



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE PINHEIRO
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

EMANUELLE CRISTINA RIBEIRO ALMEIDA

**PROSPECÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* E *Enterococcus faecium* COM
POTENCIAL USO PROBIÓTICO ESPÉCIE-ESPECÍFICO NA AQUICULTURA
ORNAMENTAL DE *Betta splendens* REGAN, 1910**

Pinheiro

2025

Centro de Ciências de Pinheiro – CCPi
Estrada de Pacas, KM 10, Bairro Enseada - Pinheiro - MA - CEP: 65200-000
Fones: (98) 3272-9743
E-mail: eng.pesca@ufma.br

EMANUELLE CRISTINA RIBEIRO ALMEIDA

**PROSPECÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* E *Enterococcus faecium* COM
POTENCIAL USO PROBIÓTICO ESPÉCIE-ESPECÍFICO NA AQUICULTURA
ORNAMENTAL DE *Betta splendens* REGAN, 1910**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências de Pinheiro da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de pesca.

Orientador: Prof. Dr. Joel Artur Rodrigues Dias.

Coorientadora: Prof. Dra. Yllana Ferreira Marinho

Pinheiro

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Almeida, Emanuelle Cristina Ribeiro.

Prospecção de *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium* com potencial uso probiótico espécie-específico na aquicultura ornamental de *Betta splendens* Regan, 1910 /
Emanuelle Cristina Ribeiro Almeida. - 2025.

27 f.

Coorientador(a) 1: Prof. Dra. Yllana Ferreira Marinho.

Orientador(a): Prof. Dr. Joel Artur Rodrigues Dias.

Curso de Engenharia da Pesca, Universidade Federal do Maranhão, Pinheiro, 2025.

1. Maldi-tof. 2. Microbiologia. 3. Peixe Ornamental.
4. Inibição Patogênica. I. Dias, Prof. Dr. Joel Artur Rodrigues. II. Marinho, Prof. Dra. Yllana Ferreira. III. Título.

EMANUELLE CRISTINA RIBEIRO ALMEIDA

**PROSPECÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* E *Enterococcus faecium* COM
POTENCIAL USO PROBIÓTICO ESPÉCIE-ESPECÍFICO NA AQUICULTURA
ORNAMENTAL DE *Betta splendens* REGAN, 1910**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Engenharia de Pesca do Centro de
Ciências de Pinheiro da Universidade Federal
do Maranhão para a obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia de pesca.

Aprovado em: 12 / 02 / 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joel Artur Rodrigues Dias (Orientador)
Doutor em Ciência Animal
UFMA- Universidade Federal do Maranhão

Me. Fabiano de Araújo França
Mestre em Biodiversidade e conservação
UFMA- Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Augusto Leandro De Sousa Silva
Doutor em Ciência Animal (PPGCA)
UFMA- Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho à minha mãe, Amarilde Ribeiro Almeida (*In memoriam*), uma mulher cuja força, amor e dedicação foram sempre minha maior inspiração.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar!” (**Josué 1:9**).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me guiado e sustentado durante toda a minha caminhada, me dando forças e saúde para superar os desafios e não me deixar desistir.

A minha família, pelo amor incondicional e apoio constante. A minha avó Maria Ribeiro e ao meu avô Reinaldo Lopes, por serem inspirações de sabedoria e perseverança. A Lucielia Costa e Ana Clara Costa, meu pai Rodrigo Almeida e minha irmã Emilly Almeida, que sempre estiveram ao meu lado, celebrando cada conquista.

Minha gratidão especial à minha madrinha Missileia Costa, por ser um exemplo e apoio em todos os momentos.

Ao Jemerson Diniz, meu profundo agradecimento pelo incentivo, apoio e por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu duvidei de mim mesma.

Aos meus orientadores, Dr. Joel Dias e Dra. Yllana Marinho, por me acolherem no laboratório e transmitirem seu conhecimento com dedicação e paciência. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aos professores do curso de Engenharia de Pesca, pelos bons ensinamentos que foram dados no decorrer do curso, pelo respeito e atenção que sempre me foram dados e por despertarem minha paixão pela área.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), pela estrutura e espaço cedidos para a realização do experimento, o que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Manifesto meu agradecimento à diocese de Pinheiro-MA, em especial ao Bispo Dom Élio Rama, por me proporcionar um lar durante toda a minha graduação. Esse gesto de generosidade foi um pilar que sustentou minha jornada acadêmica.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Suellem dos Rémedio, Luane Gabrielle, Wildysson Borel, Lucas Eduardo, Ryan Furtado, Ithallo Ribeiro, Igor Roberlando, Admis Corrêa, Kedma Marques, Esther Caroline, Victor Boas, Ms. Fabiano França, Henrique, e Levi, minha imensa gratidão por compartilharem essa caminhada comigo. As memórias construídas juntos e o apoio mútuo tornaram essa experiência única e inesquecível.

Agradeço os meus amigos de Laboratório, Angela Lindoso, Adriano Silva, Alene Nogueira e Jonhnata Abreu. Embora não estejam mais no curso, a contribuição de vocês foi fundamental para minha trajetória acadêmica. Aos meus amigos de turma, Lucas Gomes, Juan Castro, Marcos Pimenta e Denis (*In memoriam*), durante o tempo da graduação estivemos juntos, compartilhamos muitas experiências, aprendizados e desafios, que marcaram esse momento tão importante da minha vida.

Agradeço também às minhas amigas Vitória Mariana e Larissa Da Luz pelo apoio, incentivo e amizade que sempre me deram.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, me apoiaram e torceram por mim ao longo dessa jornada. Cada palavra de incentivo e cada gesto de apoio fizeram toda a diferença.

RESUMO

A pesquisa avaliou o isolamento, a identificação e a prospecção de bactérias benéficas espécie-específico na piscicultura do peixe ornamental *Betta splendens*. Para isso, o material microbiológico foi obtido do trato intestinal de espécimes sadias, com crescimento bacteriano em meio de cultura seletivo Man Rogosa Sharpe (MRS). Dezesesseis cepas foram isoladas com base na resposta dos testes in vitro de catalase, Gram, azul de anilina, atividade hemolítica e antibiograma aos patógenos *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* e *Escherichia coli*. Das cepas isoladas, C1BS e C5BS foram as que apresentaram melhores respostas, as quais posteriormente foram identificadas, pelo método Maldi-TOF, como *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*. Devido ao registro bibliográfico e ao desempenho das cepas ácido lácticas nos testes in vitro, essas apresentam um grande potencial para uso probiótico espécie-específico na produção ornamental de *Betta splendens*.

Palavras-chave: Maldi-TOF, microbiologia, peixe ornamental, inibição patogênica.

ABSTRACT

The research evaluated the isolation, identification, and prospection of species-specific beneficial bacteria in fish farming of ornamental fish *Betta splendens*. For this, the microbiological material was obtained from the intestinal tract of healthy specimens, with bacterial growth in selective culture medium Man Rogosa Sharpe (MRS). Sixteen strains were isolated based on the response of *in vitro* tests of catalase, Gram, nilin blue, hemolytic activity and antibiogram to pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* and *Escherichia coli*. Of the isolated strains C1BS and C5BS, they showed the best responses, which were later identified by the Maldi-TOF method as *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*. Due to the performance of lactic acid strains in *in vitro* tests and the bibliographic record of their performance as probiotics, the species have great potential for species-specific use in the ornamental production of *Betta splendens*.

Keywords: Maldi-TOF, microbiology, ornamental fish, pathogenic inhibition.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	12
3	RESULTADOS	14
4	DISCUSSÃO	15
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
	REFERÊNCIAS	16
	ANEXO A – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO	20

PROSPECÇÃO DE *Lactobacillus plantarum* E *Enterococcus faecium* COM POTENCIAL USO PROBIÓTICO ESPÉCIE-ESPECÍFICO NA AQUICULTURA ORNAMENTAL DE *Betta splendens* REGAN, 1910
PROSPECTION OF *Lactobacillus plantarum* AND *Enterococcus faecium* WITH POTENTIAL SPECIES-SPECIFIC PROBIOTIC USE IN ORNAMENTAL AQUACULTURE OF *Betta splendens* REGAN, 1910

Emanuelle Cristina Ribeiro Almeida

RESUMO

A pesquisa avaliou o isolamento, a identificação e a prospecção de bactérias benéficas espécie-específico na piscicultura do peixe ornamental *Betta splendens*. Para isso, o material microbiológico foi obtido do trato intestinal de espécimes saudáveis, com crescimento bacteriano em meio de cultura seletivo Man Rogosa Sharpe (MRS). Dezesesseis cepas foram isoladas com base na resposta dos testes in vitro de catalase, Gram, azul de anilina, atividade hemolítica e antibiograma aos patógenos *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* e *Escherichia coli*. Das cepas isoladas, C1BS e C5BS foram as que apresentaram melhores respostas, as quais posteriormente foram identificadas, pelo método Maldi-TOF, como *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*. Devido ao registro bibliográfico e ao desempenho das cepas ácido lácticas nos testes in vitro, essas apresentam um grande potencial para uso probiótico espécie-específico na produção ornamental de *Betta splendens*.

Palavras-chave: Maldi-TOF, microbiologia, peixe ornamental, inibição patogênica.

ABSTRACT

The research evaluated the isolation, identification, and prospection of species-specific beneficial bacteria in fish farming of ornamental fish *Betta splendens*. For this, the microbiological material was obtained from the intestinal tract of healthy specimens, with bacterial growth in selective culture medium Man Rogosa Sharpe (MRS). Sixteen strains were isolated based on the response of in vitro tests of catalase, Gram, nilin blue, hemolytic activity and antibiogram to pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* and *Escherichia coli*. Of the isolated strains C1BS and C5BS, they showed the best responses, which were later identified by the Maldi-TOF method as *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*. Due to the performance of lactic acid strains in in vitro tests and the bibliographic record of their performance as probiotics, the species have great potential for species-specific use in the ornamental production of *Betta splendens*.

Keywords: Maldi-TOF, microbiology, ornamental fish, pathogenic inhibition.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura ornamental é uma atividade tradicional e rentável que atinge um faturamento mundial superior a 15 milhões de dólares (EVERS et al., 2019), no qual são comercializados mais de 2 bilhões de espécies (VASANTHAKUMARAN et al., 2020). No Brasil, este segmento apresenta um elevado crescimento, aspecto que está relacionado à maior demanda pelo consumidor final e ao lucro expoente na comercialização de espécies nativas e exóticas (BRASIL, 2012; GOMES et al., 2019).

Todavia, nesse mercado não há uma estatística oficial consolidada, mas de modo geral às espécies mais comercializadas se destacam os organismos exóticos como o beta (*Betta splendens*); kinguio ou japonês (*Carassius auratus*); carpa ou koy (*Cyprinus carpio*) e o guppy ou lebiste (*Poecilia reticulata*) (MILLINGTON et al., 2022).

A comercialização de *Betta splendens* é concentrada principalmente na Tailândia, Indonésia, Cingapura, China, Malásia, Japão, EUA e México, que são seus principais produtores (THONGPRAJUKAEW et al. 2011). Onde a espécie é criada de forma intensiva com altas densidades de estocagem, manejo sanitário e alimentar muitas das vezes inapropriados, que comprometem os seus índices de desempenho produtivo, sanidade e bem-estar animal (WILLIS, 2015).

Dessa forma, é imprescindível o aperfeiçoamento das técnicas de criação na aquicultura ornamental, que com isso destacam-se os aditivos alimentares, como as enzimas exógenas, prebióticos, probióticos, e simbióticos que têm demonstrado resultados positivos sobre o desempenho e imunidade dos peixes (BABASALI e MOHAMAD, 2011; AZEVEDO et al., 2016; GOMES et al., 2019).

Nesse cenário, os probióticos são microrganismos vivos que ao serem inseridos no sistema de produção animal colonizam o trato digestório do hospedeiro e estimulam o seu sistema imunológico a partir do tecido linfático associado ao intestino, além de agir de forma antagônica aos agentes patogênicos, por meio da competitividade por espaço, nutrientes e produção de metabólitos inibidores (BALCÁZAR et al., 2008; GATESOUBE, 1999; 2008).

Benefícios que foram comprovados na aquicultura de *Carassius auratus* (JINENDIRAN et al., 2019), *Poecilia latipinna* (AHMADIFARD et al., 2019), *Danio rerio* (MOHAMMADI et al., 2019) e *Pterophyllum escalare* (DIAS et al., 2019). Todavia, para o êxito do uso probiótico a seleção de microrganismos espécie-específico pode proporcionar maiores efeitos (DIAS et al., 2018; DIAS et al., 2019; YAMASHITA et al., 2020; DIAS et al., 2022).

Mas para a seleção espécie-específica probiótica requer de diversos testes in vitro para se determinar a eficácia dos microrganismos para fins terapêuticos, como a resistência as condições fisiológicas e ambientais (RAMIREZ et al., 2008; DIAS et al., 2019), assim como a sua viabilidade em inibir a ocorrência de cepas patogênicas endógenas e no sistema de criação (DIAS et al., 2019; BARROS et al., 2022).

Portanto, o objetivo da pesquisa foi de isolar e selecionar cepas in vitro com potencial probiótico espécie-específico na aquicultura de *Betta splendens*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pará (CEUA nº 9202300420).

Os espécimes adultos de *Betta splendens* foram adquiridos de lojas comerciais de aquariofilia da grande região metropolitana de Belém-Pa, Brasil. Para isso, foi realizada uma

breve avaliação in loco sobre o estado de saúde dos animais, a partir da análise macroscópica parasitária e comportamento fisiológico específico da espécie.

Após a aquisição dos pets, esses foram transportados para o Laboratório de Probióticos da Universidade Federal do Pará, Campus universitário de Bragança-Pa, Brasil.

Para o isolamento bacteriano espécie-específico, foram utilizados de cinco espécimes saudáveis de *Betta splendens*, após jejum de 24 horas, para o esvaziamento do aparelho digestivo, e então os indivíduos foram anestesiados com eugenol (60 mg.L⁻¹) e a partir do aprofundamento do plano anestésico, os animais foram eutanasiados por secção da medula espinhal de acordo com as orientações do Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (GUIA, 2012), desinfetados externamente com solução de álcool 70% e então transferidos para estufa de fluxo laminar em condições estéril, para ser realizada a excisão do intestino.

Após retirada do intestino, esse foi macerado em solução salina estéril a 0,65% na proporção 1:1 (p/v), utilizando de gral e pistilo de porcelana. Posteriormente o material macerado foi transferido para tubos coletores contendo 10 mL de meio de cultura broth Man Rogosa e Sharpe (MRS), que foram homogeneizados com agitador de tubos vortex e incubados durante 24 horas a temperatura de 35 °C em estufa de circulação de ar forçado (JATOBÁ et al., 2008; DIAS et al., 2018; PAIXÃO et al., 2020).

Após crescimento microbiológico em caldo, o meio de cultura foi diluído em fator 1:10, até 10⁵, e então semeado 1mL em placas de petri contendo o meio de cultura Agar MRS enriquecido com 10% de azul de anilina como possível indicador inicial de cepas probióticas, homogeneizado com esferas de micropélulas e realizado o crescimento bacteriano em estufa a 35 °C durante 48h (VIEIRA et al., 2013; FUJIMOTO et al., 2014). As colônias que absorveram o corante indicador prosseguiram para identificação do morfótipo, a partir do método de coloração de Gram (DIAS et al., 2019).

Nisso, as colônias cocos e bacilos Gram-positivas, foram isoladas e semeadas em um novo meio de cultura Agar MRS para esgotamento em placa (OPLUSTIL et al., 2010; DIAS et al., 2018; 2019). E posterior avaliação de catalase e atividade hemolítica, as colônias catalase negativa e as que não apresentaram atividade homolítica, prosseguiram as análise de isolamento das bactérias potencialmente probiótica, como aos descritos nos protocolos de VIEIRA et al. (2013) e DIAS et al. (2019).

A inibição in vitro contra agentes patogênicos foi realizada pelo método de TAGG e McGIVEN (1971), adaptado por RAMIREZ et al., (2006). Para a realização do experimento as cepas isoladas foram crescidas em tubos de ensaio com meio de cultura Broth MRS, por 24 horas incubadas em estufa a 35°C, posteriormente semeadas em placas de petri contendo meio de cultura Agar MRS e incubadas a 35°C durante 48 horas. Onde quatro discos com diâmetro de 0,8 cm foram retirados de placa Agar com as cepas de bactérias potencialmente probiótica e foram sobrepostas em meio de cultura Agar Muller Hinton, recém-semeadas com patógenos: *Aeromonas hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* e *Escherichia coli*, que foram incubados a 30 °C por 24 horas,

E posterior análise da capacidade antibacteriana das cepas potencialmente probióticas frente aos agentes patogênicos, analisado pelo desenvolvimento ou não do halo de difusão, denominado pelo diâmetro da zona inibitória das cepas (HJELM et al., 2004).

Para a identificação das cepas com prospecção de uso probiótico na piscicultura espécies-específica do *Betta splendens*, foi utilizado o método de Ionização de dessorção a laser assistida por matriz tempo de voo-MALDI-TOF (CUNHA et al., 2006; ASSIS et al., 2011; DIAS et al., 2022).

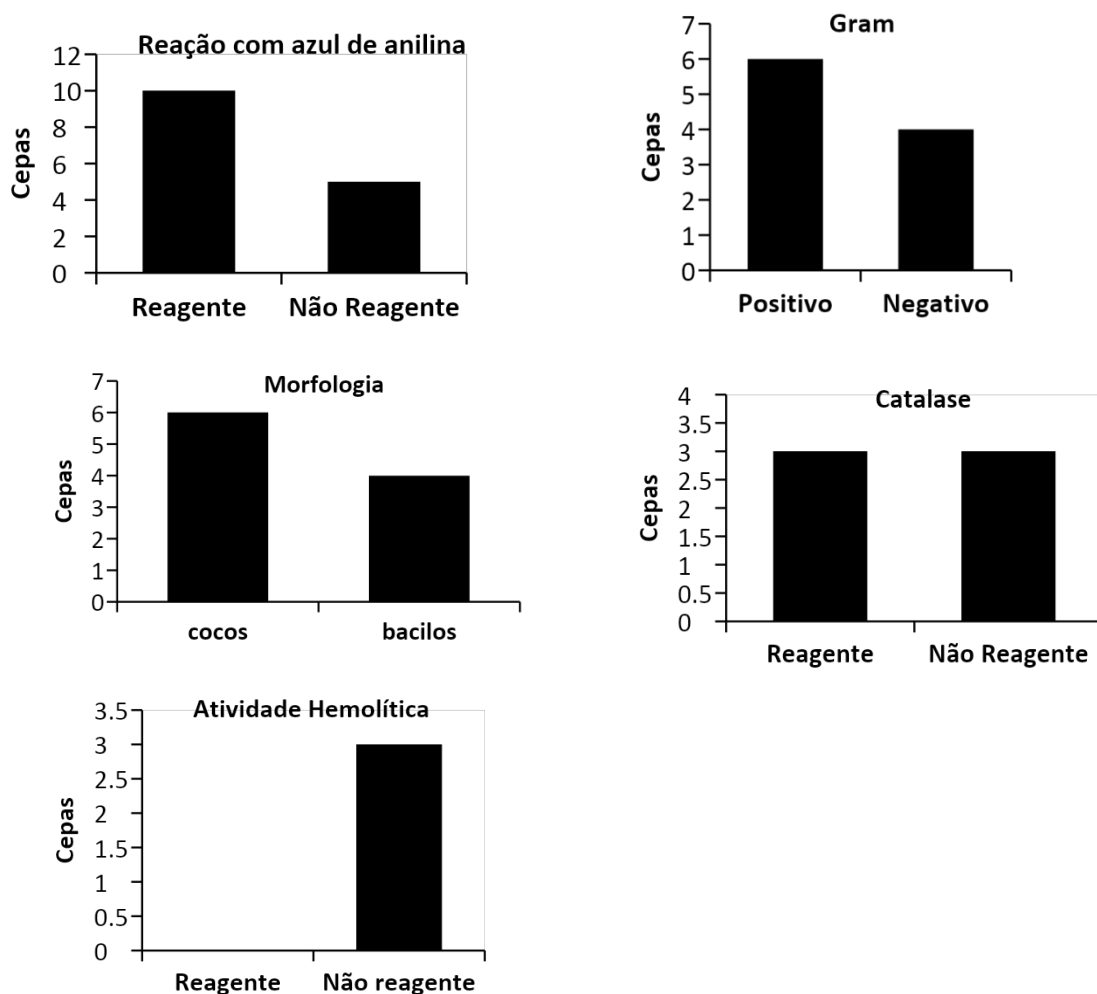
Para isso, foi utilizado de colônias recém-crescidas no meio de cultura Agar MRS, e posteriormente transferidas para a placa de MALDI (Bruker Daltonics), adicionada de um μL de solução matriz HCCA [ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich), na concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solução com 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v)], até a secagem total da reação em placa de inox para posterior análise no MALDI-TOF. Que considerou o grau de confiança na identificação físico-química das cepas até o grau de espécie, a partir de escores superiores a 2.0 (BIER et al., 2017).

Os diâmetros inibitórios obtidos pelo teste patogênico *in vitro* foram submetidos aos testes de premissas de homocedasticidade e normalidade, de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente, para posterior análise de variância (ANOVA), que quando significativa, para a separação das médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, analisados com o auxílio do programa estatístico BioEstat.

3. RESULTADOS

Foram isolados um total de 16 cepas autóctones de *Betta splendens*, 10 reagiram com o corante azul de anilina (Fig1), seis classificadas como Gram positivas, com morfologia celular de cocos (6) e bacilos (4), e três não apresentaram atividade hemolítica (Figura 1).

Figura 1. Seleção de bactérias autóctones na piscicultura de *Betta splendens*, a partir dos testes *in vitro* de reação com o corante azul de anilina, coloração de Gram, catalase e atividade hemolítica.



Com isso, três culturas prosseguiram para o teste de inibição contra os agentes patogênicos, que foram nomeadas como C1BS, C5BS e C14BS. Todas as cepas apresentaram halos de inibição com diâmetros maiores que 11 mm para todos os patógenos avaliados (Tabela 1), com diferença significativa ($p < 0,05$) para duas cepas (C1BS e C5BS), no qual foram observadas as maiores medidas inibitórias, em comparação a cepa C14BS.

Tabela 1. Avaliação *in vitro* das bactérias de potencial uso probiótico isoladas do trato digestório do ornamental *Betta splendens* submetidas ao desafio antagônico, halo de inibição (mm), com os patógenos *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED) e *Escherichia coli* (EC).

CEPA	AH(-)	PA(-)	EC(-)	ED(+)
C1BS	20,14 ± 0,27A	18,22 ± 0,380A	18,31 ± 1,08A	18,89 ± 1,00A
C5BS	19,03 ± 0,60A	17,87 ± 0,43A	19,32 ± 1,07A	19,11 ± 0,90A
C14BS	11,10 ± 0,51B	13,65 ± 0,52B	14,58 ± 0,93B	12,66 ± 0,95B

(-) Bactéria Gram negativa, (+) Bactéria Gram positiva. Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com isso, as bactérias que se sobressaíram aos processos de seleção e desafio *in vitro* patogênico para potencial uso probiótico espécie-específico na aquicultura ornamental do *Betta splendens*, foram identificadas a partir de dois gêneros, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, para uma espécie de *Lactobacillus plantarum* e duas variedades para *Enterococcus faecium*, ambas pertencentes ao grupo das bactérias ácido-lácticas.

4. DISCUSSÃO

O processo de seleção autóctone à prospecção de bactérias para potencial uso probiótico é de grande relevância à probabilidade de eficácia do produto final e garantia à saúde alimentar no hospedeiro. Para isso, se é necessário o atendimento de alguns pré-requisitos *in vitro* que possibilitem a viabilidade de uso após protocolos que simulem a não patogenia microbiológica e os benefícios probióticos para um possível microbioma saudável ao animal alvo de produção (DIAS et al., 2018; 2019; PAIXÃO et al., 2020).

Desta forma, as exigências à segurança de suplementação de um microrganismo benéfico para atuar como um promissor probiótico deve atender a afinidade ao reagente de azul de anilina, como indicativo às bactérias ácido-lácticas Gram positiva, tendo como princípio que a maioria dos agentes patogênicos aquáticos pertence ao grupo das bactérias Gram negativa, além de catalase negativa, não apresentar atividade hemolítica e inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas ao ambiente intestinal do animal (VIEIRA et al., 2013; DIAS et al., 2018).

O azul de anilina é um reagente que quando adicionado em pequenas concentrações (10%) em meios de culturas para crescimento microbiológico, se adere às colônias recém-crescidas a partir da reação com o ácido-láctico, principal carboidrato que é expelido durante o processo de fermentação pelas bactérias do grupo ácido-lácticas (RAMIREZ et al., 2006; VIEIRA et al., 2013; DIAS et al., 2019).

Esse grupo de microrganismos possui uma diversidade de representantes com finalidade terapêutica com os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lastosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pedococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Wessella*, e como principais espécies aplicadas na aquicultura

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecium* que são bactérias Gram positivas, de morfologia de bacilos ou cocos, não esporuladas, anaeróbicas obrigatórias ou aerotolerantes, que produzem peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas), durante o processo de colonização entérica no hospedeiro (MELLO et al., 2013).

Outro método que contribui a não patogenia dos microrganismos isolados para finalidade probiótica, é a ausência da atividade hemolítica das cepas, que para isso as bactérias não devem realizar a produção da hemolisina, que atua como co-fator enzimático na retenção de íons de ferro e consequentemente ocasiona o quadro clínico anêmico no hospedeiro (VESTERLUND et al, 2007; HUSAIN, 2008).

Neste cenário, o grupo das bactérias probióticas ácido-lácticas não propõe deste íon para a sua produção, característica vantajosa e segura em habitat naturais e antrópicos, que em muitos casos competem por nutrientes e espaço com os microrganismos patogênicos, como ocorre no microbioma intestinal (ELLI et al., 2000).

A atividade antagônica de um potencial probiótico é de grande importância devido a sua zona inibitória, que irá competir com culturas indesejáveis a partir da produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, no intuito de inibir o crescimento patogênico e dessa forma contribuir aos fatores de sanitização, saúde e prevenção infecciosa da aquicultura ornamental (VASEEHARAN et al., 2005; PRIDMORE et al., 2008).

Com isso, pode-se inferir que a inibição das cepas autóctones do *Betta splendens*, diante dos patógenos desafiados, apresenta uma eficaz prospecção para uso probiótico, tendo como base a inibição no crescimento de agentes patogênicos tanto Gram-positivos, quanto Gram-negativos. Isso, pode estar relacionado à ação dos ácidos orgânicos (lático e propiônico) produzidos pelas cepas ácido-lácteas, que têm tanto ação em regular o pH intestinal do hospedeiro, quanto na inibição de patógenos Gram-negativos (GHADBAN, 2002; BAIRAGI et al., 2002), como foi verificada na atuação das cepas isoladas para os patógenos de *Aeromona hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Já para a ação de inibição dos patógenos Gram-positivos, as bacteriocinas podem tem apresentado o maior espectro de atuação (GILLOR et al., 2008; SUGITA et al., 2007), como ao observado pela exclusão do microrganismo *Enterococcus durans*, quando expostos ao desafio de antagonismo com as bactérias autóctones potencialmente probióticas do *Betta splendens*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na presente pesquisa apontam que as bactérias ácido-lácticas de *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*, isoladas do trato digestório do *Betta splendens*, cumprem as premissas para uso probiótico animal.

Todavia, apesar da eficácia das cepas apontarem potencial probiótico nos testes in vitro, outros fatores podem influenciar o seu êxito na aquicultura ornamental, como a via de administração, dosagem e tempo de suplementação. Com isso, torna-se necessário estudos futuros que comprovem a sua eficácia na melhoria dos parâmetros zootécnicos, sanitários, fisiológicos e imunológicos, para melhor elucidação dessa tecnologia e via de administração na espécie alvo.

REFERÊNCIAS

ABASALI, H.; MOHAMAD, S. Dietary prebiotic immunogen supplementation in reproductive performance of platy (*Xiphophorus maculatus*). *Vet. Res.*, v.4, p.66-70, 2011.

- AHMADIFARD, N.; AMINLOOI, V.R.; TUKMECHI, A.; AGH, N. Evaluation of the impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on Growth performance, reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental Fish *Poecilia latipinna*. *Probiotics Antimicro. Proteins*, v.11, p.957-965, 2019.
- ARANI, M.M.; SALATI, A.P.; SAFARI, O.; KEYVANSHOKOO, H.S. Dietary supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquac. Nutr.*, v.25, p.854-861, 2019.
- ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. *Rev. Univ. Vale Rio Verde*, v.9, p.344-355, 2011.
- AZEVEDO, R.V.; FOSSE-FILHO, J.C.; PEREIRA, S.L. *et al.* Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, p.795-804, 2016.
- BAIRAGI, A.; GHOSH, S.K.; SEN, S.K.; RAY, A.K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquac. Int.* v.10, p.109-121, 2002.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I. *et al.* The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, v.114, p.173-186, 2008.
- BARROS, F.A.L.; SILVA, A.L.; DIAS, J.A.R. *et al.* In vitro selection of autochthonous bacterium with probiotic potential for the neotropical fish piauçu *Megaleporinus microcephalus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.74, p.327-337, 2022.
- BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T.N. *et al.* Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.37, p.1373-1379, 2017.
- BRASIL: Guia Brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012. 66p.
- CUNHA, R.B.; CASTRO, M.S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnol. Ciênc. Desenv.*, v.9, p.40-46, 2006.
- DIAS, J.A.R.; ABE, H.A.; SOUSA, N.C. *et al.* Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.*, v.49, p.3063-3070, 2018.
- DIAS, J.A.R.; ABE, H.A.; SOUSA, N.C. *et al.* *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlidfish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquac. Int.*, v.27, p.463-474, 2019.
- DIAS, J.A.R.; ALVES, L.L.; BARROS, F.A.L. *et al.* Comparative effects of using a single strain probiotic and multi-strain probiotic on the productive performance and disease resistance in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.550, p.737855, 2022.
- ELLI, M.; ZINK, R.; RYTZ, A.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J. Appl. Microbiol.*, v.88, p.695-703, 2000.
- EVERS, H.G.; PINNEGAR, J.K.; TAYLOR, M.I. Where are they all from? Sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. *J. Fish Biol.*, v.94, p.909-916, 2019.

- FUJIMOTO, R.Y.; GABBAY, M.I.; MARTINS, M.L. *et al.* Isolamento e seleção de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico para Pirarucu. Aracaju: Embrapa, 2014. 4p. (Comunicado Técnico, n.148).
- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p.147-165, 1999.
- GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic Acid Bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v.14, p.107-114, 2008.
- GHADBAN, G.S. Probiotics in broiler production - a review. *Arch. Geflügelkd.*, v.66, p.49-58, 2002.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as antiand probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.81, p.591-606, 2008.
- GOMES, V.D.S.; AMÂNCIO, A.L.L.; CAVALCANTI, C.R.; BATISTA, J.M.M. Análise das características corporais do peixe *Betta splendens*. *Visão Acad.*, v.20, p.29-38, 2019.
- GUIA Brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012. 66p.
- HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZZA, A. *et al.* Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.27, p.360-371, 2004.
- HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. *Curr. Microbiol.*, v.57, p.331-334, 2008.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE-NETO, C. *et al.* Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesqui. Agropecu. Bras.* v.43, p.1201-1207, 2008.
- JINENDIRAN, S.; NATHAN, A.A.; RAMESH, D. *et al.* Modulation of innate immunity, expression of cytokine genes and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in golffish (*Carassius auratus*) by dietary supplementation with *Exiguobacterium acetylicum* S01. *Fish Shellfish Immunol.*, v.84, p.458-469, 2019.
- MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G. *et al.* Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.33, p.724-730, 2013.
- MILLINGTON, M.D.; HOLMES, B.J.; BALCOMBE, S.R. Systematic review of the Australian freshwater ornamental fish industry: the need for direct industry monitoring. *Manag. Biol. Invasions*, v.13, p.406-434, 2022.
- OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SCHEFFER, M.C. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
- PAIXÃO, P.E.G.; COUTO, M.V.S.; SOUSA, N.C. *et al.* Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, v.526, p.735395, 2020.
- PRIDMORE, R.D.; ANNE-CÉCILE, P.; PRAPLAN, F.; CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.283, p.210-215, 2008.
- RAMIREZ, C.; CIFONNI, E.M.G.; PANCHENIAK, E.F.R.; SOCCOL, C.R. Microorganismo láctico com características probióticas para ser aplicados em la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. *Aliment. Latinoam.*, v.264, p.70-78, 2006.

- 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. *Aquac. Res.*, v.38, p.1002-1004, 2007.
- TAGG, J.R. & MC GIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiol.* v.21, p. 943. 1971.
- THONGPRAJUKAEW, K.; KOVITVADHI, U.; KOVITVADHI, S. *et al.* Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture*, v.322, p.1-9, 2011.
- VASANTHAKUMARAN, M.; BASU, S.B.S.; DEEKSHANYA, K.; RAJA, S. Feed formulation with animal waste as supplements for ornamental fishes *Poecilia sphenops* fishes *Poecilia sphenops*. *Int. J. Recent Sci. Res.*, v.11, p.39263-39266, 2020.
- VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, T.; CHEN, J.C. *In vitro* susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, v.26, p.285-291, 2005.
- VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M. *et al.* Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, v.116, p.325-331, 2007.
- VIEIRA, F.; JATOBA, A.; MOURIÑO, J.L.P. *et al.* *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.48, p.998-1004, 2013.
- WILLIS, S. *Farming ornamental fish*. Tasmania: NationalAquaculture Training Institute. 2015.
- YAMASHITA, M.F.; FERRAREZI, J.V.; PEREIRA, J.G. *et al.* Autochthonous vs allochthonous probiotic strains to *Rhamdia quelen*. *Microbiol. Pathog.*, v.139, p.103897, 2020.

APÊNDICE A – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO



Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.76, n.3, e13141, 2024










<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-13141>

Original Article - Zootecnics

Prospection of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* with potential species-specific probiotic use in ornamental aquaculture of *Betta splendens* Regan, 1910

Page 1 a 8

[*Prospecção de Lactobacillus plantarum e Enterococcus faecium com potencial uso probiótico espécie-específico na aquicultura ornamental de Betta splendens Regan, 1910*]

J.A.R. Dias¹ , Y.F. Marinho¹ , I.R.A. Santos¹ , E.C.R. Almeida¹ , S.R. Pinheiro¹ ,
A. Silva¹ , Y.V.A. Lopes¹ , A.M.B. Machado¹ , F.A.L. Barros² , C.A.M. Cordeiro¹ 

¹Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de Pinheiro, Pinheiro, MA, Brasil

²Instituto Federal do Pará, campus-Cametá, Cametá, PA, Brasil

³Universidade Federal do Pará, campus-Bragança, Bragança, PA, Brasil

ABSTRACT

The research evaluated the isolation, identification, and prospection of species-specific beneficial bacteria in fish farming of ornamental fish *Betta splendens*. For this, the microbiological material was obtained from the intestinal tract of healthy specimens, with bacterial growth in selective culture medium Man Rogosa Sharped (MRS). Sixteen strains were isolated based on the response of *in vitro* tests of catalase, Gram, nilin blue, hemolytic activity and antibiogram to pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* and *Escherichia coli*. Of the isolated strains C1BS and C5BS, they showed the best responses, which were later identified by the Maldi-TOF method as *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*. Due to the performance of lactic acid strains in *in vitro* tests and the bibliographic record of their performance as probiotics, the species have great potential for species-specific use in the ornamental production of *Betta splendens*.

Keywords: Maldi-TOF, microbiology, ornamental fish, pathogenic inhibition

RESUMO

A pesquisa avaliou o isolamento, a identificação e a prospecção de bactérias benéficas espécie-específico na piscicultura do peixe ornamental *Betta splendens*. Para isso, o material microbiológico foi obtido do trato intestinal de espécimes sadios, com crescimento bacteriano em meio de cultura seletivo Man Rogosa Sharped (MRS). Dezesesseis cepas foram isoladas com base na resposta dos testes *in vitro* de catalase, Gram, azul de anilina, atividade hemolítica e antibiograma aos patógenos *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* e *Escherichia coli*. Das cepas isoladas, C1BS e C5BS foram as que apresentaram melhores respostas, as quais posteriormente foram identificadas, pelo método Maldi-TOF, como *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*. Devido ao registro bibliográfico e ao desempenho das cepas ácido lácticas nos testes *in vitro*, essas apresentam um grande potencial para uso probiótico espécie-específico na produção ornamental de *Betta splendens*.

Palavras-chave: Maldi-TOF, microbiologia, peixe ornamental, inibição patogênica

INTRODUCTION

Ornamental aquaculture is a traditional and profitable activity that reaches a worldwide turnover of more than 15 million dollars (Evers *et al.*, 2019), in which more than 2 billion species

are traded (Vasanthakumaran *et al.*, 2020). In Brazil, this segment presents a high growth, an aspect that is related to the greater demand by the final consumer and the exponent profit in the commercialization of native and exotic species (Brasil, 2012; Gomes *et al.*, 2019).

Corresponding author: joel.artur@ufma.br

Submitted: September 11, 2023. Accepted: November 22, 2023.

However, in this market there is no consolidated official statistics, but in general the most commercialized species are exotic organisms such as beta (*Betta splendens*); kinguio ou japonês (*Carassius auratus*); carpa or koy (*Cyprinus carpio*) and the guppy or lebiste (*Poecilia reticulata*) (Millington et al., 2022).

With the commercialization of *Betta splendens* mainly concentrated in Thailand, Indonesia, Singapore, China, Malaysia, Japan, USA, and Mexico, which are its main producers (Thongprajukaew et al. 2011), the animal is raised intensively with high stocking densities, sanitary and feeding management that are often inappropriate, which compromise its productive performance, health, and animal welfare indices (Willis, 2015).

In this way, it is essential to improve breeding techniques in ornamental aquaculture, with food additives standing out, such as exogenous enzymes, prebiotics, probiotics, and symbiotics that have shown positive results on fish performance and immunity (Abasali and Mohamad, 2011; Azevedo et al., 2016; Gomes et al., 2019).

In this scenario, probiotics are live microorganisms that, when inserted into the animal production system, colonize the digestive tract of the host, and stimulate its immune system from the lymphatic tissue associated with the intestine, in addition to acting antagonistically to pathogenic agents, through competition for space, nutrients and production of inhibitory metabolites (Balcázar et al., 2008; Gatesoupe, 1999, 2008).

Benefits have been proven in the aquaculture of the *Carassius auratus* (Jinendiran et al., 2019), *Poecilia latipinna* (Ahmadifard et al., 2019), *Danio rerio* (Arani et al., 2019) and *Pterophyllum escalare* (Dias et al., 2019). However, for the successful use of probiotics, it is necessary to select species-specific microorganisms that can provide greater effects (Dias et al., 2018, 2019, 2022; Yamashita et al., 2020).

However, probiotic species-specific selection requires several *in vitro* tests to determine the effectiveness of microorganisms for therapeutic purposes, such as resistance to physiological and

environmental conditions (Ramirez et al., 2006 Dias et al., 2019), as well as its viability in inhibiting the occurrence of endogenous pathogenic strains and in the breeding system (Dias et al., 2019; Barros et al., 2022).

Therefore, the objective of the research was to isolate and select *in vitro* strains with species-specific probiotic potential in aquaculture of *Betta splendens*.

MATERIAL AND METHODS

The assays were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Para (CEUA nº 9202300420).

The adult specimens of *Betta splendens* were purchased from commercial aquarium shops in the greater metropolitan region of Belem-Pa, Brazil. For this, a brief on-site assessment of the health status of the animals was carried out, based on the macroscopic analysis of the parasite and the specific physiological behavior of the species.

After acquiring the specimens, they were transported to the Probiotics Laboratory of the Federal University of Para, University Campus of Bragança-Pa, Brazil.

For species-specific bacterial isolation, five healthy specimens of the *Betta splendens*, after a 24-hour fast, for the emptying of the digestive system, and then the individuals were anesthetized with eugenol (60mg.L⁻¹) and from the deepening of the anesthetic plane, the animals were euthanized by sectioning the spinal cord according to the guidelines of the Brazilian Guide of Good Practices for Euthanasia in Animals (Guia, 2012), disinfected externally with a 70% alcohol solution and then transferred to a laminar flow oven under sterile conditions, to perform excision of the intestine.

After removal of the intestine, it was macerated in sterile saline solution at 0,65% in proportion 1:1 (w/v), using mortar and porcelain pestle. Subsequently, the macerated material was transferred to collection tubes containing 10 mL of culture medium broth Man Rogosa and Sharpe (MRS), which were homogenized with a vortex tube shaker and incubated for 24 hours at a

Prospection of...

temperature of 35°C in a stove with forced air circulation (Jatobá *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2018; Paixão *et al.*, 2020).

After microbiological growth in broth, the culture medium was diluted in factor 1:10, until 10^5 , and then sown 1mL in petri dishes containing the culture medium MRS Agar enriched with 10% of aniline blue as a possible initial indicator of probiotic strains, homogenized with micropellet spheres and bacterial growth carried out in an oven at 35 °C during 48h (Vieira *et al.*, 2013; Fujimoto *et al.*, 2014). The colonies that absorbed the indicator dye continued to identify the morphotype using the Gram staining method (Dias *et al.*, 2019).

Thus, Gram-positive cocci and bacillus colonies were isolated and seeded in a new MRS Agar culture medium for plate exhaustion (Oplustil *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2018, 2019). And subsequent evaluation of catalase and hemolytic activity, the negative catalase colonies and those that did not present homolytic activity, continued the analysis of isolation of potentially probiotic bacteria, as described in the protocols of Vieira *et al.* (2013) and Dias *et al.* (2019).

The *in vitro* inhibition against pathogenic agents was performed by the method of Tagg and McGiven (1971), adapted by Ramirez *et al.* (2006) and Dias *et al.* (2019). For the experiment, the strains of isolated bacteria were grown in test tubes with MRS Broth culture medium, kept for 24 hours and incubated in an oven at 35°C, later the material was seeded in petri plates containing Agar MRS culture medium and incubated at 35°C for 48 hours. Where four discs with a diameter of 0.8 cm were removed from an agar plate with the potentially probiotic bacteria strains and were superimposed on a Muller Hinton Agar culture medium, recently seeded with pathogens *Aeromonas hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus durans* and *Escherichia coli*, which were incubated at 30 °C for 24 hours.

For further analysis of the antibacterial capacity of potentially probiotic strains against pathogenic agents, which were analyzed by the development or not of the diffusion halo, named by the

diameter of the strains inhibitory zone (Hjelm *et al.*, 2004).

For the identification of strains with prospect of probiotic use in species-specific fish farming of *Betta splendens*, the time-of-flight matrix-assisted laser desorption ionization method was used-MALDI-TOF (Cunha *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2022).

For this, newly grown colonies were used in the MRS Agar culture medium, and subsequently transferred to the plate of MALDI (Bruker Daltonics), added of 1µL matrix solution HCCA [α -cyano-4-hydroxycinnamic (Sigma-Aldrich), in the concentration of $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in a solution of 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid (v/v)], until the complete drying of the reaction in a stainless steel plate for later analysis in the MALDI-TOF. which considered the degree of confidence in the physical-chemical identification of the strains up to the species level, from scores greater than 2.0 (Bier *et al.*, 2017).

The inhibitory diameters obtained by the *in vitro* pathogenic test were submitted to tests of homoscedasticity and normality assumptions, by Levene and Shapiro-Wilk, respectively, for further analysis of variance (ANOVA), that when significant, Tukey's test was used to separate the means at 5% probability, analyzed with the aid of the statistical program BioEstat.

RESULTS

A total of 16 autochthonous strains of *Betta splendens* were isolated, 10 reacted with the aniline blue dye (Figure 1), six were classified as Gram positive, with cell morphology of cocci (6) and bacilli (4), and three showed no catalase and hemolytic activity (Figure 1).

Thus, three cultures proceeded to the inhibition test against pathogens, which were named C1BS, C5BS and C14BS. All strains showed inhibition halos with diameters greater than 11 mm for all evaluated pathogens (Table 1), with a significant difference ($p < 0.05$) for two strains (C1BS and C5BS), in which the highest inhibitory measures were observed, compared to the C14BS strain.

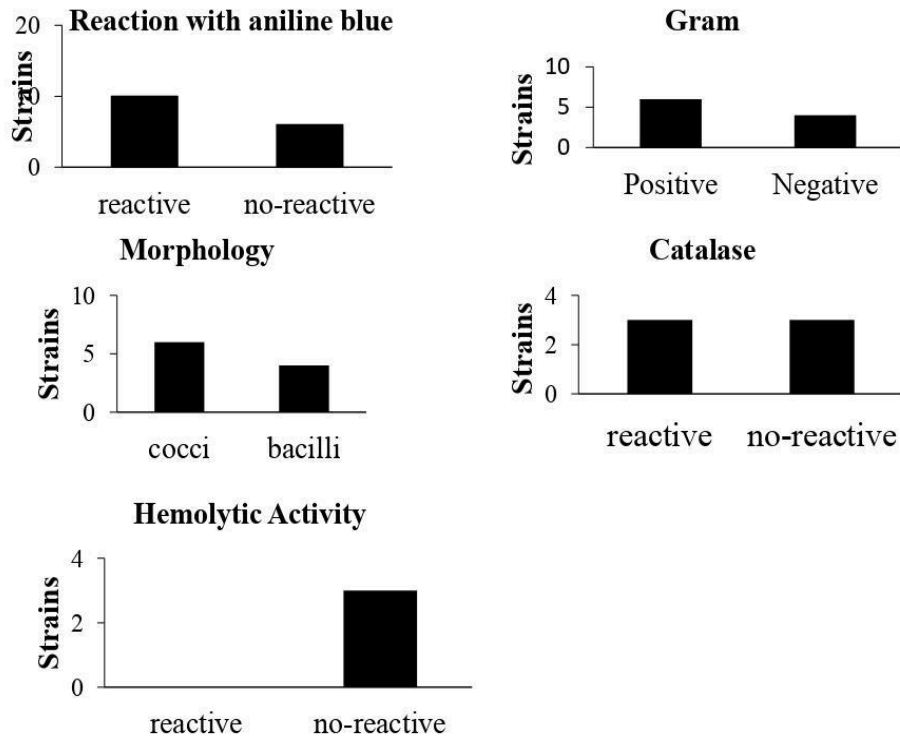


Figure 1. Selection of autochthonous bacteria in *Betta splendens* fish farming, based on *in vitro* reaction tests with aniline blue dye, Gram stain, catalase, and hemolytic activity.

Table 1. *In vitro* evaluation of bacteria with potential probiotic use isolated from the digestive tract of the ornamental *Betta splendens* submitted to the antagonistic challenge, halo of inhibition (mm), with the pathogens *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED) and *Escherichia coli* (EC)

Strains	AH(-)	PA(-)	EC(-)	ED(+)
C1BS	20.14 ± 0.27A	18.22 ± 0.380A	18.31 ± 1.08A	18.89 ± 1.00A
C5BS	19.03 ± 0.60A	17.87 ± 0.43A	19.32 ± 1.07A	19.11 ± 0.90A
C14BS	11.10 ± 0.51B	13.65 ± 0.52B	14.58 ± 0.93B	12.66 ± 0.95B

(-) Gram negative bacteria, (+) Gram positive bacteria. Different letters in the same column indicate significant difference Tukey test (p<0.05).

With this, the bacteria that stood out in the processes of selection and *in vitro* pathogenic challenge for potential species-specific probiotic use in ornamental aquaculture of *Betta splendens*, were identified from two genera,

Lactobacillus and *Enterococcus*, for a species of *Lactobacillus plantarum* and two varieties for *Enterococcus faecium*, both belonging to the lactic-acid bacteria group.

DISCUSSION

The autochthonous selection process for the prospection of bacteria for potential probiotic use is of great relevance to the probability of an effective final product and guarantee of food health in the host (Dias *et al.*, 2018, 2019). For this, it is necessary to meet some *in vitro* prerequisites that enable the feasibility of use after protocols that simulate microbiological not-pathogenesis and probiotic benefits for a possible healthy microbiome in the target animal in production (Dias *et al.*, 2018, 2019; Paixão *et al.*, 2020).

Thus, the requirements for the safety of supplementation of a beneficial microorganism to act as a promising probiotic must meet the affinity to the aniline blue reagent, as indicative of Gram positive lactic acid bacteria, having as a principle that most aquatic pathogenic agents belongs to the group of Gram negative bacteria, in addition to being catalase negative, it does not present hemolytic activity and inhibit the growth of potentially pathogenic bacteria in animal intestinal environment (Vieira *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2018).

Aniline blue is a reagent that, when added in small concentrations (10%) in culture media for microbiological growth, adheres to newly grown colonies from the occurrence of lactic acid, the main carbohydrate that is expelled during the process of fermentation by lactic acid bacteria (Ramirez *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2019).

This group of microorganisms has a diversity of representatives with therapeutic purposes with the genera *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lastosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* and *Wessella*, and as the main species applied in aquaculture *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* and *Enterococcus faecium* which are Gram-positive bacteria, with bacilli or cocci morphology, non-sporulating, obligate anaerobic or aerotolerant, which produce antimicrobial peptides (bacteriocins) during the process of enteric colonization in the host (Mello *et al.*, 2013).

Another method that contributes to the not-pathogenicity of microorganisms isolated for probiotic purposes is the absence of hemolytic activity of the strains, for which the bacteria must not carry out the production of hemolysin, which acts as an enzymatic co-factor in the retention of iron ions and consequently causes the anemic clinical picture in the host (Vesterlund *et al.*, 2007; Husain, 2008).

Thus, the group of probiotic acid-lactic bacteria does not propose this ion for its production, an advantageous and safe characteristic in natural and anthropic habitats, which in many cases compete for nutrients and space with pathogenic microorganisms, as occurs in the intestinal microbiome (Elli *et al.*, 2000).

The antagonistic activity of a potential probiotic is of great importance due to its inhibitory zone, which will compete with undesirable cultures from the production of organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins, to inhibit the pathogenic microbiological growth and thus contribute to the sanitation, health and infectious prevention factors in ornamental aquaculture (Vaseeharan *et al.*, 2005; Pridmore *et al.*, 2008).

With this, it can be inferred that the inhibition of autochthonous strains of *Betta splendens*, in the face of the challenged pathogens, presented an effective prospect for probiotic use, based on the inhibition of the growth of both Gram-positive and Gram-negative pathogenic agents. This may be related to the action of organic acids (lactic and propionic) produced by lactic acid strains, which have both an action in regulating the intestinal pH of the host and in inhibiting Gram-negative pathogens. (Ghadban, 2002; Bairagi *et al.*, 2002), as verified in the performance of the isolated strains against the pathogens of *Aeromonas hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

As for the inhibition of Gram-positive pathogens, bacteriocins may have presented the greatest spectrum of action (Gillor *et al.*, 2008; Sugita *et al.*, 2007), as observed by the exclusion of the microorganism *Enterococcus durans*, when exposed to the challenge of antagonism with potentially probiotic autochthonous bacteria from the *Betta splendens*.

CONCLUSION

The results obtained in the present research indicate that the acid-lactic bacteria of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*, isolated from the digestive tract of *Betta splendens*, meet the *in vitro* requirements for animal probiotic use. However, despite the effectiveness of the strains showing probiotic potential *in vitro* tests, other factors may influence their success in ornamental aquaculture, such as the route of administration, dosage, and time of supplementation. Therefore, future studies are necessary to prove its effectiveness in improving zootechnical, sanitary, physiological and immunological parameters, to better elucidate this technology and route of administration in the target species.

REFERENCES

- ABASALI, H.; MOHAMAD, S. Dietary prebiotic immunogen supplementation in reproductive performance of platy (*Xiphophorus maculatus*). *Vet. Res.*, v.4, p.66-70, 2011.
- AHMADIFARD, N.; AMINLOOI, V.R.; TUKMECHI, A.; AGH, N. Evaluation of the impacts of long-term enriched *Artemia* with *Bacillus subtilis* on Growth performance, reproduction, intestinal microflora, and resistance to *Aeromonas hydrophila* of ornamental Fish *Poecilia latipinna*. *Probiotics Antimicro. Proteins*, v.11, p.957-965, 2019.
- ARANI, M.M.; SALATI, A.P.; SAFARI, O.; KEYVANSHOKOO, H.S. Dietary supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquac. Nutr.*, v.25, p.854-861, 2019.
- ASSIS, D.M.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. *Rev. Univ. Vale Rio Verde*, v.9, p.344-355, 2011.
- AZEVEDO, R.V.; FOSSE-FILHO, J.C.; PEREIRA, S.L. *et al.* Prebiótico, probiótico e simbiótico para larvas de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852, Perciformes, Osphronemidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, p.795-804, 2016.
- BAIRAGI, A.; GHOSH, S.K.; SEN, S.K.; RAY, A.K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquac. Int.* v.10, p.109-121, 2002.
- BALCÁZAR, J.L.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I. *et al.* The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, v.114, p.173-186, 2008.
- BARROS, F.A.L.; SILVA, A.L.; DIAS, J.A.R. *et al.* In vitro selection of autochthonous bacterium with probiotic potential for the neotropical fish piauçu *Megaleporinus microcephalus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.74, p.327-337, 2022.
- BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T.N. *et al.* Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.37, p.1373-1379, 2017.
- BRASIL: Guia Brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012. 66p.
- CUNHA, R.B.; CASTRO, M.S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotechnol. Ciênc. Desenv.*, v.9, p.40-46, 2006.
- DIAS, J.A.R.; ABE, H.A.; SOUSA, N.C. *et al.* Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. *Aquac. Res.*, v.49, p.3063-3070, 2018.
- DIAS, J.A.R.; ABE, H.A.; SOUSA, N.C. *et al.* *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlidfish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquac. Int.*, v.27, p.463-474, 2019.
- DIAS, J.A.R.; ALVES, L.L.; BARROS, F.A.L. *et al.* Comparative effects of using a single strain probiotic and multi-strain probiotic on the productive performance and disease resistance in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, v.550, p.737855, 2022.

Prospection of...

- ELLI, M.; ZINK, R.; RYTZ, A.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J. Appl. Microbiol.*, v.88, p.695-703, 2000.
- EVERS, H.G.; PINNEGAR, J.K.; TAYLOR, M.I. Where are they all from? Sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. *J. Fish Biol.*, v.94, p.909-916, 2019.
- FUJIMOTO, R.Y.; GABBAY, M.I.; MARTINS, M.L. *et al.* Isolamento e seleção de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico para Pirarucu. Aracaju: Embrapa, 2014. 4p. (Comunicado Técnico, n.148).
- GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p.147-165, 1999.
- GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic Acid Bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v.14, p.107-114, 2008.
- GHADBAN, G.S. Probiotics in broiler production - a review. *Arch. Geflügelkd.*, v.66, p.49-58, 2002.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as antiand probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.81, p.591-606, 2008.
- GOMES, V.D.S.; AMÂNCIO, A.L.L.; CAVALCANTI, C.R.; BATISTA, J.M.M. Análise das características corporais do peixe *Betta splendens*. *Visão Acad.*, v.20, p.29-38, 2019.
- GUIA Brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012. 66p.
- HJELM, M.; BERGH, O.; RIAZZA, A. *et al.* Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.27, p.360-371, 2004.
- HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. *Curr. Microbiol.*, v.57, p.331-334, 2008.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE-NETO, C. *et al.* Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. *Pesqui. Agropecu. Bras.* v.43, p.1201-1207, 2008.
- JINENDIRAN, S.; NATHAN, A.A.; RAMESH, D. *et al.* Modulation of innate immunity, expression of cytokine genes and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in golffish (*Carassius auratus*) by dietary supplementation with *Exiguobacterium acetylicum* S01. *Fish Shellfish Immunol.*, v.84, p.458-469, 2019.
- MELLO, H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G. *et al.* Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.33, p.724-730, 2013.
- MILLINGTON, M.D.; HOLMES, B.J.; BALCOMBE, S.R. Systematic review of the Australian freshwater ornamental fish industry: the need for direct industry monitoring. *Manag. Biol. Invasions*, v.13, p.406-434, 2022.
- OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SCHEFFER, M.C. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
- PAIXÃO, P.E.G.; COUTO, M.V.S.; SOUSA, N.C. *et al.* Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture*, v.526, p.735395, 2020.
- PRIDMORE, R.D.; ANNE-CÉCILE, P.; PRAPLAN, F.; CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.283, p.210-215, 2008.
- RAMIREZ, C.; CIFONNI, E.M.G.; PANCHENIAK, E.F.R.; SOCCOL, C.R. Microorganismo láctico com características probióticas para ser aplicados em la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. *Aliment. Latinoam.*, v.264, p.70-78, 2006.
- 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. *Aquac. Res.*, v.38, p.1002-1004, 2007.
- TAGG, J.R. & MC GIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiol.* v.21, p. 943. 1971.

- THONGPRAJUKAEW, K.; KOVITVADHI, U.; KOVITVADHI, S. *et al.* Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture*, v.322, p.1-9, 2011.
- VASANTHAKUMARAN, M.; BASU, S.B.S.; DEEKSHANYA, K.; RAJA, S. Feed formulation with animal waste as supplements for ornamental fishes *Poecilia sphenops* fishes *Poecilia sphenops*. *Int. J. Recent Sci. Res.*, v.11, p.39263-39266, 2020.
- VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, T.; CHEN, J.C. *In vitro* susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, v.26, p.285-291, 2005.
- VESTERLUND, S.; VANKERCKHOVEN, V.; SAXELIN, M. *et al.* Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, v.116, p.325-331, 2007.
- VIEIRA, F.; JATOBA, A.; MOURIÑO, J.L.P. *et al.* *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, v.48, p.998-1004, 2013.
- WILLIS, S. *Farming ornamental fish*. Tasmania: NationalAquaculture Training Institute. 2015.
- YAMASHITA, M.F.; FERRAREZI, J.V.; PEREIRA, J.G. *et al.* Autochthonous vs allochthonous probiotic strains to *Rhombia quelen*. *Microbiol. Pathog.*, v.139, p.103897, 2020.