

## SELEÇÃO DE BACTÉRIA COM POTENCIAL PROBIÓTICO E UTILIZAÇÃO NO CULTIVO DE ROBALO-PEVA (*Centropomus parallelus* Poey, 1860)

Rodrigo Matos de SOUZA <sup>1</sup>; José Luiz MOURIÑO <sup>2,3</sup>; Felipe do Nascimento VIEIRA <sup>2</sup>; Celso Carlos BUGLIONE <sup>4</sup>; Edeimar Roberto ANDREATTA <sup>2</sup>; Walter Quadros SEIFFERT <sup>2</sup>; Vinicius Ronzani CERQUEIRA <sup>5</sup>

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar cepas de bactérias ácido-lácticas do trato intestinal de robalos-peva e avaliar o seu potencial probiótico. Foram isoladas três cepas bacterianas, das quais duas inibiram o crescimento *in vitro* de *Vibrio harveyi* e *V. alginolyticus*. Destas cepas, a que apresentou maior crescimento *in vitro* (*Lactococcus* sp.) foi usada nos ensaios *in vivo*, utilizando *Lactobacillus plantarum*, já usada como probiótico em camarões, como comparativo. Estas duas cepas de bactérias ácido-lácticas colonizaram o trato intestinal dos juvenis de robalos, com contagens de  $1,10 \pm 0,8 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> para *Lactococcus* sp. e  $1,96 \pm 0,14 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> para *L. plantarum*. Os robalos alimentados com ração suplementada com *Lactococcus* sp. ( $1,09 \pm 0,19 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>) e *L. planaturm* ( $2,45 \pm 0,30 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>) apresentaram, no trato intestinal, uma população de *Vibrio* spp. inferior ao controle ( $7 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>).

**Palavras-chave:** *Centropomideo*; bactérias ácido-lácticas; aquicultura; *Vibrio* spp.

## SELECTION OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA TO USE IN FAT SNOOK (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) CULTURE

### ABSTRACT

The aim of this study was to isolate acid-lactic bacteria of the intestinal tract of fat snook and to evaluate its probiotic potential. Three bacterial strains were isolated, of which two inhibited the *in vitro* growth of *Vibrio harveyi* and *V. alginolyticus*. Of these strains, the one that presented larger *in vitro* growth (*Lactococcus* sp.) was used in the *in vivo* assay, using *Lactobacillus plantarum*, already used as probiotic in shrimps, as comparative. These two strains of acid-lactic bacteria colonized the intestinal tract of the fry of fat snook, at concentrations of  $1,10 \pm 0,8 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> for *Lactococcus* sp. and  $1,96 \pm 0,14 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> for *L. plantarum*. The snooks fed with feed supplemented with *Lactococcus* sp. ( $1,09 \pm 0,19 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup>) and *L. planaturm* ( $2,45 \pm 0,30 \times 10^3$  CFU g<sup>-1</sup>) presented in the intestinal tract a population of *Vibrio* spp. inferior to the control ( $7 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>).

**Key words:** *Centropomideo*; lactic acid bacteria; aquaculture; *Vibrio* spp.

---

**Artigo Científico:** Recebido em: 10/11/2008 – Aprovado em: 29/05/2010

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Oceanografia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo

<sup>2</sup> UFSC, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos. Servidão dos Coroas, fundos – Barra da Lagoa - CEP: 88062-601 – Florianópolis – SC - Brasil

<sup>3</sup> e-mail: mourino@lcm.ufsc.br

<sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

<sup>5</sup> UFSC, CCA, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Piscicultura Marinha. Universidade Federal de Santa Catarina

## INTRODUÇÃO

Os Centropomídeos são valiosos para as pescarias comerciais e esportivas, sendo utilizados em repovoamentos e em cultivos experimentais (TUCKER, 1987; KENNEDY *et al.*, 1998, BRENNAN *et al.*, 2006).

A maior restrição para a piscicultura em larga escala é a dificuldade em produzir juvenis em quantidade suficiente para o cultivo (HJELM *et al.*, 2004), inclusive de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) (TEMPLE *et al.*, 2004). Segundo TUCKER (1987), a grande mortalidade na larvicultura do robalo (*Centropomus* sp.) é um dos maiores obstáculos para se obter produção massiva de juvenis.

Parte destas perdas no cultivo intensivo de peixes marinhos é devida a infecções bacterianas. Estas são consideradas problemas secundários relacionados ao estresse como variação de temperatura, manejo, qualidade de água, parasitas, tratamento quimioterápico, entre outros (AUSTIN e AUSTIN, 2007).

Como tratamento profilático ou terapêutico para bacterioses, a utilização de antibióticos é a estratégia mais utilizada na aquicultura (MAEDA, *et al.*, 1997, MOURIÑO *et al.*, 2008). Porém, o uso de antibióticos pode gerar o aparecimento de cepas de bactérias resistentes, além de implicações negativas relacionadas com a saúde humana e o meio ambiente (VINE *et al.*, 2004; GARCIA e MASSAM, 2005).

Um método alternativo, que está sendo aceito na indústria da aquicultura, é a utilização de bactéria probiótica para controlar eventuais patógenos (GOMEZ-GIL *et al.*, 2000; OLAFSEN, 2001). Além disto, os probióticos podem trazer outros efeitos fisiológicos favoráveis ao hospedeiro, como imunoestimulação e disponibilidade de enzimas digestórias (FULLER, 1989). GATESOUBE (1999) definiu probiótico para aquicultura como "micro-organismo vivo que, ao ser ministrado aos cultivos, coloniza o trato intestinal dos animais com o objetivo de melhorar sua saúde".

Diversos autores têm demonstrado que bactérias ácido-lácticas fazem parte da microbiota do trato intestinal de peixes (RINGO e GATESOUBE, 1998), sendo possível manter uma

grande população destas bactérias através da ingestão regular junto com a alimentação (JATOBÁ *et al.*, 2008). A utilização de bactérias ácido-lácticas de forma preventiva pode ser importante para obtenção de peixes saudáveis e com qualidade. Entretanto, outros estudos apontam a patogenicidade de bactérias ácido-lácticas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* em muitas espécies de peixes. Estas são doenças emergentes que causam importantes perdas econômicas na aquicultura de água doce e marinha (RINGO e GATESOUBE, 1998, VENDRELL *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi isolar cepas de bactérias ácido-lácticas do trato intestinal de robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e avaliar o seu potencial probiótico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Isolamento das bactérias ácido-lácticas*

Juvenis saudáveis de robalo ( $12,33 \pm 0,8$  g, n = 6), sem sinais clínicos de doenças infecto-contagiosas e parasitárias, provenientes do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina, foram submetidos ao jejum de 24 h, para esvaziamento intestinal, antes de serem sacrificados por choque térmico em gelo.

O isolamento das bactérias ácido-lácticas foi realizado através da adaptação dos métodos descritos por MUROGA *et al.* (1987) e RAMÍREZ *et al.* (2005). Os juvenis de robalo foram imersos em solução de formol 10% (30 segundos), para remover bactérias aderidas à superfície corpórea externa, sem afetar as bactérias internas, sendo posteriormente enxaguados com solução salina estéril (3% de NaCl). Após, os exemplares foram dissecados assepticamente, sendo o trato intestinal removido rapidamente e enxaguado com solução salina estéril externamente e internamente (lúmen intestinal). Cada amostra foi homogeneizada com solução salina estéril (1:1; peso/volume), diluída serialmente (1:10 em solução salina estéril), e 100  $\mu$ L das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco) com 2% de NaCl, suplementado com 0,1% de azul de anilina

como indicador (colônias de bactérias ácido-lácticas crescem azuis). As placas foram incubadas por 48h a 30°C em estufa. As colônias crescidas foram isoladas por método de esgotamento em novas placas de petri, com meio de cultura Agar MRS.

#### *Seleção de bactérias probióticas*

As cepas foram selecionadas e classificadas, de acordo com a morfologia das colônias viáveis, pelo método de coloração de Gram, teste de antagonismo frente à patógenos e crescimento *in vitro*. A cepa que apresentou melhor desempenho foi avaliada quanto à patogenicidade, colonização e inibição do crescimento *in vivo* de bactérias patogênicas no trato digestório de juvenis de robalo-peva.

#### *Antagonismo frente à patógenos*

Neste teste qualitativo, foi utilizada a técnica de halo de difusão para verificar a atividade antibacteriana das bactérias ácido-lácticas frente à patógenos. Este método é utilizado para averiguar o potencial antimicrobiano *in vitro* das candidatas probióticas (HJELM *et al.*, 2004). Segundo VASEEHARAN and RAMASAMY (2003), atividade antibacteriana é definida como a zona inibitória de crescimento formada ao redor do disco embebido com cultura bacteriana em teste (candidatas probióticas).

Cada cepa isolada de bactéria ácido-láctica foi incubada em 10 mL de meio de cultura MRS líquido a 30°C por 48 h em agitação contínua. Posteriormente, a cultura foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura Agar MRS, com inóculo de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, e incubado por 48 h a 30°C. Passado este período, foram retirados discos de 1 cm de diâmetro do meio de cultura agar MRS com as bactérias ácido-lácticas e sobrepostas na superfície do meio Agar Triptona de Soja (TSA, Difco), recém semeado com 100 µL de solução contendo  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Vibrio harveyi* ATCC 2343 e *V. alginolyticus* ATCC 2068 e incubadas por 24 h a 30°C. Foi considerada formação de halo de inibição do crescimento distâncias superiores a 10 mm de diâmetro (RAMIREZ, 2005).

#### *Crescimento in vitro*

Foi quantificado o número total de colônias viáveis das bactérias ácido-lácticas (RAMIREZ, 2005), crescidas em meio líquido MRS durante 24 h

a 30°C, para viabilizar a produção de grandes quantidades de probiótico em um menor intervalo de tempo. Os inóculos foram semeados em Agar MRS, através de diluições seriadas, e incubados durante 48h a 30°C para posterior contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro de inóculo.

#### *Ensaio in vivo*

Juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) ( $11,3 \pm 1,7$  g) foram distribuídos em 9 tanques cilíndricos de 100 L na proporção de 15 peixes por tanque. A água dos tanques foi mantida sob controle de temperatura, através de termostatos e aquecedores, de aeração e do fluxo contínuo de fornecimento. O fotoperíodo foi de 12 h. Os valores de pH e amônia total foram verificados semanalmente por meio de pHmetro digital e kit colorimétrico (Tetra test - Germany), respectivamente. Os resíduos do fundo dos tanques foram sifonados diariamente, após a última alimentação.

Os peixes foram aclimatados por 10 dias e submetidos a três tratamentos, em delineamento inteiramente ao acaso, em triplicata, por um período de 30 dias. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9 h e 16 h), até saciedade aparente, com ração comercial seca, sem presença de bactérias ácido-lácticas, como controle, e suplementada, nos demais tratamentos, com cultura de *Lactococcus* sp. (isolado do trato intestinal de robalo-peva) ou *Lactobacillus plantarum* CPQBA-007-07.

Durante o período experimental foi verificada, diariamente, a ocorrência de mortalidade ou de sinais clínicos típicos de lactococosis ou da enfermidade pelo *Lactobacillus* spp. (VENDRELL *et al.*, 2006, AUSTIN e AUSTIN, 2007) como letargia, anorexia, natação errática, exoftalmia, hemorragia na região ocular, bucal e nadadeiras. Ao final do experimento, foi analisada a ocorrência de hemorragia nos órgãos internos dos robalos.

#### *Preparo da dieta*

A ração comercial extrusada, 50% de proteína bruta e 7% de lipídio, foi suplementada através da aspersão de 100 mL de inóculo de culturas bacterianas ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) crescidas previamente em meio líquido MRS por

quilograma de ração. A dieta controle foi aspergida com o mesmo meio líquido, sem adição de bactérias. Após aspersão, as dietas foram mantidas em estufa a 30°C por 24 h, hermeticamente fechadas para o crescimento bacteriano (melhor colonização do *pelet*). Após, a ração foi mantida na estufa para secagem a 30°C por 24 h e, finalmente, conservadas sob refrigeração a 4°C, durante o período experimental. A concentração de bactérias ácido-láticas viáveis na dieta foi estimada no início e ao final do experimento (RAMIREZ, 2005). Para isto, 1 g de ração foi triturado e homogeneizado com solução salina estéril (1:1; peso/volume), diluído serialmente (1:10 em solução salina estéril) e 100 µL das diluições de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-7</sup> foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura Agar MRS com 2 % de NaCl, suplementado com 0,1% de azul de anilina como indicador, e incubados por 48h a 35°C.

#### *Avaliação da micobiota do trato intestinal dos juvenis*

Amostragens de três juvenis por tanque foram realizadas, no início e ao final do período experimental, com a finalidade de verificar a colonização das bactérias ácido-láticas, fornecidas através da dieta, e a população de *Vibrio* spp. Nas duas coletas, os animais foram deixados 24h em jejum antes da amostragem para esvaziamento intestinal.

Os tratos intestinais foram macerados e semeados, conforme metodologia descrita anteriormente, em meio MRS com 2% de NaCl com pH ajustado para 5,5, suplementado com 0,1% de azul de anilina (meio seletivo para o crescimento de bactérias ácido-láticas), e também em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Tiosulfato Citrato Bil Sacarose (TCBS, Difco – seletivo para o crescimento de *Vibrio* spp.) e incubadas a 30°C por 24h, para posterior contagem de colônias totais viáveis em placas com meio TCBS e agar MRS.

#### *Análise estatística*

As contagens microbiológicas foram transformadas em  $\log_{10}(x+1)$  antes de serem analisadas. Após, foi realizada Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância a 5%, e as diferenças de médias detectadas através do teste de Tukey de separação de médias

( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa computacional Statistica 6.0.

## RESULTADOS

#### *Isolamento e seleção in vitro*

Foram isoladas três colônias distintas de cepas de bactérias ácido-láticas, duas com morfologia de cocos (uma cocos isolados e uma em pares) e uma de bacilos (em pares), todas Gram-positivas.

A contagem total de crescimento em meio líquido de cultura MRS durante 48 h a 30°C da cepa de cocos e bacilos, que apresentaram atividade antibacteriana, foi de  $2,15 \pm 0,25 \times 10^7$  e  $3,32 \pm 0,75 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> de inóculo, respectivamente. No ensaio *in vitro* de antagonismo frente à patógenos, somente os cocos isolados do trato intestinal de juvenis de robalo apresentaram halo de inibição frente às duas cepas patogênicas avaliadas (*V. harveyi* e *V. alginolyticus*).

Os resultados obtidos nos ensaios de antagonismo, frente à patógenos e crescimento *in vitro*, sugerem que a cepa 1 (*Lactococcus* sp., com morfologia de cocos em pares), possui o maior potencial para ser utilizada como probiótico dentre as cepas isoladas. Sendo assim, esta cepa foi selecionada para o ensaio *in vivo*.

#### *Seleção in vivo*

Os parâmetros físico-químicos de qualidade de água entre os tratamentos (colonização bacteriana *in vivo* no trato intestinal do robalo-peva) não diferiram estatisticamente. A temperatura foi de  $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , salinidade de 32, pH entre 7,8 e 8,1 e amônia total inferiores a 0,25 mg L<sup>-1</sup>.

As contagens de colônias viáveis de *Lactococcus* sp. e *Lactobacillus plantarum* nas dietas, durante o armazenamento por 30 dias a 4°C, foram reduzidas em 2,3 e 3,4%, respectivamente (Tabela 1).

O consumo de ração foi semelhante entre os grupos, ficando em torno de  $323,5 \pm 15$  g de ração por tanque (em torno de 5% da biomassa de robalos por dia). Os robalos dos tratamentos onde as bactérias ácido-láticas foram adicionadas à dieta não apresentaram mortalidade ou sinais de

patogenicidade típicos de doenças causadas por *Lactobacillus* spp. ou *Lactococcus* spp.

**Tabela 1.** Contagem de bactérias ácido-láticas nas rações suplementadas com *Latococcus* sp. e *Lactobacillus plantarum* no início do experimento e após 30 dias

Cepa	Contagem de bactérias ácido-láticas (UFC g <sup>-1</sup> )	
	Inicial	Final (após 30 dias)
<i>Lactococcus</i> sp.	3,09 ± 0,32x10 <sup>8</sup>	3,02 ± 0,15x10 <sup>8</sup>
<i>L. plantarum</i>	4,15 ± 0,49x10 <sup>8</sup>	4,01 ± 0,55 x10 <sup>8</sup>

No início do experimento, não foi observada a presença de bactérias ácido-láticas no trato intestinal dos juvenis de robalo. Já a contagem total de *Vibrio* spp. foi de 1,01 ± 0,90x10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup> de peso úmido de trato intestinal.

No trato intestinal de robalos do grupo controle, não foi observada a presença de bactérias ácido-láticas, entretanto, estes apresentaram número de colônias de *Vibrio* spp. maior (p <0,05) que os alimentados com ração suplementada com as bactérias ácido-láticas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Contagem de bactérias ácido-láticas e *Vibrio* spp. no trato intestinal dos juvenis de robalo-peva alimentados com a dieta controle e suplementada com *Lactococcus* sp. e com *Lactobacillus plantarum* no início e ao final do período experimental

Tratamentos	Número médio ± DP de colônias (UFC g <sup>-1</sup> de trato intestinal)			
	Inicial		Final (após 30 dias)	
	<i>Vibrio</i> spp.	Bactérias ácido-láticas	<i>Vibrio</i> spp.	Bactérias ácido-láticas
Controle	1,01 ± 0,90x10 <sup>6</sup>	0	4,31 ± 0,17x10 <sup>6</sup> a*	0a
<i>Lactococcus</i> sp.	1,01 ± 0,90x10 <sup>6</sup>	0	1,09 ± 0,19x10 <sup>6</sup> b	1,10 ± 0,8x10 <sup>5</sup> b
<i>L. plantarum</i>	1,01 ± 0,90x10 <sup>6</sup>	0	2,45 ± 0,30x10 <sup>3</sup> b	1,96 ± 0,14x10 <sup>6</sup> b

\*As letras diferentes representam diferença estatística significativa (p <0,05) entre os tratamentos

A contagem de bactérias ácido-láticas, no final do experimento (30 dias), foi semelhante (p >0,05) no trato intestinal dos robalos alimentados com dieta suplementada com *L. plantarum* e *Lactococcus* spp. (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Usualmente, testes *in vitro* de antagonismo frente à patógenos, baseados na produção de compostos inibitórios ou na competição por nutrientes, são utilizados para selecionar potenciais bactérias probióticas (GILDBERG *et al.*, 1995; HUYS *et al.*, 2001; VINE *et al.*, 2004; VÁZQUEZ *et al.*, 2005). Neste trabalho, duas das cepas isoladas do trato intestinal de juvenis de robalo-peva apresentaram inibição do crescimento *in vitro* frente a *V. harveyi* e *V. alginolyticus*. A cepa *L. plantarum* utilizada também possui grande capacidade em inibir o crescimento *in vitro* (VIEIRA *et al.*, 2007). A cepa 1 (*Lactococcus* sp.) apresentou maior crescimento em 24h em relação a cepa 2 (*L. plantarum*), o que pode facilitar a sua

produção industrial em larga escala, justificando a sua escolha para a realização do experimento de colonização dos robalos.

Os resultados obtidos no teste de viabilidade das bactérias ácido-láticas aspergidas na dieta possibilitam a estocagem desta ração, após aspensão do probiótico, por um período de no mínimo 30 dias. Resultado também obtido por GILDBERG *et al.* (1995, 1997) utilizando bactérias ácido-láticas. Segundo FULLER (1989), esta é uma característica comum das bactérias ácido-láticas, que em condições de armazenagem adequadas (baixa temperatura), podem permanecer viáveis por longos períodos em dietas. Esta característica pode facilitar a utilização deste grupo de bactérias como probióticos em laboratórios comerciais.

As bactérias patogênicas oportunistas, particularmente *Vibrio* spp., fazem parte da microbiota no trato intestinal de peixes marinhos e são agentes causadores de doenças e mortalidade maciça em sistemas de cultivo ou em

espécies nativas no habitat natural (MUROGA *et al.* 1987 e BARTLEY *et al.*, 2006). Na escolha dos probióticos, a capacidade de adesão, e consequente colonização das bactérias no trato intestinal, e a habilidade em inibir ou reduzir a colonização de *Vibrio* spp. são importantes propriedades (CHABRILLÓN *et al.*, 2005). Bactérias ácido-lácticas são reconhecidas por sua capacidade em colonizar e reduzir a incidência de bactérias do tipo *Vibrio* spp. em diversas espécies de peixes (GATESOUBE, 1994; PERDIGON *et al.*, 1995; KENNEDY *et al.*, 1998; CARNEVALI *et al.*, 2004; JATOBÁ *et al.*, 2008; RENGPIPAT *et al.*, 2008).

Inúmeros estudos têm demonstrado o interesse no uso de bactérias ácido-lácticas como potenciais probióticos em aquicultura. GATESOUBE (1991) relata melhora no valor nutricional da dieta para larvas de “turbot” (*Scophthalmus maximus*). GILDBERG *et al.* (1997) obtiveram um aumento na resistência a doenças em bacalhau *Gadus morhua* e KENNEDY *et al.* (1998) verificaram aumento na sobrevivência, uniformidade de tamanho e taxa de crescimento específico em larvas de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*). VÁZQUEZ *et al.* (2005) controlaram a microbiota patogênica em linguados (*Scophthalmus maximus*), e CARNEVALI *et al.* (2006) obtiveram um aumento no bem estar e crescimento de juvenis do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*).

A colonização das bactérias ácido-lácticas no trato intestinal, obtida neste ensaio, foi semelhante para as duas cepas de bactérias ácido-lácticas testadas, indiferente da origem bacteriana. Esta colonização diminuiu a população de *Vibrio* spp. no trato intestinal destes peixes, indicando que ambas as cepas podem exercer um possível controle no estabelecimento de bactérias potencialmente patogênicas no trato intestinal de robalo-peva. Adicionalmente, sinais clínicos típicos de lactococosis ou de enfermidade por *Lactobacillus* spp. em peixes não foram observados durante o fornecimento destas bactérias aos robalos (VENDRELL *et al.*, 2006, AUSTIN and AUSTIN, 2007). Assim, estas cepas podem ser uma alternativa na prevenção de infecções bacterianas e grandes mortalidades no cultivo de juvenis de robalo-peva, obtendo peixes saudáveis e com qualidade.

## CONCLUSÕES

1) Duas cepas de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de juvenis de robalo-peva possuem a capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*.

2) O *Lactobacillus plantarum* CPQBA 007-07 e o *Lactococcus* sp. isolado do trato intestinal de juvenis de robalo-peva colonizam o trato intestinal desta espécie, diminuindo a população de *Vibrio* spp., apresentando, assim, potencial para serem utilizados como probióticos no cultivo de juvenis desta espécie.

## AGRADECIMENTOS

Somos especialmente gratos ao Professor Elpídio Beltrame do Departamento de Aquicultura da UFSC (in memoriam) pelo seu inestimável apoio a este trabalho. Somos gratos também a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca e Financiadora de Estudos e Projetos pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- AUSTIN, B. and AUSTIN, D. 2007 *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4ª ed. Chichester, UK, Springer. 594p.
- BARTLEY, D.M.; BONDAD-REANTASO, M.G.; SUBASINGHE, R.P. 2006 A risk analysis framework for aquatic animal health management in marine stock enhancement programmes. *Fisheries Research*, Sidney, 80: 28–36.
- BRENNAN, N.P.; DARCY, M.C.; LEBER, K.M. 2006 Predator-free enclosures improve post-release survival of stocked common snook. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Amsterdam, 335: 302–311.
- CARNEVALI, O.; DE VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. 2006 Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, Amsterdam, 258: 430–438.

- CARNEVALLI, O.; ZAMPONI, M.C.; SULPIZIO, R.; ROLLO, A.; NARDI, M.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; CAGGIANO, M.; POLZONETTI, M.; CRESCI, A. 2004 Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, Amsterdam, 12: 377-386.
- CHABRILLÓN; M.; RICO, R.M.; DÍAZ-ROSALES, P.; BALEBONA, M.C.; MORIÑIGO, M.A. 2005 Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalense sole, *Sole senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, Stirling, 28: 531-537.
- FULLER, R. 1989 A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, Oslo, 66: 365-378.
- GARCIA, A.F. and MASSAM, J.P. 2005 Elimination of antibiotics in hatcheries while improving production levels by use of probiotics. *Journal of World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 36: 57-60.
- GATESOUBE, F.J. 1991 The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 96: 335-342.
- GATESOUBE, F.J. 1994 Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.), against pathogenic vibrio. *Aquatic Living Resources*, Montrouge, 7: 277-282.
- GATESOUBE, F.J. 1999 The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 180: 147-165.
- GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; BAGWALD, J. 1995 Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, Amsterdam, 138: 23-34.
- GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.; RINGO, E. 1997 Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, Leiden, 352: 279-285.
- GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. 2000 The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, Amsterdam, 191: 259-270.
- HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZZA, A.; NIELSEN, J.; MELCHIOSEN, J.; JENSEN, S.; DUNCAN, H.; AHREN, P.; BIRKBECK, H.; GRAM, L. 2004 Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, 27: 360-371.
- HUYS, L.; DHERT, P.; ROBLES, R.; OLLEVIER, F.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. 2001 Search for beneficial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 193: 25-37.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. 2008 Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 43: 1201-1207.
- KENNEDY, S.B.; TUCKER JR., J.W.; NEIDIG, C.L.; VERMEER, G.K.; COOPER, V.R.; JARNEL, J.L.; SENNETT, D.G. 1998 Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, Miami, 62(2): 573-578.
- MAEDA, M.; NOGAMI, K.; KANEMATSU, M.; HIRAYAMA, K. 1997 The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia*, Leiden, 358: 285-290.
- MOURIÑO, J.L.P.; VINATEA, L.; BUGLIONE, C.C.; RAMIREZ, C.R.; VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.; MARTINS, M.L.; DERNER, R.B.; AGUILAR, M.A.; BELTRAME, E. 2008 Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei*, *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, 68(1): 173-177.
- MUROGA, K.; HIGASHI, M.; KEITOKU, H. 1987 The isolation of intestinal microbiota of farmed Red Seabream (*Pargus major*) and

- Black Seabream (*Acanthopargus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, Amsterdam, 65: 79-88.
- OLAFSEN, J.A. 2001 Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 200: 223-247.
- PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGUERO, G.; GIBBATO, N. 1995 Immune system stimulation by probiotics. *Journal Dairy Science*, Palo Alto, 78: 159-1602.
- RAMIREZ, C. 2005 *Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões Litopenaeus vannamei como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune*. Curitiba. 180p. (Tese de Doutorado, Processos Biotecnológicos, UFPR).
- RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. 2008 Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile sea bass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research*, Oxford, 39: 134-143.
- RINGO, E. and GATESOUBE, F.J. 1998 Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, Amsterdam, 160: 177- 203.
- TEMPLE, S.; CERQUEIRA, V.R.; BROWN, J.A. 2004 The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval fat snook (*Centropomus parallelus* Poey 1860). *Aquaculture*, Amsterdam, 233: 205-217.
- TUCKER, J.W. 1987 Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. *The Progressive Fish-Culturist*, Bethesda, 49: 49-57.
- VASEEHARAN, B. and RAMASAMY, P. 2003 Control of pathogenic *Vibrio* spp. por *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiótico treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 36: 83-87.
- VAZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. 2005 Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, Amsterdam, 245: 149- 161.
- VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J.L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; DE BLAS, I.; GIRONÉS, O.; MÚZQUIZ, J.L. 2006 *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, 29: 177-198.
- VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; BELTRAME, E.; MARTINS, M.L.; RAMIREZ, C.; VINATEA, L.A. 2007 Effect of use of acid-lactic probiotic bacterias in the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hatchery survival and microbiology of the water and larvae. *Brazilian Journal of Oceanography*, São Paulo, 55: 251-255.
- VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. 2004 Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, Stirling, 27: 319-326.