</i>	6	3	0	0	3	2,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	3	0	0	2	1,8
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	2	0	0	0	1

Tabela 5. Susceptibilidade à antimicrobianos: Enrofloxacina (5µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Sulfazotrim (25 µg), Amoxicilina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg). Valor do halo de inibição em mm.

SUSCEPTIBILIDADE À ANTIBIOTICOS								
Cepa	Espécie	Eno 5	Gen 10	Tet 30	Amp 10	Sut 25	Amc 30	Cip 5
SK58	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	12	26	0	-	-	24	0
SK83	<i>Lcatococcus lactis</i>	20	11	7	30	22	34	20
SK95	<i>Enterococcus hirae</i>	21	9	7	18	21	25	19
SK122	<i>Staphylococcus hominis</i>	20	8	7	22	23	32	20
SK143	<i>Enterococcus faecalis</i>	21	9	7	24	20	-	19
SK150	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	21	9	7	29	23	30	21

Teste de segurança dos isolados probióticos

Confirmando a seguridade das cepas, os animais desafiados com as 4 espécies bacterianas e o controle sobreviveram e não apresentaram nenhum sinal clínico ou alteração comportamental.

Discussão

Muitos probióticos disponíveis no mercado da piscicultura são considerados ineficazes, já que a maioria é preparada com isolados probióticos de outros animais, e não de peixes (Ghosh et al. 2007; Ramesh et al. 2015). Isso ocorre devido às diferenças na microbiota intestinal e nas interações microrganismo/mucosa dos diferentes animais, e esses fatores limitam o potencial probiótico dos microrganismos (Lazado et al. 2014). Por isso a necessidade de que os probióticos sejam selecionados a partir de origem autóctone do hospedeiro. Neste estudo, potenciais probióticos para o tambaqui foram isolados pela primeira vez do próprio hospedeiro, caracterizados *in vitro* e a segurança dos isolados foi testada *in vivo*.

Os critérios de seleção propostos neste estudo foram eficazes, possibilitando a partir de 152 bactérias Gram-positivas isoladas do intestino de tambaqui, selecionar quatro cepas com potencial probiótico. De fato, diversos estudos utilizam testes de tolerância de bile (Balcázar et al. 2008; Buntin et al. 2008; Allameh et al. 2014; Dutta et al. 2015; Muthukumar e Kandeepan 2015; Vijayaram et al. 2016), teste de atividade antibacteriana (Buntin et al. 2007; Balcázar et al. 2008; Allameh et al. 2014; Dutta et al. 2015; Muthukumar e Kandeepan 2015; Vijayaram et al. 2016) e testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (Allameh et al. 2014; Muthukumar e Kandeepan 2015; Vijayaram et al. 2016) como métodos eficazes para seleção de promissores probióticos isolados de fontes intestinais em peixes.

A bactéria *S. hominis* apresentou bons resultados para teste de seleção como potencial probiótico, mas foi pouco estudada até o momento. Em uma triagem com diferentes probióticos, Sung et al. (2010) descreveram maior atividade *in vitro* de cepas de *S. hominis* contra *S. aureus* isoladas de humanos comparado a outros probióticos e Kim et al. (2010) caracterizaram a sua bacteriocina (homicinina), que exhibe potente atividade contra diversos patógenos, inclusive aqueles resistentes à

antimicrobianos. Inúmeros trabalhos já reportaram peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) produzidos a partir de outras cepas de *Staphylococcus* (Dajani et al. 1974; Hille et al. 2001; Netz et al. 2002; Aso et al. 2005), no entanto, não há relato até o momento de seu uso na aquicultura.

Apesar das características positivas das bactérias deste gênero, neste estudo, o isolado identificado como *S. saprophyticus* apresentou a menor atividade contra bactérias patogênicas no teste de atividade antibacteriana. Mesmo estando presente na microbiota natural de diversos organismos, estudos relatam que em situações de desequilíbrio da flora, esta bactéria causa doença, sendo um dos agentes patogênicos mais comuns em infecções urinárias de humanos (Flores-Mireles et al. 2015).

A cepa de *L. lactis* apresentou atividade contra os patógenos neste estudo e no estudo de Balcázar et al. (2008), esta bactéria isolada de salmonídeos apresentou atividade *in vitro* contra 4 patógenos e no estudo de Sequeiros et al. (2010), *L. lactis* isolada do peixe marinho *Odontesthes platensis* apresentou atividade *in vitro* contra *L. garviae*. A bacteriocina nisina, produzida por algumas cepas de *L. lactis*, é uma das mais conhecidas e estudadas há muitos anos (Ringø e Gatesoupe 1998), mas além de bacteriocinas, bactérias ácido-lácticas são conhecidos por produzirem ácidos orgânicos, que por meio da acidificação do meio, podem inibir bactérias patogênicas gram-negativas (Balcázar et al. 2006) o que mostra o grande potencial desta bactéria para uso na alimentação de peixes.

Pediococcus pentosaceus é uma bactéria ácido-láctica. Diversos estudos descrevem diferentes bacteriocinas isoladas destes microrganismos (Daeschel e Klaenhammer 1985; Wu et al. 2004; Todorov e Dicks 2005) e descreveram que elas são capazes de inibir uma grande gama de patógenos como *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* e *Listeria*. Recentemente, *P. pentosaceus* tem sido estudado na aquicultura e pesquisas mostraram promissora atividade probiótica quando incluída na ração de diferentes peixes marinhos como *Rachycentron canadum*, na qual foi administrada na ração na dose de 10^9 UFC/g por 2 semanas (Xing et al. 2013), para *Epinephelus coioides* quando administrada na ração na dose de 6×10^8 UFC/g por 2 semanas (Huang et al. 2014) e para *Pagrus major* nas doses de 1.6×10^{12} e 3.2×10^{12} incluídas na ração por 56 dias (Dawood et al. 2016).

No entanto, no melhor de nosso conhecimento, seu efeito na alimentação de peixes de água continental ainda é desconhecido.

E. hirae e *E. faecalis* são ambas bactérias ácido-lácticas. Em relação à *E. hirae*, sua atividade *in vitro* contra *A. hydrophila* foi maior comparada a outras cepas, no entanto, esta bactéria está frequentemente associada à doença em animais (Devriese et al. 1995) e zoonoses em humanos (Savini et al. 2014). Já a bactéria *E. faecalis* apresentou pouca atividade *in vitro* no teste de atividade antibacteriana neste estudo. Apesar disso, alguns estudos recentes descreveram sua atividade como probiótico para diferentes espécies de peixes, como *Oncorhynchus mykiss*, *Channa striatus* e *Puntius gonionotus*. Para *O. mykiss* foi incluída na ração na dose de 1% e administrada por 12 semanas (Rodriguez-Estrada et al. 2009) e tanto para *C. striatus* (Allameh et al. 2014) quanto *P. gonionotus* (Allameh et al. 2015) foi incluída na ração na dose de 10^7 UFC/g e administrada por 5 semanas.

Este estudo revela que o tambaqui apresenta pelo menos quatro bactérias candidatas a probiótico (*S. hominis*, *L. lactis*, *P. pentosaceus* e *E. hirae*), que vivem comumente aderidas na sua mucosa intestinal e que quando inoculadas intraperitonealmente não causa danos ao hospedeiro, sendo seguras para estudos *in vivo* futuros.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e ao Centro de Aquicultura da Unesp pelo fornecimento dos peixes.

Referências

Allameh SK, Ringø E, Yusoff FM, Daud HM, Ideris A (2014) Properties of *Enterococcus faecalis*, a new probiotic bacterium isolated from the intestine of snakehead fish (*Channa striatus bloch*). Afr J Microbiol Res 8(22): 2215-2222. doi: 10.5897/AJMR2013.5830

Allameh SK, Ringø E, Yusoff FM, Daud HM, Ideris A (2015) Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese carp (*Puntius gonionotus*, Bleeker 1850). *Aquacult Nutr* 1-8. doi: 10.1111/anu.12397

Aso Y, Koga H, Sashihara T, Nagao JI, Kanemasa Y, Nakayama J, Sonomoto K (2005) Description of complete DNA sequence of two plasmids from the nukacin ISK-1 producer, *Staphylococcus warneri* ISK-1. *Plasmid* 53(2): 164-178. doi: 10.1016/j.plasmid.2004.08.003

Azevedo RVD, Fosse Filho JC, Pereira SL, Cardoso LD, Júnior V, Vazquez M, Andrade DRD (2016) Prebiotic, probiotic and synbiotic supplementation in diets for juvenile tambaquis at two stocking densities. *Pesq Agropec Bras* 51(1): 9-16. doi: 10.1590/S0100-204X2016000100002

Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.* 114(3): 173-186. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009

Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Muzquiz JL, Girones O (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278(1), 188-191. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.014

Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6(2): 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005

Buntin N, Chanthachum S, Hongpattarakere T (2008) Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 141

Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Daeschel MA, Klaenhammer TR (1985) Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl Environ Microbiol 50(6): 1538-1541

Dajani AS, Taube Z (1974) Plasmid-mediated production of staphylococin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 5(6): 594-598. doi: 10.1128/AAC.5.6.594

Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S (2015) Effects of dietary inactivated *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, feed utilization and blood characteristics of red sea bream, *Pagrus major* juvenile. Aquacult Nutr 22: 923-932. doi: 10.1111/anu.12314

Devriese LA, Chiers K, De Herdt P, Vanrompay D, Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F (1995) *Enterococcus hirae* infections in psittacine birds: epidemiological, pathological and bacteriological observations. Avian Pathol 24(3): 523-531. doi: 10.1080/03079459508419091

Dutta D, Banerjee S, Mukherjee A, Ghosh K (2015) Selection and probiotic characterization of exoenzyme-producing bacteria isolated from the gut of *Catla catla* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae) *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 45(4), 373. doi: 10.3750/AIP2015.45.4.05

Ferreira CM, Antoniassi NA, Silva FG, Povh JA, Potença A, Moraes TC, Silva TKST, Abreu JS (2014) Histomorphometric characteristics gut of tambaqui after using probiotic on diet and during transport. Pesqui Vet Bras 34(12): 1258-1264. doi: 10.1590/S0100-736X2014001200020

Flores-Meireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Rev Microbiol* 13(5): 269-284. doi: 10.1038/nrmicro3432

Ghosh S, Sinha A, Sahu C (2007) Isolation of putative probiotics from the intestines of Indian major carps. *Isr J Aquac* 59(3), 127-132. doi: 10524/19220

Hille M, Kies S, Götz F, Peschel A (2001) Dual role of GdmH in producer immunity and secretion of the staphylococcal lantibiotics gallidermin and epidermin. *Appl Environ Microbiol* 67(3): 1380-1383. doi: 10.1128/AEM.67.3.1380-1383.2001

Huang JB, Wu YC, Chi SC (2014) Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity, physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immun* 39(2): 196-205. doi: 10.1016/j.fsi.2014.05.003

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014) ISSN 0101-4234. http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf. Acessado dia 15/11/2016.

Irianto A, Austin B (2002) Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis* 25(11): 633-642. doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x

Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Josie Lategan M, Gibson L (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274(1): 1-14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.019

Kim PI, Sohng JK, Sung C, Joo HS, Kim EM, Yamaguchi T, Park D, Kim BG (2010) Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominicin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9. *Biochem Biophys Res Commun* 399(2): 133-138. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.024

Lazado CC, Caipang CMA (2014) Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. *Aquaculture* 424-425 p. 53-62. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.12.040

Moro GV, Rezende FP, Alves AL, Hashimoto DT, Varela ES, Torati LS (2013) Em: *Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos/ editores técnicos*, Ana Paula Oeda Rodrigues... [et al.]. Brasília, DF: Embrapa, 440

Muthukumar P, Kandeepan C (2015) Isolation, identification and characterization of probiotic organisms from intestine of fresh water fishes. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 4, 607- 616

Netz DJA, Pohl R, Beck-Sickinger AG, Selmer T, Pierik AJ, de Freire Bastos MDC, Sahl HG (2002) Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J Mol* 319(3): 745-756. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00368-6

Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand AC (2001) Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl Environ Microbiol* 67(6): 2430-2435. doi: 10.1128/AEM.67.6.2430-2435.2001

Rajeswari V, Priyadarshini SK, Saranya V, Suguna P, Shenbagarathai R (2016) Immunostimulation by phospholipopeptidebiosurfactant from *Staphylococcus hominis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immun* 48:244-253. doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.006

Ramesh D, Vinothkanna A, Rai AK, Vignesh VS (2015) Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immun* 45(2): 268-276. doi: 10.1016/j.fsi.2015.04.018

Ramírez C, Ciffoni BGA, Pancheniak EMG, Soccol, EFRC (2006) Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. *Aliment Latinoam* 264, 70–77

Ringø E, Gatesoupe FJ (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160(3): 177-203. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00299-8

Rodriguez-Estrada U, Satoh S, Haga Y, Fushimi H, Sweetman J (2009) Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydroxybutyrate acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult. Sci.* 57: 609–617

Savini V, Bonfini T, Marrollo R, Argentieri AV, Riccioni S, Astolfi D, Fazii P, D'Antonio D, Gherardi G (2014) *Enterococcus hirae*: a zoonotic microorganism in human umbilical cord blood. *World J Microbiol Biotechnol* 30(4): 1423-1426. doi: 10.1007/s11274-013-1537-4

Sequeiros C, Vallejo M, Marguet ER, Olivera NL (2010) Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Arch Microbiol* 192(4): 237-245. doi: 10.1007/s00203-010-0552-1

Sung C, Kim BG, Kim S, Joo HS, Kim PI (2010) Probiotic potential of *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 as anti- *Staphylococcus aureus* agent isolated from the vaginal microbiota of a healthy woman. *J Appl Microbiol* 108(3): 908-916. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04485.x

Thankappan B, Ramesh D, Ramkumar S, Natarajaseenivasan K, Anbarasu K (2015) Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita*- towards to identify novel probiotics against fish pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 175(1): 340-353. doi: 10.1007/s12010-014-1270-y

Todorov SD, Dicks LM (2005) Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochem* 40(1): 365-370. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.011

Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F (2016) South American fish for continental aquaculture. *Rev Aquacult* 0: 1-19. doi: 10.1111/raq.12164

Vijayaram S, Kannan S, Muthukumar S (2016) Isolation and characterization of probiotic bacteria isolated from diverse fish fauna of the trodden Vaigai river at Theni district. *J Chem Pharm Res* 8(7):883-889.

Vine NG, Leukes WD, Kaiser H (2004) *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 231(1): 145-152. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00954-6

Wu CW, Yin LJ, Jiang ST (2004) Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J Agric Food Chem* 52(5): 1146-1151. doi: 10.1021/jf035100d

Xing CF, Hu HH, Huang JB, Fang HC, Kai YH, Wu YC, Chi SC (2013) Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. *Fish Shellfish Immun* 35(4): 1122-1128. doi: 10.1016/j.fsi.2013.07.021

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

A procura por alternativas sustentáveis para utilização na aquicultura vem crescendo nos últimos anos. Pois, a utilização de produtos químicos, como os antibióticos é prejudicial à saúde dos animais de produção, para os animais não alvos e para o ambiente. Apesar da necessidade de ser utilizado quando há surtos de doenças, a melhor maneira de controlar as doenças no sistema de produção é através da prevenção, e para isso, há no mercado algumas opções como os imunonutrientes, imunoestimulantes, prebióticos e os probióticos.

A problemática que cerca a utilização dos probióticos, é que na grande maioria os microrganismos utilizados são isolados de diferentes hospedeiros, tendo problemas com aderência na mucosa do trato intestinal, temperatura e salinidade por se tratar de outro ambiente. Assim, este trabalho teve como objetivo encontrar bactérias intestinais de tambaqui com potencial probiótico, já que é a espécie nativa mais cultivada no Brasil e que até o momento não possui probióticos próprios para utilização no seu cultivo.

Foram isoladas quatro cepas do intestino de tambaquis saudáveis: *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae* e *Staphylococcus hominis*. Todas apresentaram características favoráveis para serem utilizadas como probiótico, como serem hemólise negativas, antagônicas contra alguns patógenos para esta espécie de peixe, resistentes a bile, além de serem seguras quando inoculadas nos animais, não causando nenhum tipo de lesão ou alteração comportamental.

Enfatizamos a importância de estudos futuros para melhor entendimento de como estes microrganismos agem no hospedeiro, como contribuem para a saúde do mesmo e se podem ser simbióticos, ou se uma cepa pode inibir a ação da outra.