

Avaliação da atividade antagonista de bactérias ácido láticas e seus metabólitos frente a patógenos de origem animal**Evaluation of the antagonistic activity of lactic acid bacteria and their metabolites against animal pathogens**

DOI:10.34117/bjdv5n10-104

Recebimento dos originais: 10/09/2019

Aceitação para publicação: 09/10/2019

Maria Carolina Bertolo Bonin

Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Farmácia, UNIFAJ, Jaguariúna-SP.

E-mail:mariacarolinabertolo@gmail.com

Ana Lucia Penteado

Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

E-mail:analucia.penteado@embrapa.br

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

E-mail:sonia.queiroz@embrapa.br

RESUMO

Aeromonas hydrophila e *Streptococcus agalactiae* são bactérias responsáveis pela incidência 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 deve ser realizado com a finalidade de minimizar 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 bactéria ácido láticas (BALs) e ou seus produtos de metabolismo é uma delas. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antagonista de bactérias ácidos láticas bem como o produto do metabolismo destas, cultivada em dois diferentes meios de crescimento, leite em pó à 10% e meio “De Man Rogosa & Sharpe” (MRS) acrescido de leite (2%) em pó, contra patógenos de peixes, pelo uso do método de difusão em ágar. Os patógenos avaliados foram inoculados em meio Ágar Triptona Soja (TSA) e em seguida bactérias láticas comerciais (ou sobrenadantes provenientes do meio de cultivo) foram colocadas em orifícios realizados no meio TSA e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após este período foram realizadas as medições das zonas de inibição. O maior tamanho de zona de inibição foi observado para as cepas inoculadas em leite em pó a 10%. Após neutralização dos sobrenadantes observou-se que as zonas de inibição desapareceram, indicando que a inibição foi provavelmente devido aos ácidos produzidos pelas bactérias. Os resultados indicam que os meios onde as bactérias láticas foram cultivadas apresentaram diferentes resultados de antagonismo. O uso destes meios de cultivo e os metabólitos produzidos pelas BALs poderão ser utilizado em estudos posteriores, com o objetivo de testar diferentes cepas de bactérias ácido lática com atividade antimicrobiana específica para peixes.

Palavras-chaves: *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, peixes, antimicrobiano

ABSTRACT

Aeromonas hydrophila and *Streptococcus agalactiae* are bacteria responsible for the incidence of severe diseases in fishes, causing significant losses in aquaculture. To treat these diseases antibiotics are used which can leave residues in food and cause antimicrobial resistance. Thus, pathogen control and disease prophylaxis should be performed in order to minimize negative impacts on aquatic organisms, humans and the environment. Thereby healthier alternatives have been sought to replace these synthetic molecules and the use of lactic acid bacteria (LABs) and/or their metabolism products is one of them. In this work, we evaluated the antagonistic activity of lactic acid bacteria and their metabolism products grown in two different growth media; 10% milk powder and “De Man Rogosa & Sharpe” (MRS) plus milk (2%) in powder, against fish pathogens, by using the agar diffusion method. The pathogens were inoculated on Tryptic Soy Agar (TSA) and then commercial lactic acid bacteria (or supernatants from the growth culture medium) were placed in holes made in the TSA medium and incubated at 35 ± 2 ° C for 24 hours. After this period the diameters of the inhibition zones were measured. The largest inhibition zones was observed for the strains growth in 10% milk powder. After neutralization of the supernatants it was observed that the inhibition zones disappeared, indicating that the inhibition was probably due to the acids produced by the bacteria. The results indicate that the media where the lactic bacteria were grown showed different antagonism results. The use of these culture media and the metabolites produced by LABs could be used in further studies with the aim to test different strains of lactic acid bacteria with specific antimicrobial activity for fish.

Key-words: *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, fishes, antimicrobial

1 INTRODUÇÃO

O consumo de pescados no Brasil aumenta a cada ano devido à procura da população por alimentos mais saudáveis e pela variedade proteica que pode ser encontrado nestes produtos (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 na América Latina e no Caribe, 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. Estima-se que doenças transmitidas por alimentos (DTAs) aumente no século 21, especialmente com mudanças globais, incluindo crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos e rações animais, que influenciam a segurança alimentar internacional (Ministério da Saúde, 2019). Soma-se a isto a perda de peixes em viveiros causados por doenças bacterianas (Gram, et al, 1999). Conforme Novotny et al., (2004) as infecções humanas causadas por patógenos transmitidos por peixes ou pelo ambiente aquático são bem comuns sendo dependentes da estação do ano, do contato do paciente com o peixe, do meio ambiente relacionado, dos hábitos

alimentares e do sistema imune da pessoa envolvida. Frequentemente as espécies bacterianas patogênicas envolvidas atingem tanto humanos como peixes, dentre os microrganismos envolvidos encontra-se *Aeromonas hydrophila* uma bactéria na forma de bastonete Gram-negativo e anaeróbia facultativa. As espécies móveis do gênero *Aeromonas* são microrganismos aquáticos que ocorrem em água doces, marinhas e estuários. Essa bactéria também pode ser encontrada em peixes, camarões, ostras, caranguejos, carnes, frangos e leite cru, saladas pré-preparadas, e água mineral engarrafada e em fezes de animais (Franco e Landgraf, 2003).

Devido ao fato destas bactérias serem microrganismos ubíquos veiculados pela água e alimentos crus, algumas espécies deste gênero são consideradas importantes patógenos causadores de transtornos principalmente à saúde dos seres humanos e à economia da piscicultura (Barroco, 2013). Isto é de preocupação para a saúde pública, uma vez que esse microrganismo produz exotoxinas e multiplica-se mesmo em temperaturas de refrigeração, podendo ser transmitidos para humanos através da ingestão de alimentos refrigerados (Landgraf, 2003).

Outra bactéria de preocupação é o *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria patogênica Gram-positiva, a qual possui a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, sendo reconhecida coma a principal agente etiológico de surtos de septicemia e meningite encefalite em peixes de criação no mundo inteiro (Tavares et al., 2016). Estas doenças infecciosas são consideradas o principal impedimento para o desenvolvimento da aquicultura e a principal causa de perda econômica (Mian, et al., 2009). Em humanos é um patógeno oportunista que coloniza os tratos digestivos e urogenitais inferiores de pessoas saudáveis podendo ser isolado do trato genito urinário e gastrointestinal em mais de 35% de adultos saudáveis (Melin et al., 2013; Bliss et al., 2002). As atividades de bactérias ácido lácticas tem sido avaliada como possíveis antagonistas contra patógenos de peixe (Gatesoupe, et al. 1994; Joborn, et al. 1997; Kjellebert et al., 1997). Estes microrganismos têm como principal característica a fermentação de carboidratos com produção de ácido láctico. Todas são Gram positivas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativa, podem ser cocos ou bacilos não esporulados (Massaguer, 2006; Silva et al., 2017). A natureza acidófila das bactérias lácticas, bem como sua notável habilidade de adaptação a condições muitas vezes extremas, conjuntamente com as altas concentração de ácido láctico produzido (o que permitem inibir o crescimento de outros organismos) têm facilitado o estabelecimento das bactérias lácticas em muitos ambientes diferentes (Massaguer, 2006).

O uso dos probióticos na alimentação animal tem sido um fator importante uma vez que estes proporcionam benefícios positivos; como melhora da taxa de crescimento, com um aumento na produção de carne, leite e ovos (Musa *et al.*, 2009; Corcionivoschi et al, 2010; Hai, 2015). As vantagens no uso de probióticos para prevenir e combater transtornos digestivos nos animais são: promover o balanço e a multiplicação da microflora benéfica do trato gastrointestinal (Collado *et al.*, 2007); a estimulação da resposta do hospedeiro, como resposta específica ao estímulo proliferativo das células periféricas mononucleadas do sangue (Strompfova *et al.*, 2007); a inibição das bactérias potencialmente patogênicas, por meio da produção de uma ampla variedade de substâncias inibidoras tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas (Schierack *et al.*, 2009).

O uso indiscriminado dos antibióticos tem levado a um aumento da resistência microbiana (Verschuereet *et al.*, 2000) assim, o uso de BALs é uma alternativa viável para a inibição de patógenos e controle de doenças em animais aquáticos (Cruz, *et al.*, 2015).

Desse modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias ácido lácticas e os produtos de seu metabolismo em dois diferentes meios de cultura frente a *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, patógenos de peixes. As BALs e/ou seus produtos de seu metabolismo poderão ser utilizados na incorporação em rações para peixes e assim reduzir as perdas por doenças em peixes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Foram analisadas 19 bactérias ácido lácticas, obtidas comercialmente, 18 na forma liofilizada e 1 na forma líquida conforme apresentado na Tabela 1. As culturas foram mantidas em geladeira até seu uso. As bactérias ácido lácticas obtidas nas farmácias de manipulação apresentam certificado de análise dentro dos padrões estipulados. Todas as cepas adquiridas estavam dentro do prazo de validade.

Tabela 1. Bactérias ácido lácticas

| Bactérias ácido lácticas | Fonte | Forma comercializada | Origem |
|--------------------------|----------------------|----------------------|--------|
| <i>Bacillus clausii</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Índia |

| | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Bélgica |
| <i>Bifidobacterium bifidus</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Brasil |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> | farmácia manipulação | liofilizada | China |
| <i>Enterococcus faecium</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Bélgica |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Brasil |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | drogaria | liofilizada- capsula | Brasil |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Itália |
| <i>Lactobacillus casei</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Itália |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Shirota</i> | supermercado | liquida | Brasil |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | farmácia manipulação | liofilizada | China |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | farmácia manipulação | liofilizada | China |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Bélgica |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Bélgica |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Bélgica |
| <i>Lactobacillus rhaminosus</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Itália |
| “Pool” A | drogaria | liofilizada- capsula | Brasil |
| “Pool” B | drogaria | liofilizada- cápsula | Estados Unidos América |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | farmácia manipulação | liofilizada | Bélgica |

“Pool” A = *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*

“Pool” B *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. plantarum*

Fonte: Elaborado pelos autores

2.2 PREPARO DO INÓCULO

Cepas de bactérias lácticas foram isoladamente cultivadas em tubos contendo meios de cultivo previamente estéreis com 5 mL de leite a 10% e 5 mL de meio MRS (De Man Rogosa & Sharpe) acrescido de leite a 2%, e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas. A leitura do pH do meio foi realizada antes e após o período de incubação para cada tubo e observado a ocorrência de coagulação do leite. Foram realizadas 3 repetições.

2.3 CULTURAS MICROBIANAS

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813) e *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), gentilmente cedidas pela “Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia” localizada em Campinas-SP. As culturas foram cultivadas em tubos contendo 5 mL de TSA (ágar tripticase de soja). O crescimento de *S. agalactiae* foi realizado em condições de anaerobiose. Ambos os microrganismos foram incubados à 35°C por 24 horas. Após este período com auxílio de uma alça previamente estéril, inóculos de cada cepa foram transferidos isoladamente para solução salina a 0,85% estéril e realizado o ajuste da concentração destas bactérias na solução para uma concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL.

2.4 AVALIAÇÃO DE ANTAGONISMO DIRETO IN VITRO

Duzentos microlitros da concentração de 1×10^8 UFC/mL obtida para cada patógeno foi inoculado separadamente em 200mL de TSA previamente estéril e fundido a temperatura de 45°C e o meio então distribuído em placas de petri. Após solidificação do meio foram realizados poços de 5 mm de diâmetro com auxílio de pipetas Pasteur e então inoculado 70 μL de cada bactéria ácido lácticas dentro de cada poço. O teste foi realizado para as cepas cultivadas em leite 10%, como as cultivadas em meio MRS acrescido de leite 2%. As placas foram incubadas à 35°C por 24 horas e em seguida analisados os resultados, por meio da medida do halo de inibição, presença de zona clara ao redor dos halos, com auxílio de régua milimétrica. Os ensaios foram realizados dentro do fluxo laminar de nível II. Cada experimento foi realizado duas vezes, em dias diferentes. O resultado foi registrado como a média aritmética entre as

duas medições realizadas. Para todos os ensaios foram feitos testes com controle positivo Florfenicol® (30mg).

2.5 ANÁLISE DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS ÁCIDO LÁCTICAS.

- **Obtenção do sobrenadante.**

As bactérias ácido lácticas que apresentaram halos de inibição contra os patógenos avaliados foram inoculadas em leite (10%) e incubadas a 35°C/72hrs. As leituras do pH foram realizadas antes e após a incubação. Após o período de incubação os meios foram centrifugados à 3500 rpm por 20 minutos, para obtenção do sobrenadante a ser analisado.

As análises dos sobrenadantes foram realizadas conforme descrito no item 1.3 para as cepas de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*. As placas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24 horas e realizada a medida dos diâmetros dos halos de inibição. O ensaio foi realizado três vezes, em dias diferentes o resultado foi registrado como a média aritmética entre as três medições realizadas.

- **Análise da capacidade inibitória dos sobrenadantes concentrados das culturas ácido lácticas**

Os sobrenadantes que apresentaram ação inibitória no item 1.3.1.1 foram concentrados 4 vezes (de 2,0 ml para 0,5 ml) com auxílio de gás nitrogênio e então testados novamente pelo método de difusão em ágar contra os patógenos em estudo. Em seguida, foram incubados a 35°C/24horas e realizada a leitura quanto a formação dos halos. O experimento foi realizado apenas uma vez.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todas as bactérias ácido lácticas apresentaram inibição frente à *A. hydrophila* com tamanhos de halo variando de 4,0 ± 0,0 a 14,5 ± 3,5 quando foram cultivadas em leite em pó a 10%. Para o crescimento das cepas em meio MRS + leite (2%), nove BALs apresentaram halos de inibição.

Os resultados para *S. agalactiae* mostraram que apenas 3 bactérias ácido lácticas cultivadas em leite 10% apresentaram formação de halo com tamanhos variando de 2,0 a 6,5, quando as BALx foram cultivadas em meio MRS acrescido de leite em pó (2%) apenas *Bifidobacterium adolescentes* apresentou halo de inibição, conforme tabela 2. O controle

positivo- florfenicol (30 mg) apresentou halo de inibição de 35 mm em todos os testes realizados.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas frente a *A. hydrophila* e *S. agalactiae* cultivadas em diferentes meios de crescimento.

| Bactérias ácido lácticas | <i>A. hydrophila</i> Leite 10% | <i>A. hydrophila</i> MRS+Leite (2%) | <i>S. agalactiae</i> Leite 10% | <i>S. agalactiae</i> MRS+Leite (2%) |
|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| <i>Tamanho inibição halos (mm)</i> | | | | |
| <i>Bacillus clausii</i> | 10,5 ± 0,7* | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bifidobacterium adolescentes</i> | 13,5 ± 2,1 | 10,0 ± 1,4 | 0 | 5,0 ± 0,0 |
| <i>Bifidobacterium bifidus</i> | 6,3 ± 1,4 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> | 14,5 ± 3,5 | 12,0 ± 0,0 | 0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 5,0 ± 0,0 | 5,0 ± 0,0 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 7,3 ± 1,5 | 0 | 0 | 0 |
| <i>L. acidophilus (comercial)</i> | 7,7 ± 2,5 | 9,5 ± 0,7 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 9,5 ± 0,6 | 2,7 ± 0,0 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 4,0 ± 0,0 | 4,5 ± 0,0 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus casei Shirota</i> | 7,3 ± 1,4 | 3,5 ± 0,0 | 6,0 ± 0,0 | 0 |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 11,5 ± 3,5 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 10,0 ± 0,0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus paracaseae</i> | 12,0 ± 0,0 | 10,0 ± 1,4 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 15,0 ± 2,1 | 4,0 ± 0,0 | 6,5 ± 0,0 | 0 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 5,0 ± 0,0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Lactobacillus rhaminosus</i> | 9,2 ± 1,5 | 0 | 2,0 ± 0,0 | 0 |
| <i>Pool A</i> | 9,2 ± 1,7 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pool B</i> | 6,0 ± 0,0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 11,0 ± 2,1 | 0 | 0 | 0 |

*desvio padrão

Fonte: Elaborado pelos autores

3.2.ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS SOBRENADANTES

Todos os sobrenadantes ácidos (pH 4) resultantes do metabolismo das BALs e dos “pools” A e B em meio de cultivo leite 10% após 72 horas de incubação, apresentaram atividade antimicrobiana contra *A. hydrophila* conforme mostra a tabela 3, quando os sobrenadantes foram neutralizados (pH 7) não houve formação de halos. Conforme descrito por Massaguer, 2005, entre os metabólitos e condições envolvidas na inibição de patógenos estão: os ácidos orgânicos; peróxido de hidrogênio; pH baixo, condições anaeróbias e

produção de bacteriocinas. Estas substâncias podem exercer atividade antimicrobiana por diferentes mecanismos, desestabilização da membrana, lise celular, degradação de ácidos nucleicos e inibição da síntese de proteínas (Dias et al., 2018).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de sobrenadantes ácidos de BALs frente *A. hydrophila*

| Bactérias ácido lácticas | Tamanho halo inibição (mm) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus clausii</i> | 5,7 ± 0,0 |
| <i>Bifidobacterium adolescentes</i> | 6,3 ± 0,7 |
| <i>Bifidobacterium bifidus</i> | 3,7 ± 0,0 |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> | 5,7 ± 0,7 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> (comercial) | 7,3 ± 0,0 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 10,7 ± 1,2 |
| <i>Lactobacillus casei</i> Shirota | 3,0 ± 0,0 |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 7,0 ± 0,7 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 3,0 ± 0,0 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 9,7 ± 1,5 |
| <i>Lactobacillus paracasae</i> | 10,0 ± 0,0 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 7,3 ± 1,4 |
| <i>Lactobacillus rhaminosus</i> | 3,7 ± 0,0 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 9,0 ± 1,0 |
| Pool A | 0 |
| Pool B | 5,0 ± 0,0 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3,3 ± 0,0 |

Fonte: Elaborado pelos autores

Os resultados mostraram que *L. bulgaricus* e *paracasae* apresentaram os maiores tamanhos de halo de inibição contra *A. hydrophila* com valores de 10 mm.

A inibição da capacidade inibitória pela neutralização do sobrenadante também foi observada por Pereira & Gómez (2007). Neste trabalho a inibição ocorreu para um valor de pH 4, no qual o caráter ácido do meio de crescimento produzido pelo metabolismo das BALs se torna impróprio para o crescimento do patógeno, conforme Massaguer, 2005 a natureza acidúrica das bactérias lácticas, e sua notável habilidade de adaptação a condições muitas vezes extremas, conjuntamente com as altas concentrações de ácido láctico produzido, permite

inibir o crescimento de outros microrganismos. O sobrenadante obtido neste trabalho contém moléculas com atividade antimicrobiana, as quais podem vir a ser utilizadas na confecção de novos produtos para uso na aquicultura. Para isso é de importância identificar as substâncias produzidas durante a fermentação.

3.3. Sobrenadante concentrado

Todos os sobrenadantes concentrados obtidos do metabolismo das BALs isoladas e dos “pools” A e B, apresentaram um tamanho de halo de inibição contra *A. hydrophilla* maior do que os sobrenadantes não concentrados conforme, mostra as tabelas 3 e 4. Como apenas três BALs mostraram resultados de inibição contra *S. agalactiae* quando cultivadas em Leite 10%, optou-se por realizar somente os testes para o sobrenadante concentrado das mesmas.

Os sobrenadantes neutralizados não apresentaram efeito inibitório contra os patógenos para todas as BALs e “pools” testados. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira e Gómez (2007), estes autores estudaram a atividade antimicrobiana de *L. acidophilus*, uma cultura probiótica comercial, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos, como *E. coli* e *S. aureus*.

Tabela 4. Atividade antagonista de sobrenadante ácido concentrado de bactérias lácticas frente a patógenos

| <i>Bactérias ácido lácticas</i> | <i>A. hydrophila</i> | <i>S. agalactiae</i> |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| | Tamanho halo (mm) | |
| <i>Bacillus clausii</i> | 16,0 | 10,0 |
| <i>Bifidobacterium bifidus</i> | 17,0 | 16,0 |
| <i>Bifidobacterium infantis</i> | 13,0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 12,0 | 9,0 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 14,0 | 0 |
| <i>L. acidophilus</i> (Leiba®) | 12,5 | 0 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 14,0 | 0 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 16,0 | 17,0 |
| <i>Lactobacillus crispatus</i> | 15,0 | 10,0 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 17,0 | 17,0 |
| <i>Lactobacillus paracasae</i> | 15,0 | 11,0 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 12,0 | 0 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | 14,0 | 9,0 |
| Pool (A) | 11,0 | 0 |
| Pool (B) | 13,0 | 0 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 13,0 | 0 |

Fonte: Elaborado pelos autores

A figura 1 apresenta o teste de antagonismo de duas BALs frente à *Aeromonas hydrophila*, com formação de halo quando as bactérias foram cultivadas em leite 10%. Na figura 2 observa-se que ocorre um aumento do tamanho do halo de inibição do sobrenadante obtivo do cultivo de *B. clausii* e *L. fermentum* em meio de cultura leite 10%, quando este é concentrado isto decorre possivelmente do aumento da concentração dos compostos ácidos gerados durante a fermentação, já que quando ocorreu a neutralização destes sobrenadantes o efeito inibitório não foi observado.



Figura 1: Halos de inibição de *Lactobacillus fermentum* (10mm) e *Lactobacillus plantarum* (15mm), inoculados em meio (leite 10%) frente a *A. hydrophila*.

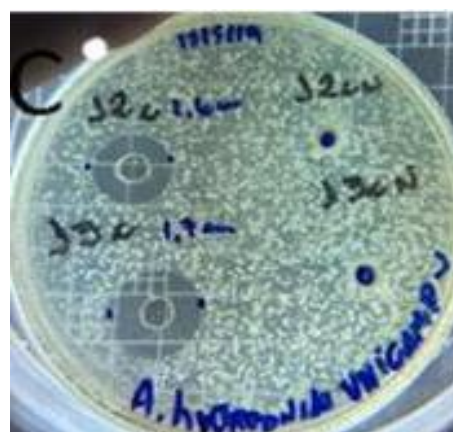
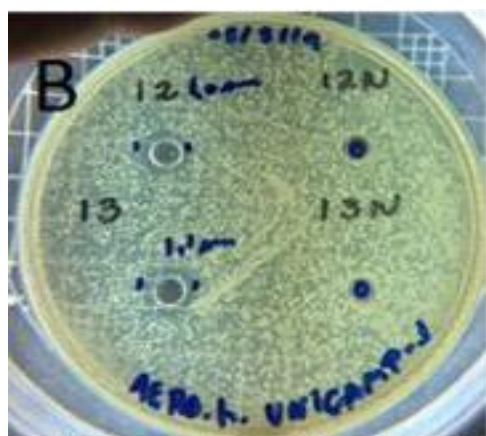


Figura 2: (B) Formação de halos de inibição de sobrenadante ácido e neutralizado (N) de *B. clausii* (12) e *L. fermentum* (13) em meio de cultivo leite 10% frente a *A. hydrophila*. (C) sobrenadantes concentrados

Fonte: Elaborado pelos autores

4 CONCLUSÃO

Os ensaios para avaliação do antagonismo de bactérias ácido lácticas e seus metabólitos frente aos patógenos *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae* foi implementado com sucesso e poderão ser utilizados em estudos posteriores com o objetivo de avaliar novas cepas probióticas e/ou seu metabólitos com atividade antimicrobiana para doenças bacterianas ocasionadas em peixes.

Bactérias ácido lácticas cultivadas no meio leite 10% apresentaram o melhor resultado de inibição quanto testadas frentes aos patógenos.

A produção de ácido pelas BALs foi responsável pela inibição dos microrganismos, e quando o sobrenadante foi concentrado um tamanho de halo de inibição maior foi observado. Os resultados são promissores na aplicação de BALs e/ou seus metabólitos em rações destinadas ao consumo animal ou em alimentos para humanos. Mais estudos devem ser realizados a fim de identificar quais são as substâncias produzidas pelas BALs e a viabilidade de seu uso.

REFERÊNCIAS

Bliss SJ, Manning SD, Tallman P, Baker CJ, Pearlman MD, Marrs CF, et al. Group B streptococcus colonization in male and non pregnant female university students: a cross-sectional prevalence study. **Clin Infect Dis.**; 34: 184–190, 2002.

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-1704/>>. Acesso em: 8 de maio de 2019.

Collado, M. C.; Grzeskowiak, L.; Salminen, S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. **Curr. Microbiol.**; v. 55:260-265, 2007.

Corcionivoschi, N.; Drinceanu, D.; Pop, I.M.; Stack, D.; Stef, L.; Juleau, C.; Bourke, B. The effect of probiotic on animal health. Review, **Anim. Sci. Biotechno.**, v. 43, n. 1, p. 35-41, 2010.

Cruz, P.M.; Ibáñez, A.L.; Hermosillo, O.A.M.; Saad, H.C.R. Use of probiotics in aquaculture. v.2012, 13p., 2012.

Dias, P.A.; Silva, D.T.; Timm, C.D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de *kefir*. **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v.19, p.1-8, e-40548, 2018.

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. Microbiologia de Alimentos, São Paulo, Atheneu, p. 182, 2003.

Gatesoupe, F.-J. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. **Aquat. Living Resour.** **7**:277–282, 1994.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.3, p.969-973, 1999.

Hai, N.V. The use of probiotic in aquaculture. **J. Appl. Microbiol.**, v. 119, p. 917-935, 2015.

Joˆborn, A.; Olsson, C. J.; S. Kjelleberg. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. **J. Fish Dis.** v. 20:383–392, 1997.

Kjelleberg, S., P. Conway, R. Hammond, A. Joˆborn, C. Olsson, and A. Westerdahl. Protection against pathogenic microorganisms. International patent application no. PCT/GB96/01936, international publication no. WO 97/06811, 1997.

MASSAGUER, P. R. (Comp.). **Microbiologia dos Processos Alimentares**. Brasil: Varela, 2006. 258 p.

Melin P.; Efstratiou, A. Group *B streptococcal* epidemiology and vaccine needs in developed countries. **Vaccine**. 2013; 31 Suppl 4: D31–42.

Mian, G.F. ; Godoy, D.T.; Leal,C.A.G.; Yuhara, T.Y. ; Costa, G.M. ; Figueiredo, H.C.P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile Tilapia, **Vet. Microbiol.** v. 136, p. 180-183, 2009.

Ministério da Saúde, Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em 03/09/2019.

Musa, H., Wu, S.L., Zhu, C.H., Seri, H.I.; & Zhu, G.Q. 2009. The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. **J. Anim. Vet. Adv.**, v.8, n. 2, p. 313-321, 2009.

ONU - NAÇÕES UNIDAS BRASIL. FAO: CONSUMO DE PESCADO NA AMÉRICA LATINA E NO CARIBE CRESCERÁ 33% ATÉ 2030. 2018. DISPONÍVEL EM:<[HTTPS://NACOESUNIDAS.ORG/FAO-CONSUMO-DE-PESCADO-NA-AMERICA-LATINA-E-NO-CARIBE-CRESCERA-33-ATE-2030/](https://nacoesunidas.org/fao-consumo-de-pescado-na-america-latina-e-no-caribe-crescera-33-ate-2030/)>.

ACESSO EM 8 DE MAIO DE 2019.

Pereira V. G. e Gómez R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciênc. Agrár.**, Londrina, v.28, n.2, p.229-240, abr./jun. 2007.

Schierack, P., Filter, M., Scharek, L.; Toelke, C.; Taras, D.; Tedin, K.; Haverson, K.; Lubke-Becker, A.; & Wieler, L. H. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* on immune parameters of pregnant sows. **Vet Immunol Immunopathol.** 127:26-37, v.127, 2009.

Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Taniwaki, M.H.; Gomes, R.A.R.; Okazaki, M.M. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 5edição, Blucher, 535p., 2017.

Strompfova, V., M. Marcinakova, M. Simonova, S. Gancarcikova, Z. Jonecova, L. Scirankova, J. Koscova, V. Buleca, K. Cobanova, and A. Laukova. *Enterococcus faecium* EK13--an enterocin a-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**, v. 12, p.242-248, 2006.

Tavares, G.C.; Costa, F.A.C.; Santos, R.R.D.; Barony, G.M.; Leal, C.,A.,G.; Figueiredo, H.C.P. Nonlethal sampling methods for diagnosis of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), **Aquaculture** . v. 454, p. 237-215, 2016.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. PROBIOTIC BACTERIA AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS IN AQUACULTURE. **MICROB. MOL. BIOL. REVIEWS.** V. 64, N. 4, P. 655–671, 2000.

