



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS LÁTICAS FRENTE À PATÓGENOS DE ORIGEM ANIMAL

Maria Carolina Bertolo **Bonin**¹; Ana Lucia **Penteado**²; Sonia Claudia do Nascimento de **Queiroz**³;

Nº 19405

RESUMO – *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* são bactérias causadoras de doenças severas em peixes, ocasionando perdas significativas na aquicultura. Para tratar essas doenças são utilizados antibióticos, os quais podem deixar resíduos nos alimentos e ocasionar resistência antimicrobiana. Desse modo, o controle de patógenos e a profilaxia de enfermidades devem ser realizados de tal forma que minimizem os impactos negativos nos organismos aquáticos, nos seres humanos e no meio ambiente. Assim, tem se buscado alternativas mais saudáveis para substituir essas moléculas sintéticas e o uso de probióticos é uma delas. Neste trabalho, foi estabelecida uma metodologia para avaliar as atividades antagonistas de bactérias ácidos láticas contra patógenos de peixes, realizando testes pelo método de difusão em ágar, a qual será aplicada posteriormente em ensaios para descoberta de novos probióticos, isolados de intestino de peixes. Para isso, os patógenos avaliados foram inoculados em placas de Ágar Triptona Soja (TSA) e em seguida bactérias láticas comerciais (ou sobrenadantes provenientes do meio de cultivo) foram colocadas em orifícios realizados nas placas de TSA e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período foram realizadas as medições dos halos formados. Observaram-se formação de halos inibitórios para *Aeromonas hydrophila* e para *Streptococcus agalactiae*. Após neutralização dos sobrenadantes observou-se que os halos desapareceram, indicando que a inibição foi devido aos ácidos produzidos pelas bactérias. Os resultados indicam que o bioensaio estabelecido foi implementado com sucesso e que pode ser utilizado em estudos objetivando a obtenção de probióticos específicos para peixes.

Palavras-chaves: *Aeromonas hydrophila*; *Streptococcus agalactiae*; aquicultura; probióticos.

ABSTRACT – *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* are bacteria that cause severe diseases in fish, causing significant losses in aquaculture. Antibiotics are used to treat these diseases,

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Farmácia, UNIFAJ, Jaguariúna-SP; mariacarolinabertolo@gmail.com

2 Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; analucia.penteado@embrapa.br

3 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; sonia.queiroz@embrapa.br



*which can leave residues in food and cause antimicrobial resistance. Thus, pathogen control and disease prophylaxis should be performed in a manner that minimizes negative impacts on aquatic organisms, humans and the environment. We have sought healthier alternatives to replace these synthetic molecules and the use of probiotics is one of them. In this work, a methodology was established to evaluate the antagonistic activities of lactic acid bacteria against fish pathogens, performing tests by the agar diffusion method, which will be applied later in tests for the discovery of new probiotics, isolated from fish intestines. For this, pathogens evaluated were inoculated in Tryptone Agar Soy (TSA) plates and then commercial lactic bacteria (or supernatants from the culture medium) were placed in holes made in the TSA plates and incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 24 hours. The measurements of the formed halos were carried out after this period. Inhibitory halos were formed for *Aeromonas hydrophila* and for *Streptococcus agalactiae*. The halo disappeared after neutralization of the supernatants, indicating that the inhibition was due to the acids produced by the bacteria. The results indicate that the established bioassay was successfully implemented and that it can be used in studies aiming at obtaining probiotics specific for fish.*

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; *Streptococcus agalactiae*; fish farming; probiotics.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de pescados no Brasil aumenta a cada ano devido a procura da população por alimentos mais saudáveis e pela variedade proteica que pode ser encontrado nesses animais (CAMPOS, 2018). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura - FAO, até 2030 espera-se que haja um aumento de 33% no consumo de peixes somente na América Latina, sendo esse aumento importante para a expansão aquícola (ONU, 2018). Para essa elevada demanda é necessário que haja um controle de qualidade rígido dos alimentos que serão ofertados ao consumo da população. As doenças transmitidas por alimentos têm tido acréscimo significativo mundialmente, decorrente do aumento das populações, e por consequência da produção em larga escala de alimentos (SILVA, 2019). Todo esse avanço contribui para que as enfermidades bacterianas estejam presentes, levando tanto a existência de reservatório microbiano, ocasionando patologias em humanos e animais, quanto a perdas significativas na produção aquícola, afetando assim o desenvolvimento econômico (GRAM *et al.*, 1999).

Aeromonas hydrophila é um bacilo Gram-negativo e anaeróbio facultativo (CANGUSSU, 2019). Essa bactéria pode ser encontrada no solo, na água (doce, salgada, potável, de reuso), no



esgoto, em alimentos (peixes, frutos do mar e carnes vermelhas), que servem como reservatórios para reprodução desses patógenos, e em fezes humanas e de animais (GRAM *et al.*, 1999; CANGUSSU, 2019). Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo *A. hydrophila* pode ser patogênica para seres humanos e animais, saudáveis e imunodepressivos, causando gastroenterite e septicemia. Assim como infecções em ferimentos, provocando necrose dos tecidos pela liberação de enzimas produzidas pela bactéria (SÃO PAULO, 2000; CANGUSSU, 2019). É causador de grandes perdas na piscicultura pela alta taxa de mortalidade dos peixes em âmbito global (GRAM *et al.*, 1999). É preocupação para a saúde pública, uma vez que produz exotoxinas e multiplica-se mesmo em temperaturas de refrigeração, podendo ser transmitidos para humanos através da ingestão de alimentos congelados (PEIXOTO *et al.*, 2012).

O *Streptococcus agalactiae* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo, classificado no grupo sorológico B de Lancierfield (TRABULSI *et al.*, 1989). Realiza fermentação láctica e tem como produto final o ácido láctico (ANVISA, 2019). É agente etiológico de meningites e septicemias em humanos podendo ser encontrado no trato gastrointestinal, nas vias aéreas superiores e na membrana vaginal humana (TRABULSI *et al.*, 1989; FRAILE; LÓPEZ, 2019). Nos peixes caracteriza-se também por causar septicemia, assim como movimentação lenta e natação em círculos pela necrose do sistema nervoso, falta de apetite, exoftalmia, ascite, escurecimento e hemorragia corporal, necrose em células inflamatórias nos rins, fígado e cérebro desses animais (AQUAVAC, 2019; SCHERING-PLOUG, 2017; MARCUSSO *et al.*, 2017). Essa bactéria é uma das responsáveis pela alta taxa de mortalidade nos viveiros aquícolas em todo o mundo, acarretando impacto econômico negativo, pela taxa de mortalidade ser maior na população adulta e assim o investimento realizado é perdido (MARCUSSO *et al.*, 2017; FREY; WOBETO, 2018).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são bacilos ou cocos, podendo ser Gram-positivos ou negativos, essas bactérias pertencem à ordem *Lactobacillales*, subdivididas em 10 gêneros, entre eles os *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, e *Bifidobacterium* (BRUNO, 2011; SILVA, 2011). As BALs obtêm energia pela fermentação dos carboidratos, formando ácido láctico (80%), assim como outros ácidos orgânicos e bacteriocinas (BRUNO, 2011; MASSAGUER, 2005). A presença de BALs e/ou substâncias produzidas tornam o ambiente inapropriado para o crescimento e desenvolvimento de patógenos e quando presentes na microbiota intestinal, podem ocasionar melhoras na saúde do hospedeiro pela simbiose entre eles (RIBEIRO *et al.*, 2008; MASSAGUER, 2005). Essas bactérias podem estar presentes em alimentos comerciais ou pela suplementação através de probióticos, por possuírem eficácia comprovada na regulação e no melhoramento da microbiota intestinal tanto nos seres humanos quanto nos animais (BRUNO, 2011).



O uso indiscriminado dos antibióticos levou a um aumento da resistência microbiana (VERSCHUERET *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2008) assim, os probióticos podem ser promissores para a substituição dos mesmos, pois elimina as bactérias patogênicas presentes nos animais, sem causar tal resistência aos patógenos (MATYAR *et al.*, 2009). Portanto podem ser usados para reduzir a mortalidade, aumentar o ganho de peso, por meio de uma melhor ingestão e digestão dos alimentos, e melhorar a imunidade na produção aquícola (FREY; WOBETO, 2018). Desse modo, o presente estudo teve por objetivo implementar uma metodologia para avaliar o antagonismo *in vitro* de bactérias ácido lácticas, frente aos patógenos *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*. Uma vez estabelecida essa metodologia, a mesma será utilizada em pesquisas envolvendo a descoberta de novos probióticos, isolados de intestinos de peixes, para serem utilizados na suplementação alimentar aquícola e assim reduzir as perdas na piscicultura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental – Raquel Ghini da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna no período de fevereiro a junho de 2019.

2.1 Bactérias ácido lácticas adquiridas comercialmente

Foram utilizadas 15 espécies de bactérias ácido lácticas isoladas, 3 produtos na forma de “pool” e uma na forma de leite fermentado, todas obtidas comercialmente, conforme apresentado na Tabela 1. Todas as BALs liofilizadas, obtidas nas farmácias de manipulação, apresentaram certificado de análise de acordo com os padrões estipulados e dentro do prazo de validade.

Tabela 1. Bactérias ácido lácticas utilizadas, país de origem e concentração (logUFC.mL⁻¹) em cada ativação.

Bactérias ácido lácticas	Origem	Concentração (logUFC.mL⁻¹)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Leiba®)	Brasil	5.10 ⁶
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>*	Itália	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Lactococcus lactis</i>, <i>Bifidobacterium lactis</i>, <i>Bifidobacterium bifidum</i> (Flora 5®)	Brasil	1.10 ⁹ cada
<i>Lactobacillus acidophilus</i>*	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>*	Itália	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium lactis</i>, <i>Bifidobacterium longum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i>, <i>Bifidobacterium breve</i>, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Lactobacillus salivarius</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i> (Healthy origins®)	Estados Unidos da América	3.10 ⁹



<i>Lactobacillus casei</i> *	Itália	-
<i>Bifidobacterium bifidus</i> *	Brasil	-
<i>Lactobacillus casei Shirota</i> (leite fermentado <i>Yakult</i> ®)	Brasil	-
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bélgica	1.10 ⁹
<i>Bacillus clausii</i> *	Índia	2,65.10 ⁹
<i>Bifidobacterium adolescentes</i> *	Bélgica	1.10 ¹⁰
<i>Lactobacillus fermentum</i> *	China	1,1.10 ¹⁰
<i>Lactobacillus plantarum</i> *	Bélgica	2.10 ⁹
<i>Lactobacillus crispatus</i> *	China	2,1.10 ¹⁰
<i>Lactobacillus reuteri</i> *	Bélgica	2.10 ⁹
<i>Streptococcus thermophilus</i> *	Bélgica	9,7.10 ⁹
<i>Bifidobacterium infantis</i> *	China	1,1.10 ¹⁰
<i>Lactobacillus paracasei</i> *	Bélgica	1.10 ¹⁰

-: não há informação; * obtido de farmácia de manipulação.

2.1.1 Preparo do inóculo

Cada bactéria ácido láctica ou o “pool” de bactérias (*Leiba*®, *Healthy origins*®, *Flora 5*®) foram ativadas em tubos contendo 5 mL de leite em pó preparado na concentração de 10% e em tubos contendo 5 mL de MRS Broth (Lactobacilos Caldo) acrescido de leite em pó diluído em água com concentração final de 2%, ambos estéreis, e incubadas a 35 ± 2°C, em estufa bacteriológica por 48 horas. Após esse período foi realizada a leitura do pH do meio e analisado se houve ou não coagulação do leite. Para cada teste foi realizado uma nova ativação.

2.2 Patógenos bacterianos de origem animal

Os patógenos de origem animal utilizados neste estudo foram o *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) e a *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966). As culturas foram ativadas em tubos contendo 5 mL de TSA inclinado, estéril, sendo o *S. agalactiae* armazenado em jarra de anaerobiose para que houvesse crescimento ausente de O₂, ambas foram em seguida incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 35 ± 2°C por 24 horas. Após o crescimento destes microrganismos, com auxílio de uma alça, os inóculos foram passados separadamente para soluções salina a 0,85% estéril e realizado o ajuste da concentração destas bactérias na solução para aproximadamente 1x10⁸ UFC/mL.



2.3 Avaliação de antagonismo direto *in vitro*

Para avaliação do antagonismo foram utilizadas placas de Petri descartáveis, estéreis de 9 cm, onde as bactérias *A. hydrophila* e *S. agalactiae* foram inoculadas separadamente da solução salina para o meio TSA, previamente fundido a temperatura de 45°C, sendo que foi utilizada a proporção de 0,01 ml de patógeno na solução para cada 1 ml de meio. Em seguida por meio do método de difusão em ágar, foram realizados poços de 5 mm de diâmetro com auxílio de pipetas Pasteur e inoculado 70 µL das bactérias ácido lácticas dentro de cada poço, tanto as leite 10%, quanto em meio MRS acrescido de leite em pó a 2%. As placas foram incubadas à 35 ± 2°C por 24 horas e em seguida foram analisados os resultados, por meio da medição do halo de inibição com régua milimétrica. Os ensaios foram realizados dentro do fluxo laminar de nível II, para que não houvesse nenhuma contaminação, sendo realizado cada experimento duas vezes, em dias diferentes e cada repetição em uma placa de Petri, assim foi feito a média aritmética entre as duas medições realizadas e calculado o desvio padrão. Sendo utilizada uma placa controle com o patógeno e um disco de Florfenicol®, antibiótico aprovado para tratamento de peixes, em todos os testes.

2.3.1 Análise da capacidade inibitória dos sobrenadantes das culturas ácido lácticas.

As bactérias ácido lácticas que apresentaram halos de inibição foram inoculadas novamente em leite em pó diluído em água na concentração de 10%, e após incubação a 35 ± 2°C por 72hrs, foram realizadas as leituras do pH. O meio com a bactéria crescida foi centrifugado à 3500 rpm por 20 minutos, para obtenção do sobrenadante a ser avaliado. Em seguida, *Aeromonas hydrophila* foi inoculada em TSA, em placa de Petri, para realização do método de difusão em ágar, conforme descrito anteriormente. Foram feitos orifícios no meio de cultura TSA e adicionado o sobrenadante inalterado pH 4,0 e o neutralizado com adição de NaOH 1,25N até que atingisse pH 7,0. As placas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24 horas e realizada a medida dos diâmetros dos halos de inibição. O experimento foi realizado três vezes, em dias diferentes e cada repetição em uma placa de Petri, assim foi feito a média aritmética e o desvio padrão entre as três medições realizadas.

2.3.2 Análise da capacidade inibitória dos sobrenadantes concentrados das culturas ácido lácticas

Os sobrenadantes que apresentaram ação inibitória foram concentrados 4 vezes (de 2,0 ml para 0,5 ml) com auxílio de gás nitrogênio e testados. Em seguida, foram incubados a 35 ± 2°C por 24 horas e realizada a leitura quanto a formação dos halos. O experimento foi realizado apenas uma vez.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antimicrobiana

Todas as bactérias ácido lácticas apresentaram inibição frente à *A. hydrophila* quando cultivadas em leite em pó a 10%, mas apenas 9 delas inibiram o crescimento deste patógeno quando cultivadas em meio MRS acrescido de leite em pó (2%). Para *S. agalactiae* apenas 3 bactérias lácticas cultivadas em leite 10% apresentaram formação de halo e quando cultivada em meio MRS acrescido de leite em pó (2%) apenas uma BAL apresentou halo de inibição, conforme demonstrado na tabela 2. A placa controle com o disco de Florfenicol® apresentou halo de inibição de 35 mm em todos os testes realizados. Portanto o meio mais adequado para inoculação foi leite 10%.

Tabela 2. Média do halo de inibição (mm) formado por bactérias ácido lácticas frente a *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* quando cultivados em meio leite (10%) e MRS Broth[®] (Lactobacilos Caldo) acrescido de leite (2%).

Bactérias ácido lácticas	<i>A. hydrophila</i>		<i>S. agalactiae</i>	
	Leite 10%	MRS+Leite (2%)	Leite 10%	MRS+Leite (2%)
Leiba®	7,7 ± 2,5	9,5 ± 0,7	0	0
Lactobacillus bulgaricus	9,5 ± 0,6	2,7 ± 0,0	0	0
Flora 5®	9,2 ± 1,7	0	0	0
Lactobacillus acidoph	7,3 ± 1,5	0	0	0
Lactobacillus rhaminosus	9,2 ± 1,5	0	2,0 ± 0,0	0
Healthy origins®	6,0 ± 0,0	0	0	0
Lactobacillus casei	4,0 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0	0
Bifidobacterium bifidus	6,3 ± 1,4	0	0	0
Lactobacillus casei Shirota	7,3 ± 1,4	3,5 ± 0,0	6,0 ± 0,0	0
Enterococcus faecium	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	0	0
Bacillus clausii	10,5 ± 0,7	0	0	0
Bifidobacterium adolescentes	13,5 ± 2,1	10,0 ± 1,4	0	5,0 ± 0,0
Lactobacillus fermentum	10,0 ± 0,0	0	0	0
Lactobacillus plantarum	14,0 ± 2,1	4,0 ± 0,0	6,5 ± 0,0	0
Lactobacillus crispatus	11,5 ± 3,5	0	0	0
Lactobacillus reuteri	5,0 ± 0,0	0	0	0
Streptococcus thermoph	11,0 ± 2,1	0	0	0
Bifidobacterium infantis	14,5 ± 3,5	12,0 ± 0,0	0	0
Lactobacillus paracasae	12,0 ± 0,0	10,0 ± 1,4	0	0

3.2 Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes

Foram testados os sobrenadantes das BAL para avaliação da atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* em pH 4 (ácido) e neutro (pH 7) e foi possível verificar que apenas o pH ácido mostrou atividade antagonista devido provavelmente a formação de ácidos orgânicos durante a fermentação (BRUNO, 2011; MASSAGUER, 2005), como apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Média do halo de inibição (mm) formado por sobrenadante ácido (pH 4) e neutro (pH 7) de bactérias ácido lácticas frente a *Aeromonas hydrophila*.

Bactérias ácido lácticas	<i>A. hydrophila</i> sobrenadante ácido	<i>A. hydrophila</i> sobrenadante neutro
Leiba®	7,3 ± 0,0	0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10,7 ± 1,2	0
Flora 5®	0	0
<i>Lactobacillus acidoph</i>	0	0
<i>Lactobacillus rhaminosus</i>	3,7 ± 0,0	0
Healthy origins®	5,0 ± 0,0	0
<i>Bifidobacterium bifidus</i>	3,7 ± 0,0	0
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	3,0 ± 0,0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	3,0 ± 0,0	0
<i>Bacillus clausii</i>	5,7 ± 0,0	0
<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	6,3 ± 0,7	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	9,7 ± 1,5	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7,3 ± 1,4	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	7,0 ± 0,7	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	9,0 ± 1,0	0
<i>Streptococcus thermoph</i>	3,3 ± 0,0	0
<i>Bifidobacterium infantis</i>	5,7 ± 0,7	0
<i>Lactobacillus paracasae</i>	10,0 ± 0,0	0

Os resultados mostraram que *Lactobacillus bulgaricus* e *paracasae* apresentaram maior inibição contra *A. hydrophila*, com halos maiores ou iguais a 10 mm. A capacidade inibitória pela neutralização do sobrenadante foi eliminada também conforme descrito por Pereira e Gómez (2007). Neste trabalho a inibição ocorreu em pH 4, no qual o caráter ácido do meio de crescimento se torna impróprio para o crescimento do patógeno, e as BAL apresentam crescimento nesse meio, tornando o meio favorável a elas (MASSAGUER, 2005). Portanto o sobrenadante possui substâncias que podem ser fontes de moléculas com atividade antimicrobiana, as quais podem vir a ser utilizadas em novos produtos para uso na aquicultura. Para isso torna-se necessário identificar as substâncias produzidas durante a fermentação.

3.2.1 Sobrenadante concentrado

O aumento da formação do halo de inibição para os sobrenadantes concentrados foi observado nas BALs e/ou “pool”, sendo elas *Flora*®, *Leiba*®, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. paracasae*, *Healthy origins*®, *Bacillus clausii*, *L. crispatus*, *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium bifidus*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* contra *A. hydrophila*, conforme demonstrado na tabela 4.

Os resultados de testes de antagonismo dos sobrenadantes concentrados frente à *S. agalactiae*, apresentaram inibição das seguintes BALs e/ou “pool”, sendo elas *Lactobacillus bulgaricus*, *Flora 5*®, *Lactobacillus acidophilus*, *Healthy origins*®, *Bifidobacterium bifidus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus clausii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus paracasae*, conforme demonstrado na tabela 4.

Quando o sobrenadante foi neutralizado nenhuma das BALs apresentou formação de halo, frente aos dois patógenos, conforme descrito na tabela 4. A melhora dos resultados pela concentração do sobrenadante e a ausência de inibição pela neutralização do sobrenadante já foram descritos por Pereira e Gómez (2007), o qual está em consonância com os resultados obtidos nessa pesquisa.

Tabela 4. Halo de inibição (mm) formado por sobrenadantes concentrados ácido (pH 4) e neutro (pH 7) de bactérias ácido lácticas frente a *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*.

Bactérias ácido lácticas	<i>A. hydrophila</i>		<i>S. agalactiae</i>	
	Sobrenadante ácido	Sobrenadante neutro	Sobrenadante ácido	Sobrenadante neutro
<i>Leiba</i> ®	12,5	0	0	0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	16,0	0	17,0	0
<i>Flora 5</i> ®	11,0	0	0	0
<i>Lactobacillus acidoph</i>	14,0	0	0	0
<i>Healthy origins</i> ®	13,0	0	0	0
<i>Bifidobacterium bifidus</i>	17,0	0	16,0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	12,0	0	9,0	0
<i>Bacillus clausii</i>	16,0	0	10,0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	17,0	0	17,0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	12,0	0	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	15,0	0	10,0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	14,0	0	9,0	0
<i>Streptococcus thermoph</i>	13,0	0	0	0
<i>Bifidobacterium infantis</i>	13,0	0	0	0
<i>Lactobacillus paracasae</i>	15,0	0	11,0	0

A figura 1 apresenta o teste de antagonismo de duas BALs frente à *Aeromonas hydrophila*, onde demonstra o halo formado quando inoculado cada BAL em leite 10% e evidencia a inibição pela inoculação do sobrenadante inalterado e concentrado, pelo aumento da atividade e do aumento da concentração dos compostos gerados durante a fermentação, assim como a não formação de halo quando esses sobrenadantes foram neutralizados.

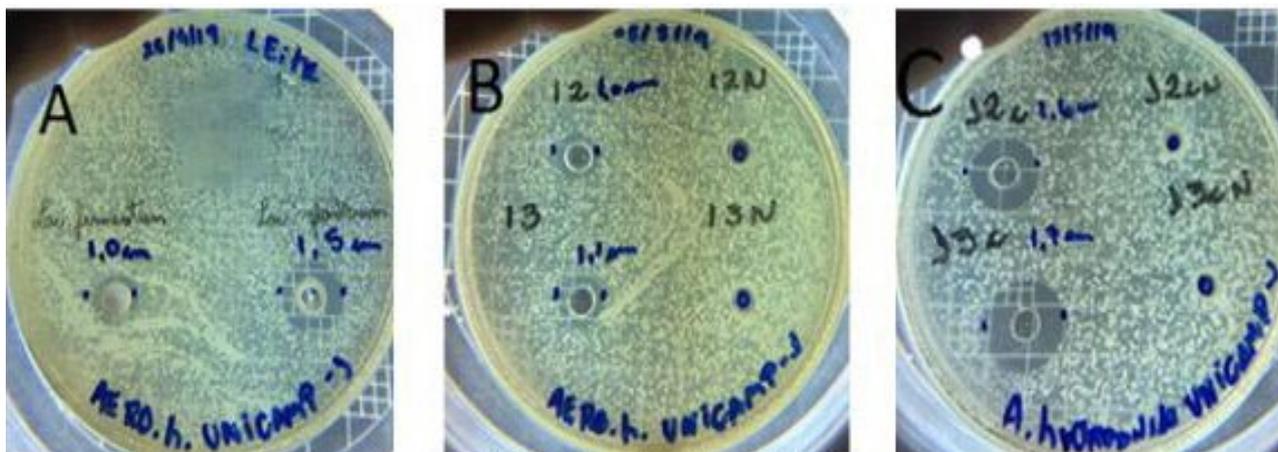


Figura 1: Comparação dos halos de inibição das bactérias ácido lácticas frente à *Aeromonas hydrophila*. **A:** *Lactobacillus fermentum* (10mm) e *Lactobacillus plantarum* (15mm), inoculados com o meio (leite 10%). **B:** Inoculado o sobrenadante ácido e neutro (N) das BAL. *Bacillus clausii* (12- 10mm e 12N- 0mm) e *Lactobacillus fermentum* (13- 11mm e 13N- 0mm). **C:** Inoculado o sobrenadante concentrado ácido e neutro (N) das BAL. *Bacillus clausii* (12-16mm e 12N- 0mm) e *Lactobacillus fermentum* (13- 17mm e 13N- 0mm).

4 CONCLUSÃO

O bioensaio para avaliação do antagonismo de bactérias ácido lácticas frente aos patógenos *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* foi implementado com sucesso e poderá ser utilizado em estudos objetivando a descoberta de novos probióticos específicos para peixes. Como resultados adicionais aos objetivos iniciais da pesquisa, pode-se concluir também que todos os probióticos comerciais utilizados, que são destinados ao consumo humano, apresentaram inibição frente à *Aeromonas hydrophila* enquanto que *Lactobacillus bulgaricus*, Flora 5®, *Lactobacillus acidophilus*, Healthy origins®, *Bifidobacterium bifidus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus clausii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus paracasae* inibiram o crescimento de *Streptococcus agalactiae*. Como os patógenos também são causadores de doenças em seres humanos, o consumo de probióticos pode contribuir para a proteção da saúde dos mesmos frente aos alimentos contaminados com esses patógenos. As substâncias produzidas na fermentação pelas bactérias ácido lácticas que possuem propriedades antimicrobianas podem vir a ser utilizadas como suplemento alimentar tanto para humanos quanto para animais. Entretanto



maiores estudos devem ser realizados a fim de identificar quais são as substâncias produzidas por cada BAL e a viabilidade de seu uso.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida. As orientadoras por todo o ensinamento e a todos que me auxiliaram nesse presente trabalho.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA. **Módulo 4 gram positivos: III- *Streptococcus* spp: 2. Importância clínica.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/imp_stre.htm>. Acesso em: 13 maio 2019.

AQUAVAC. ***Streptococcus*.** Madison: AQUAVAC, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.aquavac-vaccines.com/disease-center/streptococcus/>>. Acesso em: 13 maio 2019.

BRUNO, L. M. **Manual de curadores de germoplasma: micro-organismos: bactérias ácido lácticas.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia, 2011. 15p.

CAMPOS, E. **Consumo de peixes nunca foi tão alto no Brasil, 2018.** Disponível em: <<https://canalrural.uol.com.br/programas/consumo-peixes-nunca-foi-tao-alto-brasil-71704/>>. Acesso em: 8 maio 2019.

CANGUSSU, L. ***Aeromonas ssp*: atlas microbiologia da água.** Disponível em: <<https://www.luciacangussu.bio.br/atlas/aeromonas-spp/>>. Acesso em: 31 janeiro 2019.

FRAILE, R.; LÓPEZ, M. C. ***Streptococcus agalactiae*.** Granada: Control Calida SEIMC, [s.d.]. Disponível em: <<https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/agalac.pdf>>. Acesso em: 9 maio 2019.

FREY, V. J.; WOBETO, S.; Utilização de probióticos em aquacultura. **Revista Aquaculture Brasil**, Laguna, SC, 13. ed., p 42-47. 23 out. 2018. Disponível em: <<https://issuu.com/aquaculturebrasil/docs/13-ed-revista-aquaculture-brasil-is>>. Acesso em: 21 maio 2019.

GRAM, L. *et al.* **Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2: a possible probiotic treatment of fish.** **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.3, p.969-973, 1999.

MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; MARINHO-NETO, F.; Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*oreochromis niloticus*), **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares.** Brasil: Varela, 2005. 264p.

MATYAR, F. *et al.* ***Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea).** **Environmental Monitoring Assessment**, CIDADE, v.167, p.309-320, 2009.

ONU. **FAO: consumo de pescado na América Latina e no Caribe crescerá 33% até 2030.** [S.l.]: ONU, 2018. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/fao-consumo-de-pescado-na-america-latina-e-no-caribe-crescera-33-ate-2030/>>. Acesso em 8 maio 2019.

PEIXOTO, L. J. S. *et al.* ***Aeromonas spp.*: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados.** **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.



PEREIRA V. G.; GÓMEZ R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p.229-240, abr./jun. 2007.

RIBEIRO, P. A. P.; COSTA, S. L. S.; LOGATO, P. V. R. Probióticos na aquicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 6, n. 1, p.837-846, jan./fev. 2008. Disponível em: <<https://www.nutritime.com.br/revista-eletronica/>>. Acesso em: 2 maio 2019.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Saúde. CVE/SES-SP. **Manual das doenças transmitidas por alimentos *Aeromonas hydrophila* e outras spp.** São Paulo: Secretária de Saúde, 2000. 3 p. (Informe-Net Dta)

SCHERING-PLOUG. **Principais doenças bacterianas em criações comerciais de peixes no Brasil**: módulo 1 tilapicultura. Cotia: Schering-Ploug, [s.d.] 2017. 8 p. (Boletim técnico). Disponível em: <<https://www.snatural.com.br/wp-content/uploads/2017/05/Doencas-Peixes-Tratamento.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

SILVA, L. DE J. M. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico do queijo São Jorge DOP.** [S.l.: s.n.], 2011. 39 p. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2034819/mod_resource/content/1/Aula%20Bruno.pdf>. Acesso em: 17 maio 2019.

SILVA, P. R. S.; **Manual das DTA's.** Jundiaí-SP: Etec Benedito Storani, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.ebah.com.br/content/ABAAABB6YAE/manual-das-dtas#>>. Acesso em: 2 maio 2019.

SMITH, P. R. *et al.* Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. *In*: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (ed.). **Guide to antimicrobial use in animals.** Oxford: WilleyBlackwell, 2008. p. 207-216.

TRABULSI, L. R. *et al.* **Microbiologia.** São Paulo: Atheneu, 1989. p. 157, 164-165.

VERSCHUERE, L. *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Madison, v. 64, n. 4, p. 655–671, 2000.