

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CAMPUS PIÚMA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

WANDER LÚCIO DA LUZ

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PEIXES MARINHOS
NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Vibrio parahaemolyticus***

PIÚMA

2017

WANDER LÚCIO DA LUZ

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PEIXES
MARINHOSNO CONTROLE *IN VITRO* DE *Vibrio parahaemolyticus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenadoria do Curso de Engenharia de Pesca do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Piúma, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia R. S. C. Gonçalves

PIÚMA

2017

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)

Bibliotecária responsável Ana Muller CRB6/ES 541

L979p Luz, Wander Lúcio da, 1976-

Potencial probiótico de bactérias isoladas de peixes marinhos no controle *in vitro* de *Vibrio parahaemolyticus* / Wander Lúcio da Luz. -- 2017.

51 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora : Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves

Monografia (graduação) - Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Piúma, Coordenadoria de Curso Superior de Engenharia de Pesca, 2017.

1. Probióticos. 2. Peixes – Doenças – Prevenção. 3. Antibióticos. I. Gonçalves, Flávia Regina Spago de Camargo. II. Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Piúma. III. Título.

CDD: 615.329

WANDER LÚCIO DA LUZ

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PEIXES MARINHOS
NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Vibrio parahaemolyticus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenadoria de Engenharia de Pesca do Instituto Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profª. Drª. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves

Instituto Federal do Espírito Santo

Orientadora



Profª. Drª. Dayse Aline Silva Bartolomeu de Oliveira

Instituto Federal do Espírito Santo

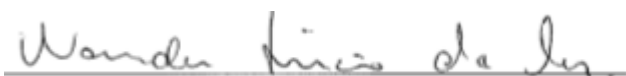


Prof. MSc. Henrique David Lavander

Instituto Federal do Espírito Santo

DECLARAÇÃO DO AUTOR

Declaro, para fins de pesquisa acadêmica, didática e técnico-científica, que este Trabalho de Conclusão de Curso pode ser parcialmente utilizado, desde que se faça referência à fonte e ao autor.



Wander Lúcio da Luz

Wander Lúcio da Luz

Piúma, 07 de Dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concede forças para sempre continuar em busca dos meus objetivos.

À minha esposa Daniela, meus filhos Ariel, Rochel, Necaël, Muriel e Ramásia pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves, quem me apresentou a microbiologia e grande responsável por esse trabalho acontecer com todas suas sugestões e experiência.

A todos que fazem parte do Laboratório de Ecologia Microbiana em especial á Suzana, Dany, André, Felipe, Olga, Vitório, Alice e Ester.

Ao Laboratório de Nutrição e Produção de Organismos Aquáticos (LANPOA) pelo fornecimento dos peixes.

A todos os professores que participaram direta ou indiretamente da minha formação.

Ao pessoal da assistência estudantil em especial ao Ronaldo pela atenção e preocupação profissional.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo por fazer tudo isso se tornar realidade.

À FAPES pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica.

RESUMO

A aquicultura apresentou crescimento acima de 32% no período de 2009 a 2014. As perspectivas de crescimento no Brasil superam 100% nos próximos 10 anos. Com o crescimento da atividade aquícola aumentaram as perdas financeiras relativas a doenças causadas nos animais. A partir do ano 2000 a introdução em massa dos antibióticos na produção aquícola surge como solução, no entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos leva à resistência das cepas bacterianas, comprometendo o ambiente e a saúde pública. Os probióticos, bactérias que se consumidas vivas em quantidades adequadas trazem melhorias na saúde humana e animal, surgem como alternativa ao uso de antibióticos. O presente trabalho teve como objetivo selecionar *in vitro* bactérias com potencial probiótico frente à *Vibrio parahaemolyticus*. Bactérias isoladas do intestino de peixes marinhos foram testadas contra o patógeno, através de testes de inibição *in vitro*. Testes de agregação para estimar a capacidade de adesão da bactéria ao trato intestinal do hospedeiro e testes de resistência à bile e a acidez com o objetivo de verificar a capacidade da bactéria sobreviver no trato gastrointestinal do peixe, foram realizados com as cepas antagonistas previamente selecionadas. Seis cepas Gram negativas apresentaram potencial probiótico frente o patógeno e podem ser usadas para o desenvolvimento de novos probióticos.

Palavras-chave: Patógeno. Bactérias. Gram negativas. Antagonismo.

ABSTRACT

Aquaculture has increased by over 32% in the period of 2009 to 2014. Growth prospects in Brazil exceed 100% over the next 10 years. This growth has led to an increase in financial losses related to animal diseases. From the 2000s, the massive introduction of antibiotics into aquaculture production emerges as a solution; however, the indiscriminate use of these drugs leads to resistance of bacterial strains, compromising the environment and public health. Probiotics, bacteria that are consumed alive in adequate amounts, bring improvements in human and animal health, arise as an alternative to the use of antibiotics. The present work aimed to select *in vitro* bacteria with probiotic potential against *Vibrio parahaemolyticus*. Bacteria isolated from the gut of marine fish were tested against the pathogen by *in vitro* inhibition tests. Aggregation tests to estimate the adhesion capacity of the bacteria to the intestinal tract of the host and tests of resistance to bile and acidity in order to verify the capacity of the bacteria to survive in the gastro intestinal tract of the fish were performed with the previously selected antagonistic strains. Six Gram negative strains showed probiotic potential against the pathogen and have could be used for the development of new probiotics.

Key words: Pathogen. Bacteria. Gram-negative. Antagonism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Definição esquemática de probióticos.....	17
Figura 2- Intestino de tainha inteiro, intestino de tainha macerado com solução salina.....	26
Figura 3- Halo de inibição de Bactérias isoladas de Tainhas (A) e Beijupira (B) frente o <i>V. parahaemoliticus</i>	27
Figura 4- Comparação da capacidade de autoagregação das bactérias antagonistas em suas formas viáveis e não viáveis.....	34
Figura 5- A- Precipitação de Sulfeto de Ferro a partir da decomposição de aminoácidos e formação de H ₂ S. B- Meio alcalinizado comprovando o uso de citrato como fonte exclusiva de Carbono.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Bactérias selecionadas para teste de inibição por <i>Pour Plate</i> frente o <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
Tabela 2- Densidade óptica á 600nm e número de bactérias por mL utilizados para teste de acidez em pH 2,5 e teste de tolerância a bile a 0,3%, contagem final e índice de sobrevivência das bactérias antagonistas.....	33
Tabela 3- Caracterização das colônias de bactérias antagonistas segundo aspectos morfológicos.....	37
Tabela 4- Caracterização das bactérias antagonistas e do <i>Vibrio parahaemolyticus</i> de acordo com o meio de cultura e corante utilizado.....	38
Tabela 5- Caracterização das bactérias antagonistas e do <i>Vibrio parahaemolyticus</i> através de testes bioquímico.....	39
Tabela 6- Comparação do potencial de inibição frente ao <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , autoagregação e tolerância a bile e acidez das bactérias antagonistas.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ANS	Ágar nutriente acrescido de 3% de NaCl
°C	Graus Celsius
CN	Caldo nutriente
CNS	Caldo nutriente acrescido de 3% de NaCl
D.O.	Densidade óptica
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
H	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ S	Ácido Sulfídrico
Ifes	Instituto Federal do Espírito Santo
LANPOA	Laboratório de Nutrição e Produção de Organismos Aquáticos
LP	Leite Peptonizado
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAS	Sistema de recirculação de água
TSA	Ágar Triptona de Soja
Ufc	Unidade Formadora de Colônias
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	O USO DE ANTIBIÓTICOS NA AQUICULTURA.....	15
2.2	PROBIÓTICOS.....	16
2.2.1	Modos de ação dos probióticos	17
4.2.2.2	O uso de probióticos na aquicultura.....	18
2.3	VÍBRIO.....	19
2.3.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21
2.4	RESISTÊNCIA BIOLÓGICA AS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS E DE AGREGAÇÃO.....	22
3	OBJETIVO	24
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	AQUISIÇÃO DOS PEIXES.....	25
4.2	SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS.....	25
4.2.1	Isolamento das Bactérias	25
4.2.2	Antagonismo Frente ao Patógeno	26
4.2.2.1	Teste de Inibição por Picada Central em Placa.....	26
4.2.2.2	Teste de Inibição por <i>Pour Plate</i>	27
4.3	TESTES DE RESISTÊNCIA BIOLÓGICA ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS E DE AGREGAÇÃO.....	27
4.3.1	Ensaio de Tolerância ao pH Gástrico e Sal Biliar	27
4.3.2	Teste de Autoagregação	28
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	ISOLAMENTO BACTERIANO E SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS....	30
5.2	RESISTÊNCIA BIOLÓGICA ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS E DE AGREGAÇÃO.....	32
5.2.1	Tolerância ao pH Gástrico e Sal Biliar	32
5.2.2	Capacidade de Agregação ao Intestino do Hospedeiro	33
5.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DAS CEPAS	

	ANTAGONISTAS.....	34
5.3.1	Caracterização Morfológica.....	35
5.3.3.1	Tipo de Parede celular - Coloração de Gram.....	35
5.3.3.2	Formato das colônias.....	36
5.3.3.3	Crescimento em meios de cultura específicos.....	37
5.3.3.4	Caracterização bioquímica.....	38
5.4	Potencial Probiótico.....	41
6	CONCLUSÃO.....	42
7	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A produção aquícola mundial apresentou crescimento de 32,5% durante o período de 2009 a 2014, totalizando 73,8 milhões de toneladas de pescado, sendo que desse total mais de 36% provém da aquicultura marinha. O Brasil apresenta-se como o 14^o maior produtor aquícola do mundo, somando 562 mil toneladas de pescado ao final do ano de 2014, com 65 mil toneladas provenientes de águas marinhas. A estimativa de crescimento do setor é de 104% nos próximos 10 anos (FAO, 2016). O desenvolvimento desordenado da atividade pode levar ao desequilíbrio ambiental e a poluição, fatores que podem provocar doenças levando a mortalidade em massa no cultivo de peixes, conseqüentemente a grandes perdas econômicas (WANG; NISHINO, 2008).

Muitas dessas doenças são causadas por agentes infecciosos bacterianos e são tratadas com antibióticos que podem ser tóxicos aos tecidos dos peixes e se acumularem na musculatura (TAVECHIO *et al.*, 2009). De acordo com Costa e colaboradores (2008) apesar da importância do uso de antibióticos na aquicultura, ele se torna limitado, pois pode levar à alteração da microbiota natural do ambiente e o desenvolvimento de cepas resistentes.

Um desses agentes infecciosos é o *Vibrio parahaemolyticus*, uma bactéria comumente encontrada em sistemas marinhos em estado de natação livre por possuir um único flagelo ou afixada nas mais diversas superfícies tais como zooplâncton, peixe, marisco ou qualquer outra matéria submersa (GODEPOTRATZ *et al.*, 2011).

Casos de gastroenterite aguda normalmente estão ligados a infecção por cepas virulentas adquiridas através do consumo de frutos do mar cru. No Japão o *V. parahaemolyticus* é responsável por 20% a 30% dos casos de intoxicação alimentar. (NEWTON *et al.*, 2012; ALAM *et al.*, 2002).

Vacinas estão sendo desenvolvidas para prevenir estas doenças, porém não se apresentam como solução definitiva já que peixes em seu estágio inicial não demonstram imunocompetência ou, ainda por vezes, apenas a forma injetável da vacina demonstra a eficiência exigida. Forma essa impraticável em cultivos com grandes quantidades de animais ou em animais pequenos (GRAM *et al.*, 1999).

A partir da identificação de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos atualmente utilizados na aquicultura, estudos buscam a introdução de probióticos como alternativa para o controle de doenças (WANG; NISHINO, 2008; NEWAJ-FYZUL; AL-HARBJ; AUSTIN, 2014). Faz-se necessário entender os mecanismos de ação dos probióticos e seu uso na aquicultura, bem como conhecer o agente patológico e os riscos oferecidos à saúde humana e animal (IRIANTO; AUSTIN, 2002).

Os probióticos destinados ao consumo humano e animais terrestres são em sua grande maioria bactérias Gram-positivas, notoriamente de eficiência comprovada (JENSEN *et al.*, 2012). O seu uso tem-se estendido à aquicultura, no entanto a flora bacteriana dominante no trato intestinal dos peixes é de bactérias Gram-negativas e que se apresentam em equilíbrio com o meio aquático (RINGO; GATESOUPE, 1998).

O uso de probióticos na aquicultura pode mudar a ecologia microbiana do ambiente e do hospedeiro, portanto questões de segurança para o ambiente, para as espécies-alvo e em última ênfase aos humanos devem ser analisadas (ATEINZA *et al.*, 2013). Os probióticos isolados do próprio peixe ou de seu meio apresentam-se como estratégia de não interferência nesse equilíbrio garantindo melhor qualidade do ambiente e sanidade para os organismos (BIDHAN *et al.* 2014).

Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar bactérias que apresentem atividade antagonista *in vitro* contra *Vibrio parahaemolyticus* e que atendam as condições propostas pela literatura científica para serem classificadas como potenciais probióticos que possam ser utilizados na aquicultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O USO DE ANTIBIÓTICOS NA AQUICULTURA

No ano de 1993 a China relatou perda de US \$ 750 milhões enquanto a Índia no período de 1995 a 1996 declarou perda de US \$ 210 milhões em consequência de doenças bacterianas, fúngicas e infecções virais na produção aquícola (CRUZ *et al.*, 2012). Como resposta a esse tipo de problema o uso de medicamentos veterinários e aditivos químicos, principalmente antibióticos, tornou-se comum também na aquicultura (FAO, 2006).

Segundo Scan (2003) o uso de antibióticos na década de 2000 já era comum na produção animal. Nesse mesmo ano, pesquisadores realizaram entrevistas junto a criadores de camarões na Tailândia com o objetivo de levantar informações sobre o uso de antibióticos na aquicultura intensiva. Dos 76 aquicultores entrevistados 48 faziam uso de antibióticos como prevenção de doenças, sendo que oito realizavam aplicações diárias e 15 usavam o medicamento como antiviral (HOLMSTROM *et al.*, 2003).

Com o aumento do uso de antibióticos na aquicultura, muitos deixaram de ser eficientes no controle de doenças bacterianas, em consequência do aumento de resistência por agentes patogênicos. Como exemplos pode-se citar o *Vibrio harveyi* resistente à Ampicilina e Nitrofurantoína, *Vibrio spp* resistente ao Ácido Oxolínico e Amoxicilina e *Vibrio anguillarum* resistente ao Furazolidone (DEFROIDT *et al.*, 2011).

A indústria aquícola tem mostrado um interesse crescente no controle de antibióticos buscando assim alternativas para manutenção de um ambiente microbiano saudável nos tanques de criação. Um método que tem ganhado atenção é o uso de probióticos para conter agentes patogênicos (GIL *et al.*, 2000).

2.2 PROBIÓTICOS

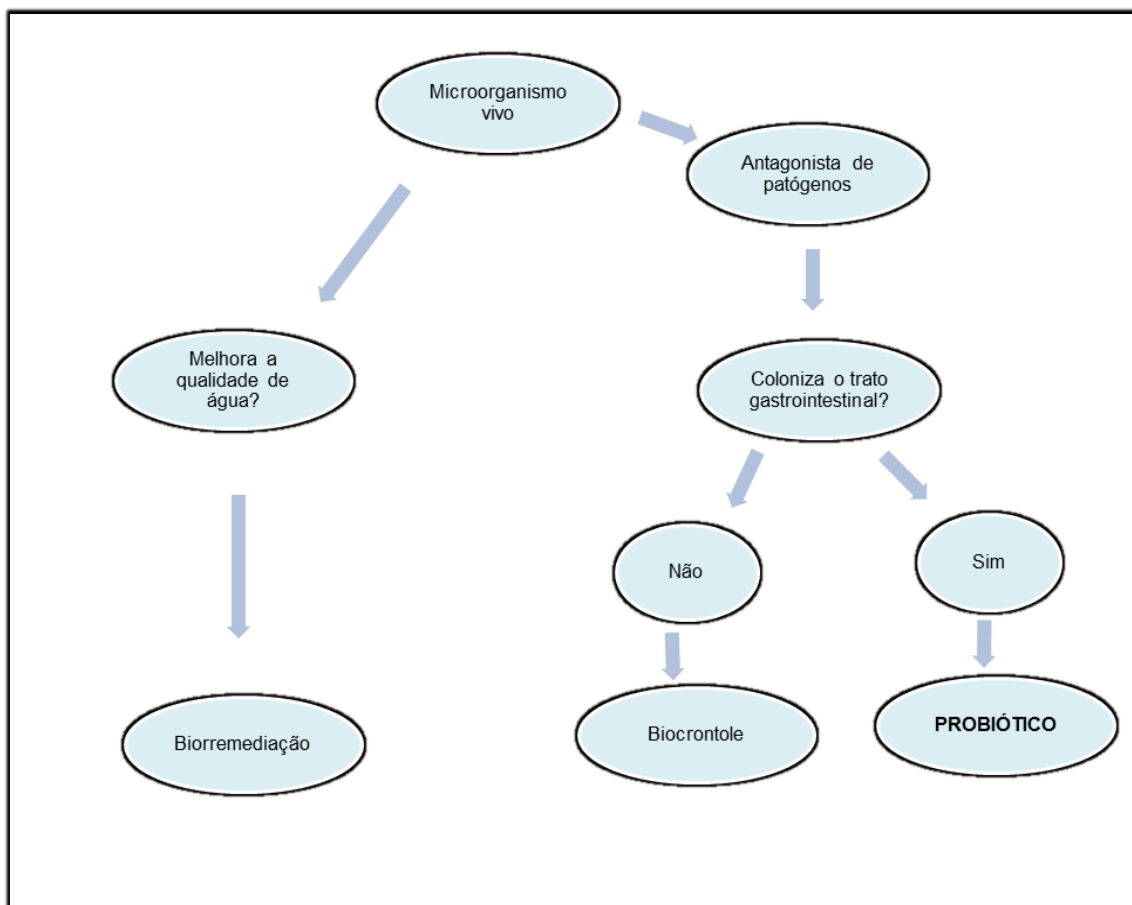
Na aquicultura o antagonismo natural entre a flora microbiana no qual o agente patogênico é reduzido ou morto é denominado biocontrole. Métodos aplicados para redução de agentes patogênicos na água de criação como aplicação de cloreto de sódio (NaCl), ozonização, luz Ultra Violeta, antibióticos, podem levar ao desequilíbrio do biocontrole ao deixar o ambiente livre de antagonistas, facilitando a entrada e proliferação de bactérias causadoras de doenças nos peixes (MAEDA *et al.*, 1997).

Na final da década de 1980 o termo probiótico foi definido como: “um suplemento de alimento microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal” (FULLER, 1989).

Com a introdução do uso de probióticos na aquicultura Gatesoupe (1999) levou em consideração o equilíbrio da flora intestinal de organismos que vivem em meio aquático e o ambiente, redefinindo probióticos como “células microbianas que são administradas de forma a entrar no trato gastrointestinal e a serem mantidas vivas, com o objetivo de melhorar a saúde” (Figura 1). Segundo o autor, na produção intensiva de larvas de peixes em ambientes controlados relativamente estéreis, uma comunidade microbiana pode não se desenvolver e conseqüentemente não desenvolver uma microbiota protetora no sistema digestivo, dando origem à pós-larvas suscetíveis a doenças quando expostas ao estresse ambiental e as bactérias potencialmente patogênicas.

Em 2001 a FAO ampliou o conceito definindo probióticos como bactérias que se consumidas vivas, em quantidades adequadas, têm efeitos benéficos para a saúde do homem e dos animais (FAO/WHO, 2001), Singh *et al.*(2011) ampliaram ainda mais o conceito incluindo fungos filamentosos e leveduras como organismos probióticos.

Figura 1- Definição esquemática de probióticos



Fonte: Adaptado de Gatezoupe (1999)

Os animais terrestres herdaram grande parte de suas bactérias colonizadoras diretamente do contato com a mãe. Já os peixes têm a superfície dos seus ovos colonizados pelas bactérias ambientais que o circundam e ainda quando em forma de larvas não possuem uma comunidade microbiana no trato intestinal dependendo diretamente da microbiota da água do cultivo. De tal forma, quando se trata de organismos aquáticos, não se deve restringir o conceito de probiótico apenas à colonização do trato intestinal por bactérias benéficas e sim a uma definição mais ampla onde um agente microbiano vivo modifica a comunidade microbiana associada ao hospedeiro e ao ambiente apresentando como consequência efeitos benéficos tais como melhor rendimento nutritivo, aumento da resposta do hospedeiro em relação à doença ou ainda melhorando a qualidade do ambiente (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

2.2.1 Modos de ação dos probióticos

Os modos de ação dos probióticos na aquicultura até o ano de 2000 ainda não eram totalmente elucidados. Dava-se ênfase aos benefícios para o hospedeiro, como melhoria na nutrição por desintoxicação, a desnaturação de componentes indigestíveis na dieta, produção de vitaminas, produção de compostos inibitórios e estimulação da imunidade (IRIANTO; AUSTIN, 2002). De acordo com Pereira e Vieira (2016) a eficiência da conversão alimentar e ganho de peso com o uso de probióticos na aquicultura vem mostrando-se cada vez mais eficiente.

Fuller (1989) determinou três possíveis modos de ação dos probióticos.

1 – Queda do número total de bactérias patogênicas viáveis devido à produção de antibacterianos, competição por nutrientes ou concorrência ao local de adesão no trato gastrointestinal.

2 – Aumento ou diminuição da atividade enzimática levando a alteração do metabolismo microbiano.

3 – Estimulação do sistema imunológico através do aumento dos níveis de anticorpos ou da atividade dos macrófagos.

Fuller (1989) ainda definiu as características desejáveis de um bom probiótico: um agente naturalmente não patogênico, que contenha células viáveis do micro-organismo proposto, resistente as características antimicrobianas inerentes do intestino do hospedeiro, deve manter-se estável nas condições de armazenamento e apresentar auto índice de sobrevivência quando reproduzido em larga escala. Em trabalho realizado em 2016, Guo *et al.* apresentaram o uso de probióticos como alternativa viável aos antibióticos. No entanto, ainda poucas cepas isoladas possuem os requisitos para atender a aquicultura.

2.2.2 O uso de probióticos na aquicultura

Inicialmente o uso de probiótico na aquicultura era focado para melhoria do crescimento e sanidade dos animais, porém seu uso expandiu-se para atingir melhores níveis de qualidade de água, digestibilidade de nutrientes, agente

anti-estressante e promotor de elevação dos índices reprodutivos (MARTINEZ *et al.*, 2012).

Em 1998, fazendas marinhas de camarão da espécie *Penaeus monodon* localizadas na Indonésia sofriam com baixo índice de sobrevivência do crustáceo (16%) devido à infestação de *Vibrio harveyi* em suas águas. Quando foram adicionadas cepas de *Bacillus* em alta densidade e passou-se a gerenciar uma floração estável de fitoplâncton, a taxa de sobrevivência dos camarões alcançou valores acima de 70% (MORIARTY, 1998).

Lara *et al.*(2003) suplementaram a alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com bactérias das espécies *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* alcançando melhor crescimento e desenvolvimento alimentar justificados pela melhor digestibilidade da dieta e das proteínas na ração.

A partir de água de aquários, Wesseling *et al.*(2015) selecionaram bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* sp. com potencial de formação de biofilmes e efeito probiótico para aplicação em telhas cerâmicas usadas como depósitos de ovos do peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*). As bactérias testadas apresentaram inibição para os patógenos *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* e *Vibrio harveyi*, principais agentes causadores da diminuição da eclosão de ovos e desenvolvimento das larvas.

Em 2016, Azevedo e colaboradores avaliaram a suplementação de rações para juvenis de Tambaqui com prebiótico, probiótico e simbiótico e constataram que a suplementação com probiótico melhorou os parâmetros de crescimento e o aproveitamento nutricional do alimento.

Em trabalho apresentado em 2017, Gao *et al.* isolaram uma bactéria com potencial probiótico frente a *Aeromonas salmonicida* a partir de um sistema de produção marinho de recirculação de água. Quantificaram a atividade antagonista, extraíram, purificaram, sequenciaram geneticamente e determinaram o mecanismo de atuação antimicrobiana no controle de furunculose para a espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris).

Dois estudos distintos realizaram testes semelhantes com probióticos em beijupirás (*Rachycentron canadum*) estocados em sistemas de produção diferentes.

No primeiro Geng *et al.*, (2012) realizaram testes com probióticos comerciais em alevinos estocados em tanques-rede no mar observando melhora da digestibilidade e ganho de peso, aumento de células fagocitárias e consequentemente aumento da resposta imune não específica e diminuição significativa da mortalidade.

No segundo Garrido-Pereira *et al.* (2014), enriqueceram rotíferos e artêmias com um probiótico comercial e ofertou-os a larvas em sistema de recirculação de água (RAS) não observando nenhum resultado significativo.

A velocidade de recirculação da água nos filtros e no esterilizador Ultra Violeta no sistema RAS pode ter proporcionado um ambiente hostil ao desenvolvimento de colônias bacterianas o que mostra a necessidade do desenvolvimento de probióticos com maior capacidade de colonização do trato gastro intestinal do peixe.

2.3 VÍBRIO

A família *Vibrionaceae* é um grupo de bactérias no qual se encontram tanto organismos de vida livre, como os de vida simbiótica. Compreendem uma pequena parcela do total de bactérias marinhas, no entanto é um grupo de grande valor. Dessa família destaca-se o gênero *Vibrio* que se apresenta como o mais estudado por ser causador de doenças em humanos como infecção em feridas, septicemia e gastroenterite. Todas as espécies pertencentes a essa família são bacilos curvos ou retos (NISHIGUCHI ; JONES, 2004. FAO/WHO, 2001).

De acordo com o Banco Mundial a estimativa de perdas com doenças na aquicultura em todo mundo no ano de 1997 foi de US \$ 3 bilhões (SUBASINGHE *et al.*, 2001). Em 2014 o Banco Mundial declarou que as perdas para a indústria da aquicultura em todo o mundo são estimadas pela

FAO em cerca de US \$ 6 bilhões anualmente (Word Bank, 2014), causadas principalmente pelo *Vibrio* spp., sendo este grupo predominante em ambientes estuarinos e fazendas marinhas apresentando-se como fator limitante da aquicultura marinha. Os sintomas mais comuns de contaminação por vibrios patogênicos em organismos aquáticos são necrose intestinal, anemia, líquido ascético, hemorragias petequiais na parede muscular e líquido na vesícula gasosa (CHATTERJEE ; HALDAR, 2012).

2.3.1 *Vibrio parahaemolyticus*

O *Vibrio parahaemolyticus* é uma bactéria halófila, Gram-negativa, componente natural da biota estuarina e da água do mar. A temperatura máxima de crescimento pode chegar a 44°C, o crescimento ótimo apresenta-se com a concentração de NaCl variando de 2% a 4%, grande tolerância a variação de pH, sobrevivendo entre pH 4,8 e 11,0 (HERNÁNDES *et al.*, 2005. CHAI; PACE, 1994), a sua distribuição se dá nas regiões costeiras temperadas e tropicais de todo mundo (BERGEY, 1994).

Em seres humanos, cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* são capazes de causar infecções de feridas, septicemia ou mais comumente gastroenterite aguda, o consumo de frutos do mar cru ou mal cozidos são os principais meios de infecção (BROBERG; CALDER; ORTH, 2011).

Em estudos realizados com uma espécie de Baiacu (*Tetraodon nigroviridis*) Peng *et al.* (2016) concluíram que o *V. parahaemolyticus* pode se espalhar através da corrente sanguínea, após nove horas de injeção de solução contendo o vibrio, no abdômen do peixe, observou-se células da bactéria no rim, baço e fígado do animal.

Nos sistemas aquícolas essas bactérias causam vibrioses em diversas espécies marinhas, são os principais agentes patogênicos bacterianos responsáveis pela alta mortalidade em várias espécies de peixes. O surto de vibriose ocorre principalmente quando os organismos são expostos a altas temperaturas, baixa qualidade da água e outros fatores de estresse relacionados. A podridão da cauda e das barbatanas é a doença mais comum

encontrada em muitas fazendas de peixes e causa sérias perdas econômicas (MARUDHUPANDI *et al.*, 2017).

Lee e colaboradores (2015) estudaram cepas de *Vibrio parahaemolyticus* provenientes da Tailândia, China, Vietnã, México, Estados Unidos e Taiwan e detectaram que 25% das cepas tornam-se virulentas ao incorporar um plasmídeo que codifica uma proteína mortal para organismos aquáticos.

Na Índia de 2001 a 2014 quase 14.000 pacientes diarréicos internados no Hospital das Doenças Infecciosas de Kolkata foram diagnosticados com 178 cepas distintas de *V. parahaemolyticus* (PAZHANI *et al.*, 2014). Na Espanha 80 casos de infecção foram relatados no ano de 2004 após consumo de frutos do mar contaminados (MARTINEZ-URTAZA *et al.*, 2005).

2.4 RESISTÊNCIA BIOLÓGICA AS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS E DE AGREGAÇÃO

A colonização do trato intestinal por cepas antagonistas é uma característica desejável de um probiótico, a aderência às células epiteliais do intestino impede sua eliminação imediata proporcionando vantagem competitiva. Para algumas bactérias probióticas a capacidade de agregação esta correlacionada com a adesão. Bactérias agregadas podem formar biofilmes ou aderir-se na superfície do intestino, diminuindo as chances de serem expulsas, facilitando a exercerem suas atividades metabólicas (DEL RE *et al.*, 2000, GRZEŚKOWIAK *et al.*, 2012).

A adesão inicialmente baseia-se em interações físicas que posteriormente possibilitam interações específicas entre adesinas e receptores complementares, esse processo quando ocorre entre bactérias da mesma espécie é denominado autoagregação (ALANDER *et al.*, 1997, ; PÉREZ *et al.*, 1998). A capacidade de adesão também é responsável por estabilizar a barreira gastrointestinal, impedindo patógenos de colonizarem ou aderirem á mucosa (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010).

Para garantir a viabilidade e funcionalidade, as bactérias probióticas devem suportar grande concentração de acidez e componentes da bile em condições semelhantes à do trato intestinal do organismo hospedeiro (MENCONI *et al.*, 2014).

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a seleção *in vitro* de bactérias com potencial probiótico que possam ser utilizadas no controle de *Vibrio parahaemolyticus*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias do trato intestinal de peixes marinhos;
- Selecionar e testar a capacidade de inibição das bactérias antagonistas isoladas frente à *Vibrio parahaemolyticus* através dos métodos de Picada central em Placa e *Pour Plate*.
- Testar a capacidade biológica das bactérias antagonistas em colonizar e resistir às condições do sistema gastrointestinal do hospedeiro.
- Caracterizar as bactérias antagonistas em relação aos aspectos morfológicos e fisiológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DOS PEIXES

Nesse estudo foram utilizados dois beijupirás (*Rachycentron canadum*) juvenis provenientes do sistema experimental de recirculação de água do Laboratório de Nutrição e Produção de Organismos Aquáticos (LANPOA), localizado no Instituto Federal do Espírito Santo Campus Piúma (Ifes – Piúma) e duas tainhas (*Mugil liza*) juvenis provenientes de ambiente natural, capturadas por tarrafa nas coordenadas 20° 58' 38.00" S 40° 43' 08.85" O. Os peixes foram encaminhados ao Laboratório de Ecologia Microbiana do Ifes – Piúma ainda em estado de frescor, onde foram realizadas todas as análises.

4.2 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ANTIMICROBIANOS

4.2.1 Isolamento das Bactérias

As bactérias foram isoladas através de adaptações no método proposto por Muroga *et al.*(1987). Os peixes foram dissecados, sendo o trato intestinal retirado, macerado e diluído a 10^{-1} em solução salina estéril (NaCl, 0,85%) (figura 2), homogeneizado por 10 minutos, diluído serialmente até 10^{-4} e semeados, 100 μ L de cada diluição, em placas de Petri contendo os meios de cultura Leite Peptonizado (LP) e Ágar Triptona de Soja (TSA), incubados por 24 h à 30°C. Após o período de incubação, identificaram-se as diferenças morfológicas entre as colônias bacterianas, isolando-as nos meios acima citados e incubando-as novamente por 24 h à 30°C.

Figura 2- Intestino de tainha inteiro, intestino de tainha macerado com solução salina.



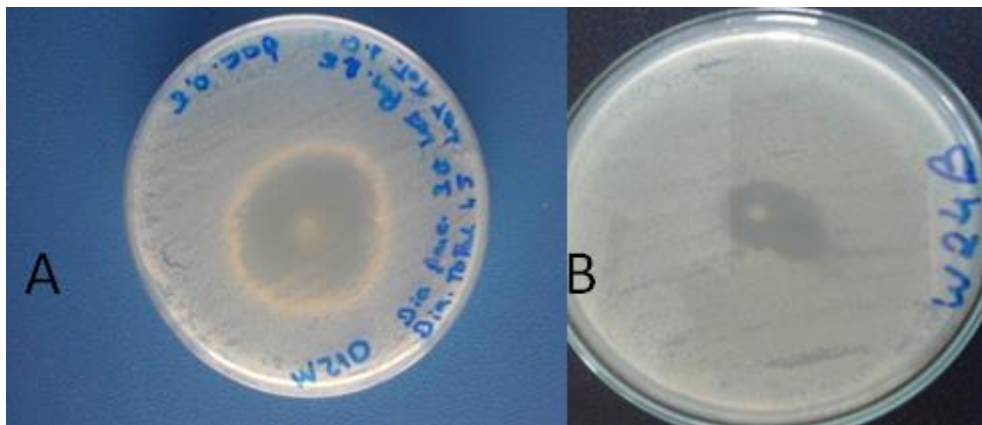
Fonte: Autor

4.2.2 Antagonismo Frente ao Patógeno

4.2.2.1 Teste de Inibição por Picada Central em Placa

O teste de inibição por picada central foi realizado com todas as bactérias isoladas do intestino dos peixes. A bactéria *V. parahaemolyticus* foi incubada em placas de Petri com o meio de cultura Ágar Nutriente com adição de 3% de NaCl (ANS), por 24 h à 35 °C. Diluiu-se o vibrio em caldo nutriente com 3% de NaCl (CNS), acertou-se a D.O._{600nm} para 0,04 (10^8 ufc/mL) utilizando espectrofotômetro, e inoculou em placas de Petri contendo ANS utilizando um swab. Cada uma das cepas bacterianas isoladas dos peixes foi transferida para as placas através de uma picada no centro, utilizando agulha de platina estéril, incubou-se por 24 h à 30°C. Este teste foi realizado para verificação de qualquer tipo de atividade antimicrobiana para posterior seleção para o teste de inibição utilizando o método de *Pour Plate* (SILVA *et al.*, 2010) (Figura 3).

Figura 3- Halo de inibição de Bactérias isoladas de Tainhas (A) e Beijupira (B) frente o *V. parahaemolyticus*.



Fonte: Autor

4.2.2.2 Teste de Inibição por *Pour Plate*

O *V. parahaemolyticus* tem seu crescimento ótimo em meio salino, o que pode inibir parcial ou totalmente o crescimento de algumas bactérias. Esse método consiste em sobrepor meios de cultura diferentes favorecendo o crescimento de bactérias que possuem exigências nutricionais diferentes. As bactérias antagonistas selecionadas através do método de picada central em placas, foram incubadas por 24 h a 30°C. Preparou-se solução de *V. parahaemolyticus* em solução salina estéril 0,85% NaCl (10^8 ufc/mL), dilui-se 1 mL dessa solução em 9 mL de ANS semi-sólido, vertendo-o sobre a bactéria antagonista, incubou por 24 h à 30°C para observação de halos de inibição.

4.3 TESTES DE RESISTÊNCIA BIOLÓGICA ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS E DE AGREGAÇÃO

4.3.1 Ensaio de Tolerância ao pH Gástrico e Sal Biliar

As metodologias usadas foram propostas por Sansawat e Thirabunyanon (2009). Para o teste de resistência em pH ácido acertou-se a D.O._{600nm} referente a 10^8 ufc/mL de cada bactéria em CNS, transferiu-se 100 µL da solução para 900 µL de solução salina tampão fosfato (pH a 2,5) e incubou-se

por 3 h a 30°C. Após o período de incubação, transferiu-se 100 µL da solução ácida para 900 µL de tampão fosfato, homogeneizou-se e semeou-se 50 µL para placa com meio ANS. Após incubação de 24 h a 30°C realizou-se a contagem do número de unidade formadora de colônias.

Para o teste de resistência a sais biliares, 100 µL da solução de cada bactéria foi transferido para tubo contendo 900 µL de CN com 0,3% de Extrato de Bile e incubados a 30°C por 24 h. 50 µL da suspensão foram esgotados em placa de ANS, incubados por 24 h a 30°C para posterior contagem.

4.3.2 Teste de Autoagregação

Para este teste foi usado o método proposto por Grzeskowiak *et al.*(2012) com adaptações. Cultivou-se a bactéria por 18 h à 25°C em CNS, transferiu-se uma alíquota para solução de Tampão Fosfato até acertar a D.O._{600nm} à concentração de 10⁸ ufc/mL. Dividiu-se a solução em quantidades iguais em dois tubos, um dos tubos foi denominado como controle e foi levado à estufa a 70°C por 20 minutos para inativação das bactérias. Após a inativação foi realizada nova leitura de ambos os tubos e foram incubados a 25°C realizando uma nova leitura da D.O._{600nm} após 1h.

O resultado foi obtido através da fórmula proposta por Grzeskowiak *et al.*(2012).

$$AT = 1 - (T_f / T_i) \times 100$$

Onde AT é a autoagregação, T_f é a leitura da D.O._{600nm} após 1 hora de incubação e T_i é a leitura da D.O._{600nm} anterior à incubação.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias foram caracterizadas quanto à morfologia das colônias, utilizando lupa estereoscópica, as bactérias que apresentaram morfologia semelhantes foram descartadas. O teste de coloração de Gram foi realizado após esfregaço em lâmina, utilizando o corante cristal violeta por um minuto, solução de lugol

por um minuto, seguido de descoloração em solução de álcool-acetona (1:1) e contracolorando com safranina.

Os testes bioquímicos foram realizados inoculando as bactérias em meios de cultura específico: Ágar Tríplice Açúcar Ferro, Caldo Lisina Descarboxilase, Ágar Citrato de Simmons, Ágar Lisina Ferro, Ágar Fenilalanina, Ágar Manitol, Ágar verde brilhante vermelho de fenol de lactose de sacarose, Ágar Bile Esculina.

O teste de catalase foi realizado após esfregaço em lâmina através da adição de peróxido de oxigênio e, observação da atividade enzimática pela formação de gás.

Observou-se a capacidade de crescimento e caracterização das colônias em Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose, Ágar Marine, Ágar Triptona de Soja e Ágar MAN, ROGOSA e SHARPE, os dois últimos com adição de 0,1% de corante azul de anilina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO BACTERIANO E SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS

Foram isoladas 121 cepas bacterianas morfológicamente diferentes em cada um dos meios de cultura utilizados. As bactérias isoladas foram estriadas nos mesmos meios de cultura, totalizando 242 amostras diferentes para o teste de antagonismo frente ao *V. parahaemolyticus*.

Todas as bactérias isoladas foram submetidas ao teste de picada central em placa para observação preliminar de qualquer atividade antimicrobiana, 36 bactérias apresentaram resultados positivos e foram selecionadas para o teste de inibição por *Pour Plate*, onde sete cepas apresentaram a presença de halos de inibição frente ao patógeno (Tabela1) e foram escolhidas para as análises posteriores.

O isolamento de um grande número de bactérias para seleção de poucas antagonistas em potencial foi registrado por Fjellheim (2010), quando compararam duas estratégias diferentes de seleção. Esses autores concluíram que estratégias diferentes se completam: de 500 cepas isoladas apenas cinco apresentaram potencial probiótico. Huys *et al* (2001) isolaram 127 cepas de bactérias de linguado (*Scophthalmus maximus*) e apenas 12 apresentaram potencial probiótico.

Tabela 1- Bactérias selecionadas para teste de inibição por *Pour Plate* frente o *Vibrio parahaemolyticus*. Resultados determinados pela formação de halos de inibição e tamanho do halo observado.

<i>Bactéria</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Tamanho do halo (mm)</i>
W33B1		X	
BI11		X	
W34A		X	
W11C1	X		11
W11C2	X		11
W32D		X	
W21B		X	
W11E		X	
W24B1		X	
B21C	X		14
IMBA		X	
W33B2		X	
BI22	X		Inibição total
W12C		X	
W14A		X	
W23A		X	
IABE	X		11
W12A		X	
BI12		X	
W32D1		X	
W132		X	
IPBB		X	
AMBI21		X	
W24B2		X	
IMB2LP	X		3
W22A	X		10
W21E		X	
W32H		X	
W24B2		X	
W24A		X	
W33B3		X	
W12A		X	
W23B		X	
W13D		X	
W21B		X	

Fonte: autor

Os resultados encontrados para tamanhos dos halos de inibição são bem próximos aos encontrados por Jatobá *et al.*(2008), esses registraram tamanho mínimo de halo de inibição de 10 mm quando testaram 6 cepas de bactérias Gram-positivas, isoladas de tilápia-do-nilo, frente a vários agentes patogênicos. Compararam suas atividades antimicrobianas com o resultado de inibição de diversos antibióticos onde todas as bactérias apresentaram atividade inibitória maior que da oxitetraciclina. Das sete cepas aqui analisadas, cinco apresentaram halos maiores que 10 mm. De acordo com Caipang *et al.*(2010), halos com diâmetro maior que 6 mm indicam cepas com forte ação inibitória.

5.2 RESISTÊNCIA BIOLÓGICA ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS E DE AGREGAÇÃO

5.2.1 Tolerância ao pH Gástrico e Sal Biliar

Sansawat e Thirabunyanom (2009) registraram taxas de sobrevivência acima de 95% e 90% em pH 2,5 e bile 0,3% respectivamente para *Bacillus subtilis* corroborando com os resultados aqui apresentados em que todas as bactérias apresentaram ótimo crescimento em pH ácido formando biofilme em toda a placa não permitindo a contagem (Tabela 2). Frente aos sais biliares os resultados mostraram-se igualmente positivos, todas as bactérias apresentaram taxa de sobrevivência acima de 50%.

Tabela 2- Densidade óptica á 600_{nm} e número de bactérias por mL utilizados para teste de acidez em pH 2,5 e teste de tolerância a bile a 0,3%, contagem final e índice de sobrevivência das bactérias antagonistas.

SC*- As bactérias cresceram em toda a placa não possibilitando a contagem.

<i>Bactérias</i>	<i>D.O_{600nm}</i>	<i>Contagem inicial (UFC/mL)</i>	<i>Contagem final</i>		<i>Sobrevivência em %</i>	
			<i>Bile</i>	<i>pH</i>	<i>Bile</i>	<i>pH</i>
W22A	0,07	2,5 x 10 ⁸	2,47 x 10 ⁷	SC	90,12	>100
W11C1	0,05	2,9 x 10 ⁹	2,52 x 10 ⁷	SC	99,13	>100
B122	0,07	9,3 x 10 ⁷	9,8 x 10 ⁷	SC	>100	>100
W11C2	0,04	1,5 x 10 ⁸	5,44 x 10 ⁷	SC	63,7	>100
IMB2LP	0,05	1,26 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁷	SC	98,4	>100
B21C	0,07	2,5 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁷	SC	89,6	>100
IABE	0,035	2,9 x 10 ⁸	SC	SC	>100	>100

Fonte: autor

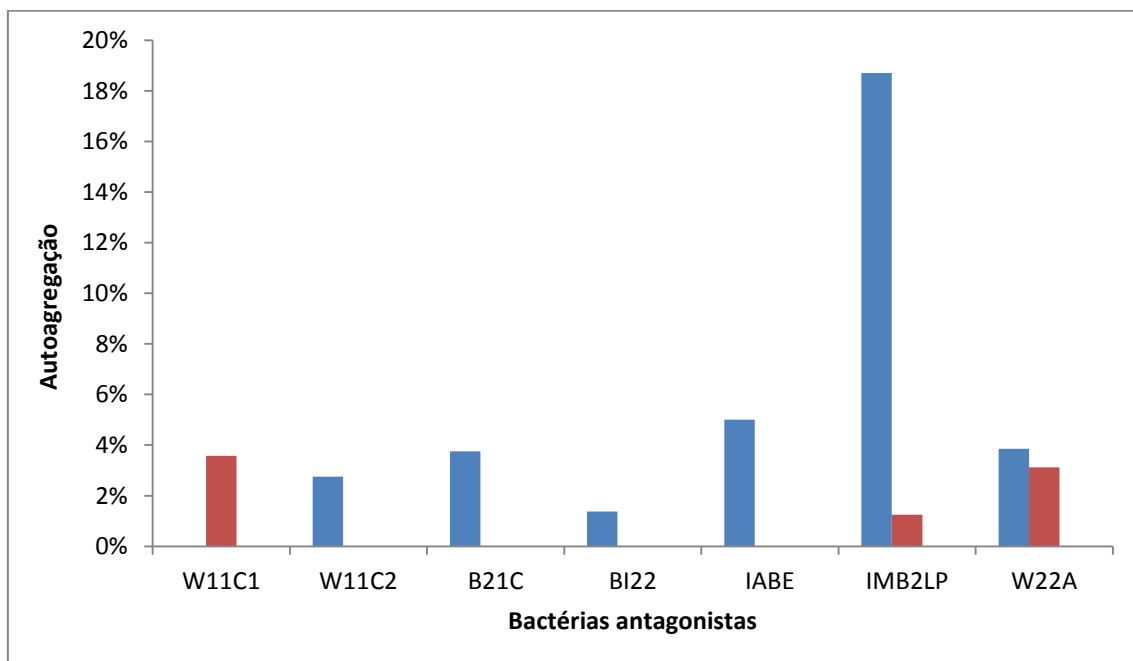
Costa *et al.*(2013) avaliaram 12 bactérias ácido-láticas, 8 apresentaram desempenho abaixo de 50% expostas a sais biliare. Já Nikoskelainen (2001) testaram seis bactérias probióticas usadas em humanos em concentrações de 10 % de bile de peixe, cinco delas não mostraram nenhuma diferença de contagens até uma hora e meia de exposição, nota-se a concentração muito elevada já que a concentração fisiológica da bile em peixes foi relatada como sendo de 0,4% á 1,3% no trato gastrointestinal (BALCÁZAR *et al.*, 2008)

Os sais biliare possuem ação detergente à membrana celular bacteriana constituída de lipídeos e ácidos graxos, já o HCl se difunde através da membrana até o citoplasma liberando prótons através de dissociação (GUCHTE *et al.*, 2002). A estirpe W11C2 apresentou a menor taxa de sobrevivência, 63,7 %.

5.2.2 Capacidade de Agregação ao Intestino do Hospedeiro

Seis bactérias apresentaram capacidade de agregação maior quando em sua forma viável (Figura 3) com variação de 1,3% a 18,7%, resultados próximos dos registrados por Grześkowiak *et al.*(2012) que apresentaram resultados de autoagregação para bactérias probióticas variando de 5,4% á 15%. Kos *et al.*(2003) em trabalho semelhante, apresentaram resultados de autoagregação para *Lactobacillus acidophilus*, após 1h de incubação, próximos a 30%.

Figura 4- Comparação da capacidade de autoagregação das bactérias antagonistas em suas formas viáveis e não viáveis. Azul- Formas viáveis. Vermelho- Formas não viáveis.



Fonte: autor

Algumas espécies de bactérias podem ser capazes de formar agregados quando utilizados em formas não viáveis. Isso pode ser devido a alterações específicas na superfície celular bacteriana causada pelo tratamento de aquecimento para obter células não viáveis Grześkowiak *et al.*(2012), o que pode explicar o resultado observado para a bactéria W11C1 que mostrou maior autoagregação em sua forma não viável.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DAS CEPAS ANTAGONISTAS

As bactérias que apresentaram formação de halos no teste de inibição por *Pour Plate* foram caracterizadas morfolologicamente (Tabela 2), pela capacidade de

multiplicação em meios de cultura específicos (Tabela 3) e através de testes bioquímicos (Tabela 4). As cepas antagonistas apresentam características específicas, dados que em conjunto possibilitam sua diferenciação.

5.3.1 Caracterização Morfológica

5.3.3.1 Tipo de Parede celular - Coloração de Gram

No presente estudo todas as bactérias foram isoladas de potenciais hospedeiros marinhos com o intuito de selecionar bactérias que fazem parte ou que transitem pelo trato intestinal do peixe, todas as bactérias antagonistas possuem parede do tipo Gram-negativa.

O grande uso de probióticos para humanos e animais terrestres se concentra nas bactérias Gram-positivas ácido lácticas (FULLER, 1989). Ao contrário, na aquicultura os probióticos englobam bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, bacteriófagos, leveduras e microalgas (IRIANTO E AUSTIN, 2002).

Spanggaard *et al.*(2001) isolaram 1018 bactérias da pele, brânquias e intestino de truta-arco-íris, dois terços eram Gram-negativas, do total 45 apresentaram atividades inibitórias com dominância de bactérias do gênero *Pseudomonas* frente ao *Vibrio anguillarum*.

Em estudo realizado em Taiwan, Chang e Liu (2002) testaram probióticos comerciais para mamíferos em geral, o *Bacillus toyoi* e o *Enterococcus faecium*, Gram-positivos, como antagonistas à bactéria Gram-negativa *Edwardsiella tarda*, causadora de septicemia bacteriana em uma espécie de enguia cultivada (*Anquilla anquilla*). Os probióticos testados não colonizaram satisfatoriamente o intestino da enguia não apresentando inibição *in vivo*. A inibição só ocorreu quando as concentrações dos probióticos superaram em mil vezes a concentração do patógeno.

Hjelm *et al.*(2004) selecionaram 15 estirpes de *Roseobacter* spp de larvas de linguado (*Scophthalmus maximus*) como agente antimicrobiano para *Vibrio anguillarum*, *Vibrio splendidus* e *Pseudoalteromonas* diminuindo a mortalidade das larvas vitelínicas a níveis significativos.

Souza e colaboradores (2010) isolaram do trato digestivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) três colônias distintas de cepas de bactérias ácido-láticas, duas com morfologia de cocos e uma de bacilos, todas Gram-positivas. Nos testes *in vitro* somente os cocos apresentaram antagonismo frente o *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*.

Propriedades antagonistas de *Pseudomonas* sp contra *Flavobacterium psychrophilum* foram determinadas quando Korkea-aho *et al.*(2011) realizaram estudos com truta-arco-íris, já Balcázar *et al.*(2007) não conseguiram inibir o crescimento desse mesmo patógeno usando cinco bactérias ácido-láticas diferentes.

Balcazar *et al.*(2006) ressaltaram a importância de isolar-se o probiótico do próprio organismo hospedeiro possibilitando maior chances de colonização e sucesso da bactéria probiótica.

5.3.3.2 Formato das colônias

A Tabela 3 mostra as diferenças morfológicas entre as colônias de bactérias observadas visualmente para as características formato da colônia, regularidade da borda, coloração e brilho das colônias.

Tabela 3- Caracterização das colônias de bactérias antagonistas segundo aspectos morfológicos.

<i>Bactéria</i>	<i>Formato da colônia</i>	<i>Borda</i>	<i>Cor</i>	<i>Brilho</i>
<i>W11C1</i>	Redondo	Irregular	Variando de branco leitoso a transparente	Brilhante
<i>W11C2</i>	Redondo	Regular	Branco transparente	Brilhante
<i>B21C</i>	Redondo	Regular	Leitoso no centro e transparente nas bordas	Brilhante
<i>BI22</i>	Redondo	Regular	Branco leitoso	Brilhante
<i>IABE</i>	Redondo	Regular	Branco amarelado	Opaco
<i>IMB2LP</i>	Redondo	Regular	Branco transparente	Brilhante
<i>W22 A</i>	Redondo	Regular	Branco leitoso	Brilhante

Fonte: autor

As bactérias apresentaram pouca diferenciação morfológica dentre as características observadas, apenas para o quesito coloração observou-se mais de dois padrões. No entanto, tal caracterização possibilita uma identificação prévia, utilizando os padrões encontrados, nos estudos de colonização intestinal de peixes. Posteriormente, pode ser realizada uma identificação mais específica.

5.3.3.3 Crescimento em meios de cultura específicos

A Tabela 4 compara as diferentes cepas probióticas isoladas de peixes, entre si, e com o patógeno *V. parahaemolyticus*.

Tabela 4- Caracterização das bactérias antagonistas e do *Vibrio parahaemolyticus* de acordo com o meio de cultura e corante utilizado.

<i>Crescimento bacteriano em meios de cultura</i>	<i>Vibrio</i>	<i>W11C1</i>	<i>W11C2</i>	<i>BI22</i>	<i>IABE</i>	<i>IMB2LP</i>	<i>W22A</i>	<i>B21C</i>
<i>TCBS</i>	Colônias verdes, meio de cultura verde	Colônias verdes, meio de cultura verde	Colônias amarelas, meio de cultura amarelo	Colônias amarelas e preta, meio de cultura amarelo	Colônias amarelas, meio de cultura amarelo	Sem crescimento	Colônias amarelas, meio de cultura amarelo	Colônias amarelas, meio de cultura amarelo
<i>Ágar marine</i>	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas	Crescimento bom, colônias brancas
<i>MRS com 0,1% de azul de anilina</i>	Sem crescimento	Sem crescimento	Colônias azuis claras	Colônias azuis claras	Colônias transparentes acinzentada	Sem crescimento	Colônias azuis claras	Colônias azuis claras
<i>TSA com 0,1% de azul de anilina</i>	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom	Colônias cinzas, meio de cultura marrom

Fonte: autor

Na caracterização de acordo com o meio de cultura e corantes utilizados observou-se crescimento satisfatório em todos os meios não apresentando nenhuma diferença entre as colônias cultivadas no meio TSA com 0,1% de azul de anilina e no meio Ágar marine, o que pode vir a dificultar a recuperação das bactérias quando administradas *in vivo*.

5.3.3.4 Caracterização bioquímica

Os resultados dos testes bioquímicos (Tabela 5) podem ser usados para uma identificação mais específica facilitando a recuperação das bactérias quando aplicadas em vivo e diferenciando-as do agente patogênico *Vibrio parahaemolyticus* através da identificação do metabolismo específico de cada bactéria.

Os testes foram realizados para entender melhor o metabolismo de cada bactéria, o que auxiliará em testes *in vivo*, na recuperação dessas bactérias do intestino dos peixes.

Tabela 5- Caracterização das bactérias antagonistas e do *Vibrio parahaemolyticus* através de testes bioquímico.

		<i>Vibrio</i>	<i>W11C1</i>	<i>W11C2</i>	<i>BI22</i>	<i>IABE</i>	<i>IMB2LP</i>	<i>W22A</i>	<i>B21C</i>
Fermentação de Carboídratos	<i>Glicose</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Lactose</i>	-	+	-	+	+	-	+	-
	<i>Sacarose</i>	-	+	-	+	+	-	+	-
	<i>Manitol</i>	+	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Produção de gás</i>	+	+	+	+	+	-	-	+
Produção de H₂S	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Descarboxilação ou desaminação de lisina	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Desaminação de fenilalanina	-	+	+	-	+	-	-	-	+
Utilização de citrato como fonte de C	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Hidrólise de esculina em presença de bile	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Atividade da enzima catalase	-	+	+	+	+	+	+	+	+

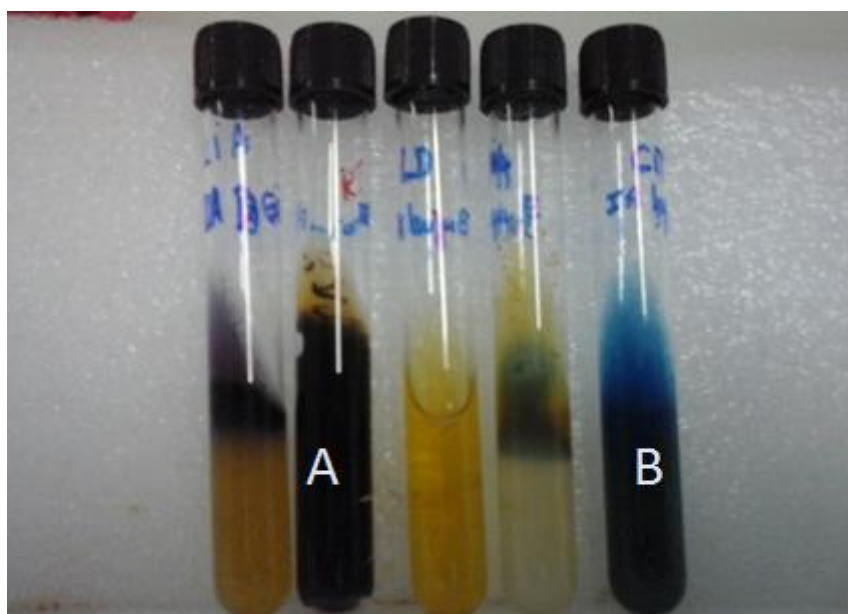
Fonte: autor

Com a combinação dos resultados observados torna-se possível a recuperação de qualquer uma das oito bactérias, mesmo quando aplicadas em conjunto. A importância dessa recuperação se dá frente a determinação da contagem final de uma bactéria alvo após a ingestão e colonização do trato gastrointestinal do peixe, possibilitando conhecer o seu desenvolvimento no organismo do hospedeiro.

No teste de fermentação de carboidratos foi possível diferenciar metabolicamente as bactérias a partir da combinação de diferentes substratos. O *Víbrio* não apresentou fermentação com lactose e sacarose diferenciando-o das bactérias W11C1, BI22, IABE e W22A. O *Vibrio parahaemolyticus* foi a única bactéria que apresentou resultado positivo para a descarboxilação da lisina tornando bem simples o processo de recuperação da bactéria do trato gastrointestinal quando aplicado *in vivo* conjuntamente com as bactérias aqui selecionadas como potencial probiótico.

Constatou-se a formação de H_2S a partir de aminoácidos ou compostos que contenham enxofre para as bactérias W11C1, IABE e B21C após a observação da formação de Sulfeto de Ferro, insolúvel e negro (Figura 5 A).

Figura 5- A- Precipitação de Sulfeto de Ferro a partir da decomposição de aminoácidos e formação de H_2S . B- Meio alcalinizado comprovando o uso de citrato como fonte exclusiva de Carbono.



Fonte: Autor

O *Vibrio parahaemolyticus* e as bactérias W22A e B21C não apresentaram a utilização de citrato como única fonte de Carbono para obtenção de energia. As demais bactérias apresentaram o meio alcalinizado (coloração azul) (Figura 5 B), confirmando serem capazes de usar o citrato como fonte exclusiva de Carbono.

5.4 Potencial Probiótico

As bactérias isoladas de Beijupirá BI22 e B21C foram as que apresentaram maior potencial probiótico seguidas da IABE também de Beijupirá, por fim as bactérias isoladas da Tainha W11C2 e W22A (Tabela 6).

Tabela 1- Comparação do potencial de inibição frente ao *Vibrio parahaemolyticus*, autoagregação e tolerância a bile e acidez das bactérias antagonistas.

Bactérias	Inibição	Autoagregação	Tolerância á bile	Tolerância á acidez
W11C1	++		+++	++++
W11C2	++	++	++	++++
BI22	++++	++	++++	++++
IABE	++	+++	++++	++++
IMB2LP	+	++++	+++	++++
W22A	++	+	+++	++++
B21C	+++	++	+++	++++

Fonte: autor

Das sete cepas selecionadas apenas a cepa W11C1, isolada de tainha, não atendeu os requisitos para ser determinada como um potencial probiótico. Apesar de apresentar boa capacidade de inibição, tolerância a bile e a acidez não possui capacidade de adesão o que limita sua atividade probiótica, no entanto estudos sobre as propriedades de adesão de algumas formas de bactérias necessitam de mais investigação (GRZEŚKOWIAK et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

O estudo apresenta seis bactérias com atividades probióticas frente o agente patogênico *Vibrio parahaemolyticus*. Explorou-se a flora intestinal de peixes marinhos confirmando a diversidade bacteriana e a potencialidade de desenvolvimento antimicrobiano a partir de organismos do próprio meio.

Todas as bactérias selecionadas apresentaram coloração para Gram negativo confirmando a potencialidade desse grupo como agente probiótico, por fazer parte da microbiota peixe.

As bactérias isoladas do trato gastrointestinal dos Beijupirás cultivados em sistema de recirculação de água apresentaram maior antagonismo no controle do *V. parahaemolyticus* e maior resistência às condições do organismo do hospedeiro, podendo ser consideradas potenciais probióticos.

Ressalta-se que o comportamento de cepas probióticas pode variar de acordo com a espécie alvo. Recomenda-se a continuação do estudo com testes *in vivo* para averiguação da toxicidade e da eficiência das cepas como probióticos.

7 REFERÊNCIAS

ALAM M. J.; TOMOCHIKA K. I.; MIYOSHI S. I. SHINODA S. Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 208, p. 83–87, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11064.x/full>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

ALANDER, M.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATILLA-SANDHOLM, T.; WRIGHT, A. Recovery of *Lactobacillus rhammosus* GG from human colonic biopsies. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 361-364, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.1997.00140.x/full>>. Acesso em: 20 ago. 2017.

ATIENZA, E. M.; GÓMEZ-SALA, B.; ARAÚJO, C.; CAMPANERO, C.; CAMPO, R.; HERNÁNDEZ, C.; CINTAS, L. M. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. **BMC Microbiology**. v. 13, p. 15, 2013. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-13-15>>. Acesso em: 20 ago. 2017.

AZEVEDO, R. V.; FILHO, J. C.; PEREIRA S.L.; CARDOSO, L. D.; JÚNIOR; M. V.V.; ANDRADE, D.R. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.51, n.1, p.9-16, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v51n1/1678-3921-pab-51-01-00009.pdf> >. Acesso em: 15 set. 2017.

BALCÁZAR, J.; DEBLAS, I.; ZARZUELA, I. R.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**. v. 114, p. 173-186, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506000265>>. Acesso em 15 set. 2017.

BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MÚZQUIZ, J. L. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Veterinary Microbiology**. v. 122, p. 373–380, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507000612>>. Acesso em: 15 set. 2017.

BALCÁZAR, J. L.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; MÚZQUIZ, J. L.; GIRONES, O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture**. v. 278, p.188–191, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848608001610>> Acesso em: 20 set. 2017.

BROBERG, C. A.; CALDER, T. J.; ORTH, K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. **Microbes Infect.** v. 13, p. 992-1001, 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1286457911001730/pdf?md5=d5f38026ddb9f4e8e8ee88313f411cd8&pid=1-s2.0-S1286457911001730-main.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2017.

BIDHAN, C.; MEENA, D. K.; BEHERA, B. K.; DAS, P.; MOHAPATRA, P. K.; SHARMA, A. P.. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. **Fish Physiology and Biochemistry.** v. 40, p. 921-971, 2014. Disponível em: <

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-013-9897-0>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

CAIPANG, C. M. A.; BRINCHMANN, M. F.; KIRON, V. Antagonistic activity of bacterial isolates from intestinal microbiota of Atlantic cod, *Gadus morhua*, and an investigation of their immunomodulatory capabilities. **Aquaculture Research.** v. 41, p. 294-256, 2010. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2009.02327.x/full>>. Acesso em 18 ago. 2017.

CHATTERJEE, S.; HALDAR, S. *Vibrio* Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. **Journal of Marine Science Research & Development.** 2012. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/662d/1ba1f9ca258d6a27a030a6457409e5cd94ea.pdf>>. Acesso em 19 ago. 2017.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H.F.; SILVA, G. C.; VIEIRA, R. H. S.F.; SAMPAIO, S. S. Susceptibilidade “*in vitro*” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** São Paulo. v. 45, p. 458-462, 2008. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/BJVRAS/article/view/769>>. Acesso em: 12 set. 2017.

COSTA, H.H.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L. B.; CUNHA, A. F.; RESENDE, M. F.; NUNES, A. C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.65, p.1858-1866, 2013. Disponível em:

<<http://www.ingentaconnect.com/content/doi/01020935/2013/00000065/0000006/art00038>>. Acesso em: 12 set. 2017.

CRUZ, P. M.; IBÁÑEZ, A. L.; HERMOSILLO, O. A. M.; SAAD, H. C. R. Use of Probiotics in Aquaculture. **ISRN Microbiology.** 2012. Disponível em:

<[file:///C:/Users/wander%20lucio/Downloads/916845%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/wander%20lucio/Downloads/916845%20(1).pdf)>. Acesso em: 03 nov. 2017.

DEFROIDT, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology.** v. 14, p. 251-258. 2011. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411000440>>. Acesso em: 03 nov. 2017.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, p. 438-442, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x/full>>. Acesso em: 04 nov. 2017.

FAO. **Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Report of a Joint**. Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture And Antimicrobial Resistance. 2006. Disponível em <http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/aquaculture_rep_13_16june2006%20.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2017.

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. P. 224, 2016. Disponível em:< <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

FAO/WHO. **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food**. Córdoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organisation; 2001. p.1-34. Disponível em: <www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> . Acesso em: 20 jul. 2017.

FJELLHEIM, A. J.; KLINKENBERG, G.; SKJERMO, J.; AASEN, I. M.; VADSTEIN, O. Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. **Veterinary Microbiology**. v.144, p.153–159, 2010.disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510000039>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

FRANZOLIN, M. R. Fundamentos da identificação bioquímicas das bactérias. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo, Atheneu, 2008, p.463.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol**. v. 66, p. 365–378. 1989. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x/full>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Review: Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 15-28, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160510001121>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

GARRIDO-PEREIRA, M. A.; SCHWARZ, M.; DELBOS, B.; RODRIGUES, R. V.; ROMANO, L.; SAMPAIO, L. Probiotic effects on cobia *Rachycentron canadum* larvae reared in a recirculating aquaculture system. **Lat. Am. J. Aquat. Res**. v. 42, 2014. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/1750/175032686020/>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**. v.180, p. 147-165, 1999. Disponível em : <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848699001878>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

- GAO, X. Y.; LIU, Y.; MIAO, L. L.; LI, E. W.; SUN, G. X.; LIU, Y.; LIU, Z. P. Characterization and mechanism of anti-*Aeromonas salmonicida* activity of a marine probiotic strain, *Bacillus velezensis* V4. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 101, p. 3759–3768, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8095-x>. Acesso em: 16 nov. 2017.
- GENG, X.; DONG, X-H.; TAN, B-P.; YANG, Q-H.; CHI, S-Y.; LIU, H-Y.; LIU, X-Q. Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture Nutrition**. v. 18, p. 46-45, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2095.2011.00875.x/full>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- GIL, B. G.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**. v. 191, p. 259-270, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848600004312>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- GODE-POTRATZ, C. J.; KUSTUSCH, R. J.; BREHENY, P. J.; WEISS, D. S.; MCCARTER, L. L. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. **Mol. Microbiol.** V. 79, p. 240–263, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2010.07445.x/full>>. Acesso em: 16 out. 2017.
- GOOGLE. Google Earth. 7.3.0.3832, 2017, Piúma, Espírito Santo. Disponível em: <<https://www.google.com.br/intl/pt-PT/earth/>>. Acesso em: 17 jul. 2017.
- GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T. F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 3, p. 969–973, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/3/969.short>>. Acesso em: 20 set. 2017.
- GRZESKOWIAK, L.; COLLADO, M.; SALMINEN, S. Evaluation of aggregation abilities between commensal fish bacteria and pathogens. **Aquaculture**. v. 356-357, p. 412-414, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848612002190>>. Acesso em: 02 dez. 2017.
- GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 82, p. 187-216, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020631532202>>. Acesso em: 02 dez. 2017.
- GUO, X.; CHEN, D.D.; PENG, K. C.; CUI, Z. W.; ZHANG, X. J.; LI, S.; ZHANG, Y. A. Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 52, p. 74 - 84, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816300961>>.
Acesso em: 07 nov. 2018.

HEALTH AND WELFARE STATISTICAL ASSOCIATION . **Food sanitation. J. Health Welf. Stat.** v. 47, p. 287–301, 2000.

HERNÁNDEZ, C.; ULLOA, J.; VERGARA, J. A.; ESPEJO, R.; CABELLO, F. *Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergente public health problems in Chile. **Rev. Med. Chil.** v. 133, n. 9, p. 1081. 2005.
Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/16311702>>. Acesso em: 08 agos. 2017.

HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZA, A.; NIELSEN, J.; MELCHIORSEN, J.; JENSEN, S.; DUNCAN, H.; AHRENS, P.; BIRKBECK, H.; GRAM, L. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. **Systematic and Applied Microbiology.** v. 27, p. 360-371, 2004. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004702726>>.
Acesso em 13 jul. 2017.

HOLMSTROM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTROM, A.; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTSSON, B.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **Food Science + Technology.** v. 38, p. 255-256, 2003. Disponível em:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x/full>>.
Acesso em: 16 set. 2017.

HUYS, L.; DHERT, P.; ROBLES, R.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. **Aquacultue.** v. 193, p. 25-37, 2001. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848600004749>>.
Acesso em: 28 nov. 2017.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Review: Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases.** v.25, p.633–642, 2002. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x/full>>.
Acesso em: 28 nov. 2017.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico. **Pesq. agropec. bras.** v. 43, p.1201-1207, 2008. Disponível em:
<<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/392>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology.** v.153, p. 216-222, 2012. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160511006805>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

KORKEA-AHO, T. L.; HEIKKINEN, J.; THOMPSON, K. D.; WRIGHT, A. V.; AUSTIN, B. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium*

psychophilum. **Applied Microbiology**. v. 111, p. 266-277, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2011.05044.x/full>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, M.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, p. 981-987, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752805>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

LARA, F.; OLVERA, N.; GUZMÁN, M.; LÓPEZ, M. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. v. 216, p.193–201,2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848602002776>>. Acesso em: 03 jun. 2017.

LEE, C.T.; CHEN, I.T.; YANG, Y.T.; KO, T.P.; HUANG, Y.T.; HUANG, J.Y.; HUANG, M.F.; LIN, S.J.; CHEN, C.Y.; LIN, S.S.; LIGHTNER, D.V.; WANG, H.C.; WANG, A.H.J.; WANG, H.C.; HOR, L.I.; LO, C.F. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 112, p.10798-10803, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/112/34/10798.short>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. The concept of biological control methods in aquaculture. **Hydrobiologia**. v. 358, p 285-290, 1997. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-2097-7_45>. Acesso em: 20 nov. 2017.

WILLIAMS & WILKINS. **Manual de Bergey (Manual of Determinative Bacteriology)**. 9. ed. Baltimore. p. 516-550, 1994.

MARTÍNEZ, C. P.; IBÁÑEZ, L. A.; HERMOSILLO, O. M. A.; RAMÍREZ, S. H. C. Use of Probiotics in Aquaculture. **ISRN Microbiology**.v. 2012, 2012. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&q=MART%C3%8DNEZ%2C+C.+P.%3B+IB%C3%81%C3%91EZ%2C+L.+A.%3B+HERMOSILLO%2C+O.+M.+A.%3B+RAM%C3%8DREZ%2C+S.+H.+C.+Use+of+Probiotics+in+Aquaculture>>. Acesso em: 16 jun. 2017.

MARTINEZ-URTAZA J., SIMENTAL L., VELASCO D., DEPAOLA A., ISHIBASHI M., NAKAGUCHI Y., *et al.*(2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. **Emerg. Infect. Dis.** v. 11, p. 1319–1320, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320470/>>. Acesso em: 05 ago. 2017.

MARUDHUPANDI, T.; KUMAR, T.T.A.; PRAKASH, S.; BALAMURUGAN, J.; DHAYANITHIA, N.B. *Vibrio parahaemolyticus* a causative bacterium for tail rot disease in ornamental fish, *Amphiprion sebae*. **Aquaculture Reports**. v. 8, p. 39-44, 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513416301429>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

MENCONI, A., KALLAPURA, G., LATORRE, J.D., MORGAN, M.J., PUMFORD, N.R., HARGIS, B.M., TELLEZ, G. Identification and characterization of lactic acid bacteria in a commercial probiotic culture. **Microbiota Food Health**. v. 33, p. 25–30, 2014. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bmfh/33/1/33_bmfh-2013-014/_article/-char/ja/>. Acesso em 25 jul. 2017.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**. V. 164, p. 351–358, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848698001999>>. Acesso em: 16 out. 2017.

MUROGA, K.; HIGASHI, M.; KEITOKU, H. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. **Aquaculture**. v. 65, p. 79-88, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848687902729>>. Acesso em: 20 set. 2017.

NEWAJ-FYZUL, A.; AL-HARBJ, A. H.; AUSTIN, B. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. **Aquaculture**.v. 431, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0044848613004249>>. Acesso em: 20 set. 2017.

NEWTON A.; KENDALL M.; VUGIA D. J.; HENAO O. L. MAHON B. E. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. **Clin. Infect. Dis**. v. 54, p. 391-395, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/54/suppl_5/S391/433512>. Acesso em: 02 dez. 2017.

NIKOSKELAINEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G.; OUWEHAND, A. C. Characterization of the properties of human- and dairy- derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 67, p. 2430-2453, 2001. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/67/6/2430.short>>. Acesso em: 15 out. 2017.

NISHIGUCHI, M. K.; JONES, B. W. Microbial biodiversity within the *Vibrionaceae*. In: **Origins, Evolution, and the Biodiversity of Microbial life**. SECKBACK, J. (Ed). Kluwer. Netherlands. 2004.

VIEIRA, B. B.; PEREIRA, E. L. Potencial dos Probióticos Para o Uso na Aquicultura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 14, p. 1223-1241, 2016. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/viewFile/3765/pdf_654>. Acesso em: 13 out. 2017.

PAZHANI G. P., BHOWMIK S. K., GHOSH S., GUIN S., DUTTA S., RAJENDRAN K. Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic

strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. **PLOS Neglected Tropical Diseases**.v. 8, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002815>>. Acesso em: 16 jun. 2017.

PENG, W.; SHI, Y.; FEILI, G.; GEHE, L.; SILIANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, L. RANLIN, H.; QILU, D. *Tetraodon nigroviridis*: A model of *Vibrio parahaemolyticus* infection. **Fish e Shellfish Immunology**. v 56, p. 388-396, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1050464816304399#sec1>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

PÉREZ, P.F.; MINNAARD, Y.; DISALVO, E.A.; ANTONI, G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, p. 21 – 26, 1998. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/64/1/21.short>>. Acesso em: 03 jul. 2017.

FRANÇOIS, E. R.; GATESOUBE, J. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**. v. 160, p. 177-203, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0044848697002998>>. Acesso em: 01 set. 2017.

SANSAWAT, A.; THIRABUNYANON, M. Anti-*Aeromonas hydrophila* activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. **Maejo International Journal of Science and Technology**. v. 3, p. 77-87, 2009. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AV20120138159>>. Acesso em: 28 out. 2017.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.; SILVEIRA, N.F.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A.; OKAZAKI, M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Ed. Varela. 624p. 2010.

SCAN. **Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance**. European Commission Health and Consumer Protection Directorate-Genera. 2003. Disponível em:<https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed_additives_rules_scan-old_report_out79.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2017.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 1, p. 287-290, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2221169111601743>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

SOUZA, R. M.; J.L.; MOURIÑO, J. L.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; ANDREATTA, E. R.; SEIFFERT, W. Q.; CERQUEIRA, V. R. Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*, Poey, 1860). **Bol. Inst. Pesca**. v. 36, p. 17 – 24, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Felipe_Do_Nascimento_Vieira/publication

/262361946_Selection_of_Potential_Probiotic_Bacteria_to_Use_in_Fat_Snook_Centropomus_Parallelus_Poey_1860_Culture/links/578a47e708ae7a588eebc2c4.pdf>. Acesso em: 02 set. 2017.

SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, J.; SICK, E.B.; PIPPER, C.B.; MARTINUSSEN, T.; SLIERENDRECHT, W.J.; GRAM, L. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. **Environmental Microbiology**. v. 3, p. 755–765, 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-2920.2001.00240.x/full>>. Acesso em: 08 set. 2017.

SUBASINGHE, R. P.; BONDAD-REANTASO, M. M.; MCGLADDER, S. E.. Aquaculture development, health and wealth. In **Aquaculture in the third millennium. Technical proceedings of the conference on Aquaculture in the third Millennium**. Roma, Italy: NACA, Bangkok and FAO. p. 176- 191, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/005/x8482e/x8482e00.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2017.

TAVECHIO, W.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **B. Inst. Pesca**. v. 35, p. 335-341, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/35_2_335-341.pdf>. Acesso em: 28 set. 2017.

VERSCHUERE, L.; ROUMBAUUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 655-671, 2000. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/content/64/4/655.short>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

WANG, F.; NISHINO, N.. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 2380-2387, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez120.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0022030208711883>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

WESSELING, W.; WITTKA, S.; KROLL, S.; SOLTMANN, C.; KEGLER, P.; KUNZMANN, A.; RISS, H. W.; LOHMEYER, M. Functionalised ceramic spawning tiles with probiotic *Pseudoalteromonas* biofilms designed for clownfish aquaculture. **Aquaculture**. v. 446, p. 57-66. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848615002215>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

WORLD BANK. **Reducing Disease Risk in Aquaculture. Agriculture and Environmental Services Discussion**. World Bank Report. v. 9, n. 88257-glb, 2014. Disponível em: <<http://documents.worldbank.org/curated/pt/110681468054563438/pdf/882570REPLACEM00NAME0Reantaso0Melba.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2017.