

Seleção de Bactéria Autóctone com Potencial Probiótico para o Acará-Bandeira



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 214

Seleção de Bactéria Autóctone com Potencial Probiótico para o Acará-Bandeira

Rodrigo Yudi Fujimoto
Joel Artur Rodrigues Dias
Higo Andrade Abe
Natalino da Costa Sousa
Marcia Valéria Silva do Couto
Carlos Alberto Martins Cordeiro
Juliana Oliveira Meneses
Fernanda Santos Cunha
Paulo Cesar Falanghe Carneiro
Alexandre Nizio Maria
José Luiz Pedreira Mouriño
Mauricio Laterça Martins

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE
2017

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250, CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1300
www.embrapa.br/tabuleiros-costeiros
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Secretário-Executivo: *Marcus Aurélio Soares Cruz*

Membros: *Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva Lédo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim, Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas e Viviane Talamini*

Supervisão editorial: *Flaviana Barbosa Sales*

Revisão bibliográfica: *Josete Cunha Melo*

Editoração eletrônica: *Beatriz Ferreira da Cruz*

1ª Edição

On-line (2017)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Seleção de bactéria autóctone com potencial probiótico para o acará-bandeira / Rodrigo Yudi Fujimoto ... [et al.] – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2017.

15 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 214).

1. Piscicultura. 2. Criação de peixe. 3. Peixe ornamental. 4. Criação. 5. Aquicultura. I. Fujimoto, Rodrigo Yudi. II. Dias, Joel Artur Rodrigues. III. Abe, Higo Andrade. IV. Sousa, Natalino da Costa. V. Couto, Márcia Valéria Silva do. VI. Cordeiro, Carlos Alberto Martins. VII. Meneses, Juliana Oliveira. VIII. Cunha, Fernanda Santos. IX. Carneiro, Paulo Cesar Falanghe. X. Maria, Alexandre Nizio.

CDD 639.3 Ed. 21

Autores

Rodrigo Yudi Fujimoto

Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

Joel Artur Rodrigues Dias

Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA

Higo Andrade Abe

Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA

Natalino da Costa Sousa

Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA

Marcia Valéria Silva do Couto

Engenheira de Pesca, mestre em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA

Carlos Alberto Martins Cordeiro

Engenheiro Químico, doutor em Produção Vegetal, professor da Universidade Federal do Pará, Bragança, PA

Juliana Oliveira Meneses

Engenheira de Pesca, mestre em Saúde e Meio Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE

Fernanda Santos Cunha

Engenheira de Pesca, mestre em Saúde e Meio Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE

Paulo Cesar Falanghe Carneiro

Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

Alexandre Nizio Maria

Zootecnista, doutor em Produção Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

José Luiz Pedreira Mouriño

Zootecnista, doutor em Aquicultura, professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

Mauricio Laterça Martins

Biólogo, doutor em Aquicultura, professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

Apresentação

A piscicultura ornamental é um ramo da aquicultura que tem crescido no Brasil. Uma atividade que gera emprego e renda, tanto na área rural quanto na urbana. O sistema de criação de peixes ornamentais se diferencia dos peixes de corte, em face do seu maior valor agregado, tendo em vista a sua exploração em menores áreas. Atualmente, inúmeras espécies ornamentais são cultivadas comercialmente, com destaque para o acará-bandeira, pelo seu formato, cor e valor.

Para melhorar o desempenho zootécnico e saúde dos peixes em cativeiro, são utilizados aditivos alimentares, entre eles os probióticos, isto é, microrganismos que auxiliam no equilíbrio da microbiota intestinal. Para o acará-bandeira, não há registros de uma bactéria autóctone que possua as qualidades probióticas.

Os pesquisadores de aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros em parceria com a Universidade Federal do Pará e a Universidade Federal de Santa Catarina, prospectaram as bactérias autóctones da espécie *Pterophyllum scalare* a fim de determinar qual delas apresentavam potenciais probióticos, para utilização nas diferentes fases de criação.

As cepas selecionadas nesse estudo apresentaram resistência aos testes in vitro similares às condições encontradas no organismo dos peixes. Os resultados aqui apresentados representam um grande avanço no conhecimento científico, demonstrando a potencialidade de uso de uma bactéria autóctone, como probiótico no acará-bandeira.

Manoel Moacir Costa Macedo

Chefe-geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Sumário

Seleção de Bactéria com Potencial Probiótico para o Acará-Bandeira	5
Apresentação	5
Introdução	7
Prospecção e seleção	9
Testes in vitro	9
Considerações finais	13
Referências.....	14

Seleção de Bactéria com Potencial Probiótico para o Acará-Bandeira

Rodrigo Yudi Fujimoto
Joel Artur Rodrigues Dias
Higo Andrade Abe
Natalino da Costa Sousa
Marcia Valéria Silva do Couto
Carlos Alberto Martins Cordeiro
Juliana Oliveira Meneses
Fernanda Santos Cunha
Paulo Cesar Falanghe Carneiro
Alexandre Nizio Maria
José Luiz Pedreira Mouriño
Mauricio Laterça Martins

Introdução

A produção de peixes com potencial ornamental cresce tanto no mercado nacional quanto no internacional, sendo que na América Latina, o Brasil se destaca, pois apresenta grande variedade de espécies com distintas cores, tamanhos e formas. Dentre essas espécies, destaca-se o acará-bandeira, *Pterophyllum scalare* Lichtenstein, 1823, um ciclídeo ornamental apreciado no mercado nacional e internacional, devido a suas características morfológicas e fácil adaptação em cativeiro, em aquários e viveiros.

A intensificação dos sistemas de criação dos peixes ornamentais tem aumentado a taxa de mortalidade decorrente principalmente das enfermidades, causando prejuízos econômicos à cadeia produtiva. Muitas dessas enfermidades são provocadas pelo estresse imposto aos animais, permitindo que agentes patogênicos oportunistas, como algumas bactérias, se instalem e provoquem doenças. Atualmente,

algumas estratégias têm sido utilizadas a fim de melhorar a saúde dos peixes e prevenir a ocorrência de enfermidades, entre elas a inclusão de probióticos em sua dieta.

Os probióticos são microrganismos que, além de estimular o sistema imunológico do animal, possuem potencialidades antagônicas aos agentes patogênicos pois, através da colonização do trato digestório do animal, ocorre uma competição pelos nutrientes e produção de metabólitos inibidores desses agentes patogênicos (BALCÁZAR et al., 2008; GATESOUBE, 1999; 2008).

Dentre os microrganismos utilizados como probióticos, destacam-se as bactérias ácido-láticas, por apresentarem fácil crescimento, produzem compostos antimicrobianos (como o ácido láctico, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bactericidas) e estimulam à resposta imune não específica em seu hospedeiro (GATESOUBE, 2008).

A aplicação de bactérias probióticas na nutrição animal pode viabilizar economicamente a cadeia produtiva piscícola, proporcionando menor conversão alimentar e melhor aproveitamento de nutrientes, além de redução da mortalidade (LIU et al., 2009).

O isolamento de um probiótico deve ser preferencialmente de bactérias intestinais do próprio hospedeiro, caracterizadas por não serem patogênicas, e por serem hábeis em resistir a ação dos sais biliares, à valores extremos de pH e à proteases do trato digestório, além de garantirem a colonização intestinal e uma maior segurança como suplemento alimentar.

Neste documento relatamos a seleção de uma bactéria ácido-láctica com potencial probiótico, a partir do trato gastrointestinal do acará-bandeira, tendo em vista que o isolamento espécie-específico é importante para aumentar sua eficiência de utilização.

Prospecção, isolamento e avaliação das bactérias

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CEUA N° 03.13.09.015.00.00).

As cepas das bactérias com potencial probiótico foram isoladas do trato digestório de dez juvenis saudáveis do peixe ornamental acará-bandeira ($21,95 \text{ mm} \pm 0,17 \text{ mm}$ e $775,71 \text{ mg} \pm 0,15 \text{ mg}$), obtidos a partir de reprodução natural em cativeiro. Os peixes foram submetidos a jejum de 24 horas para esvaziamento intestinal. Posteriormente, foram eutanasiados de acordo com as recomendações do Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (GUIA..., 2012), e desinfetados externamente com solução de álcool 70% para retirada dos fragmentos do intestino (0,1 g), em local estéril. As amostras foram maceradas em gral de porcelana, diluídas em solução salina estéril 0,65%, semeadas em meio de cultura Agar MRS (Man Rogosa Sharpe) e incubadas por 48h a 35 °C, de acordo com Jatobá et al. (2008).

A partir dessa metodologia, foi isolado um total de 16 morfotipos de cepas ácido-láticas, e essas foram submetidas aos testes *in vitro* para selecionar aquelas com potencial probiótico. Esses testes consistem na avaliação da resistência de crescimento em meio de cultura, testes de catalase, testes de resistência osmótica, ao pH e aos sais biliares, potencial antagônico pelo teste de inibição frente a patógenos e teste de viabilidade e cinética de crescimento em meio de cultura.

Testes *in vitro*

Das 16 cepas isoladas, todas resistiram ao crescimento em meio de cultura em laboratório, mas somente cinco apresentaram catalase negativa e prosseguiram aos demais ensaios *in vitro*, sendo

nomeadas como PROBC1, PROBC2, PROBC3, PROBC4, PROBC5. O teste da catalase é importante para diferenciar as bactérias ácido-láticas que são catalase negativas das demais bactérias patogênicas dos animais aquáticos que geralmente são catalase positivas (JATOBÁ et al., 2008).

Para o desafio de resistência osmótica das bactérias, todas as cepas demonstraram viabilidade quando submetidas a distintas concentrações de NaCl (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% e 3,0%), com acentuado destaque para a cepa PROBC3, que demonstrou maior resistência. Com relação ao teste de resistência a diferentes pHs (4, 5, 6, 8 e 9), observou-se após 24 horas que a cepa PROBC4 apresentou maior resistência nas escalas extremas de acidez e alcalinidade. Para exercerem atividades benéficas no aparelho gastrointestinal do hospedeiro, as culturas probióticas devem resistir às escalas de acidez e alcalinidade. O suco gástrico expelido no aparelho digestório do animal apresenta um pH extremamente ácido, sendo de suma importância a resistência da cepa probiótica a essa condição (NITHYA; HALAMI, 2013).

Para um microrganismo apresentar perfil probiótico, uma de suas exigências é a capacidade de colonização no trato gastrointestinal do hospedeiro, sendo importante a sua resistência aos efeitos emulsificantes dos sais biliares (BALCÁZAR et al., 2008). Assim, os microrganismos isolados do acará-bandeira foram submetidos ao desafio com sais biliares (5% p/v) durante 24 horas de incubação a 35 °C. A cepa PROBC4 se destacou nesse teste, apresentando menor perda de bactérias probióticas viáveis, atendendo a premissa de resistência frente aos sais biliares.

As bactérias ácido-láticas são encontradas em reduzido volume na microbiota do aparelho gastrointestinal dos peixes. A sua suplementação por meio da dieta é fundamental para uma maior predominância no intestino do hospedeiro, chegando a ocupar 70% de sua microbiota (GILDBERG et al., 2007; SOUZA, 2007).

O perfil antagônico das cepas com potencial probiótico é uma importante ferramenta na prevenção de infecções e/ou surtos bacteriológicos no sistema de produção, caracterizado por inibir o crescimento de patógenos no trato gastrointestinal do seu hospedeiro (ABRIOUEL et al., 2011). O potencial antagônico dos probióticos diz respeito à sua capacidade em produzir e expelir compostos como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, fundamentais para inibir o crescimento dos agentes bacterianos infecciosos (GILLOR et al., 2008; SUGITA et al., 2007; VÁZQUEZ et al., 2005).

As bactérias com potencial probiótico isoladas do acará-bandeira apresentaram halos de inibição frente a todos os patógenos desafiados [*Aeromonas hydrophyla* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus durans* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Micrococcus luteus* (A270)], com diâmetro superior a 11 mm, destacando-se nesse quesito as cepas PROBC4 e PROBC5.

Outro teste fundamental para averiguar o potencial probiótico é o de cinética de crescimento, onde se avalia o número total de colônias probióticas viáveis, para avaliar a eventual viabilidade de produção em escala comercial. As concentrações para efeito terapêutico dos probióticos dependem de cada espécie de peixe, variando entre 10^5 e 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para cada mililitro (mL) ou grama (g), ressaltando-se que a suplementação na dieta é de caráter transiente, e que é necessária a ingestão regular do microrganismo para manutenção da composição microbiológica intestinal do animal em produção (BARRETO et al., 2003; MADIGAN et al., 2004; SANZ, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008; VÉLEZ et al., 2007).

No teste da cinética de crescimento, foi possível realizar a contagem de células em todas as cepas isoladas na quantidade de 10^8 UFC/mL e 10^9 UFC/mL, e verificar que a velocidade máxima de crescimento e o tempo de duplicação estão adequados para inclusão como probiótico, com destaque para as cepas PROBC1, PROBC2, PROBC3 e PROBC4.

Após todos os testes *in vitro* de isolamento e seleção bacteriana com potencial probiótico, observou-se que a cepa PROBC4 apresentou as melhores características para ser adicionada a dieta dos peixes. (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes *in vitro* para seleção de bactéria probiótica para o acará-bandeira a partir de cepas que resistiram ao crescimento em meio de cultura em laboratório e que apresentaram catalase negativa.

Teste <i>in vitro</i>	Cepa de bactéria probiótica				
	PROBC1	PROBC2	PROBC3	PROBC4	PROBC5
Crescimento em meio de cultura	x	x	x	x	x
Gram positiva	x	x	x	x	x
Resistência osmótica			x		
Resistência ao pH				x	
Resistência aos sais biliares				x	
Potencial antagonico frente a patógenos				x	x
Cinética de crescimento	x	x	x	x	

x: melhor resposta aos testes *in vitro*

Identificação molecular da cepa

Para realização da identificação molecular, o material genético da cepa foi extraído a partir de isolados puros, de acordo a metodologia de Jin (2006). A quantificação do DNA extraído foi realizada pela metodologia de fluorescência (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Uma vez quantificado o material genético das cepas, foi realizado o processo de amplificação dos genes selecionados para sequenciamento e posterior identificação das cepas. A região foi isolada e amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o gene fenilalanil-tRNA sintetase (PheS), utilizando os iniciadores pheS-21-F (5' CAYCCNGCHCGYGAYATGC 3') e pheS-23-R (5' GGRTGRACCATVCCNGCHCC 3'), eficazes para análise taxonômica de procariotos ácido lácticos (NASER et al., 2007). Após o resultado de PCR, o sequenciamento das amostras foi efetuado pelo método dideoxiterminal (SANGER et al., 1977), no sequenciador automático ABI 3500 XL, utilizando reagentes do

kit BigDye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – PE Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As sequências foram alinhadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999). Seguido o sequenciamento, o material genético extraído foi enviado a um arquivo individual para cada cepa em formato FASTA, para leitura no programa Basic Local Alignment Search Tool-BLAST. A identificação das cepas foi realizada pela comparação das sequências depositadas no acervo mundial GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sendo a busca realizada com o algoritmo MEGABLAST.

Posteriormente, as relações filogenéticas foram estimadas sendo estas análises conduzidas com o auxílio do programa MEGA v. 6.05 (TAMURA et al., 2013). Essa cepa (PROBC4) foi então identificada molecularmente como *Enterococcus faecium*.

Considerações finais

A bactéria *Enterococcus faecium*, isolada no presente estudo, tem sido verificada na microbiota gastrointestinal de várias espécies animais com grande potencial probiótico, atuando na melhoria do desempenho zootécnico e imunológico (BENYACOUB, 2003; BOGUT et al., 2000; SUN et al., 2010; TARASOVA, 2010), podendo então ser considerada uma bactéria com potencial probiótico para a espécie ornamental acará-bandeira.

A cepa PROBC4 da espécie *Enterococcus faecium* isolada do próprio acará-bandeira apresentou viabilidade in vitro, com capacidade de suportar condições semelhantes às encontradas no organismo do peixe, demonstrando uma potencialidade como bactéria probiótica. Porém devem ser realizados estudos in vivo para verificar a concentração adequada da bactéria para o melhor desenvolvimento do acará-bandeira nas diferentes fases de criação.

Referências

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35. p. 201-232, 2011.

BALCÁZAR, J. L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J. L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173-186, 2008.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTENHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1. p. 119-126, 2003.

BENYACOUB. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 4, p.1158-1162, 2003.

BOGUT, I.; MILAKOVI, Z.; BRKI, S.; NOVOSELI, D.; BUKVI, Ž. Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*). **Veterinarni medicina**, v. 45, n. 4, p. 107-109, 2000.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GATESOUBE, F. J. Updating the importance of lactic Acid Bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 1-3, p. 107-114, 2008.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.; RINGO, E. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, v. 352, p. 279-285, 2007.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, p. 591-606, 2008.

GUIA Brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012. 66 p.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 1, p. 95-98. 1999.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. D.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P. JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1201-1207, 2008.

JIN, J. D. Molecular typing random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum Biovar Gallinarum. **The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 68, p. 1321-1326, 2006.

LIU, C. H.; CHIU, C. S.; HO, P. L.; WANG, S. W. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1031-1041, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil. 2004. 208 p.

NASER, S. M.; DAWYNDT, P.; HOSTE, B.; GERVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionally Microbiology**, v. 57, p. 2777-2789, 2007.

NITHYA, V.; HALAMI, P. M. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus species* isolated from different food sources. **Annals of Microbiology**, v. 63. p. 1229-137, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SANGER, F.; NIICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1284-1289, 2007.

SOUZA, R. M. **Influência da aplicação de bactéria ácido láctica na dieta sobre o cultivo de juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860)**. 2007. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SUGITA, H.; OHTA, K.; KURUMA, A.; SAGESAKA, T. An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. **Aquaculture Research**, v. 8, p. 1002-1004, 2007.

SUN, P.; WANG, J. Q.; JIANG, Y. M. Effects of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 63-68. 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PEETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TARASOVA, E. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. **Beneficial Microbes**, v. 1, n.3, p. 265-270, 2010.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics. From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZALEZ, M. P.; MURADO, M. A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v. 245, p. 149-161, 2005.

VÉLEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER, S. C. J.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p. 140-148, 2007.

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

