

# PROBIÓTICOS



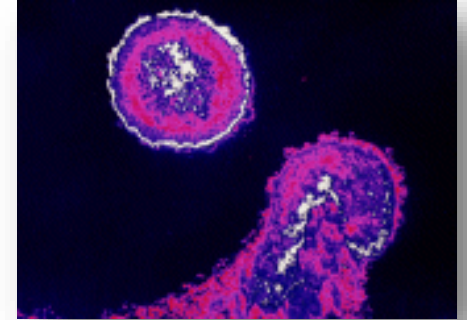
O que são? Para que servem? Como e quando utilizá-los? Qual seu papel na dinâmica físico-química e microbiológica da água de viveiros de cultivo do *Litopenaeus vannamei*.

**Dr. Alysson Lira Angelim**

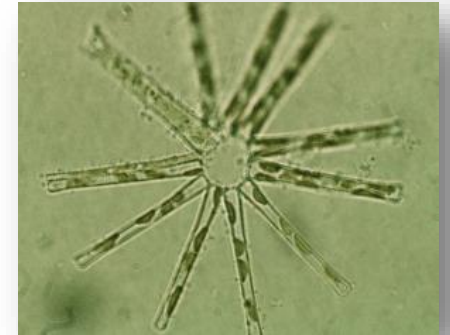
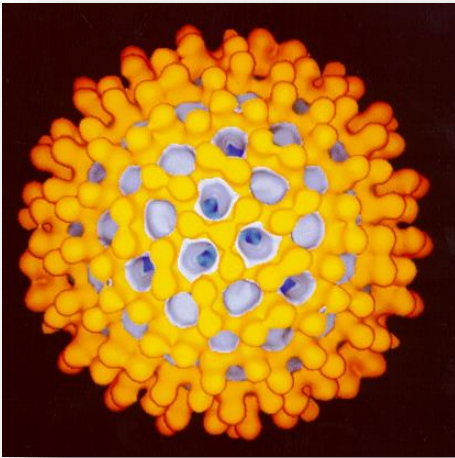
Biotrends Soluções Biotecnológicas

[www.biotrends.com.br](http://www.biotrends.com.br)

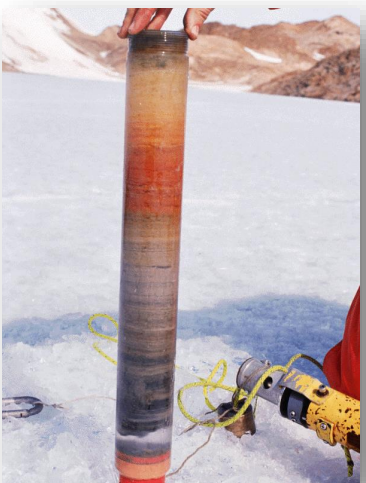
[alysson@biotrends.com.br](mailto:alysson@biotrends.com.br)



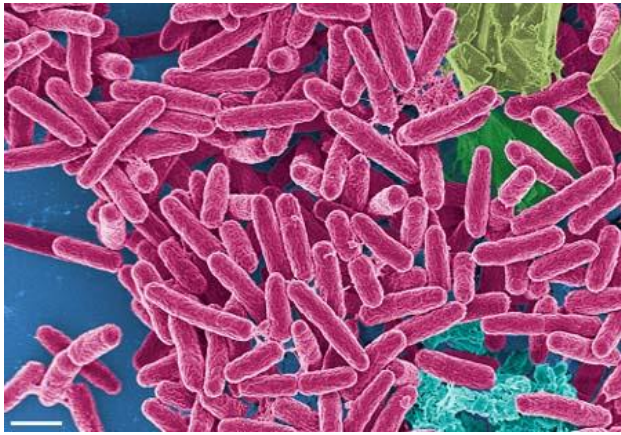
# ***Os micro-organismos***



# Onde estão?



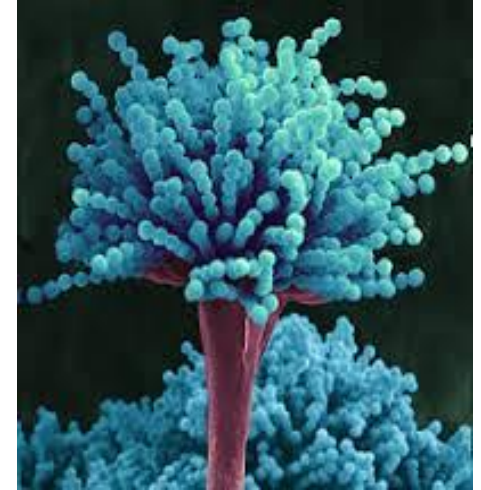
## Bactérias-procariotos



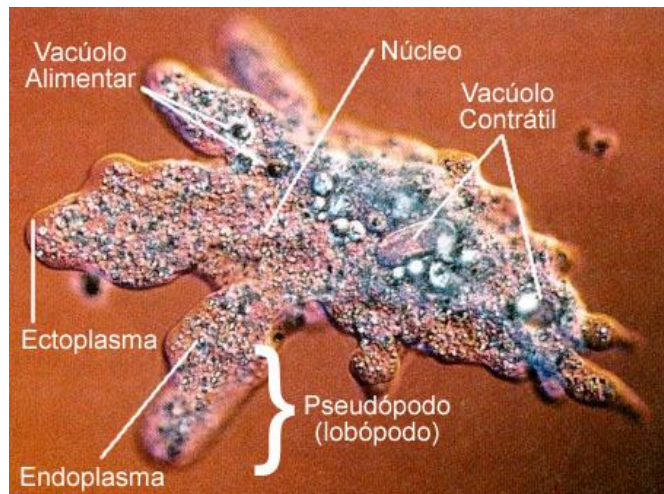
## Archaea – procariotos



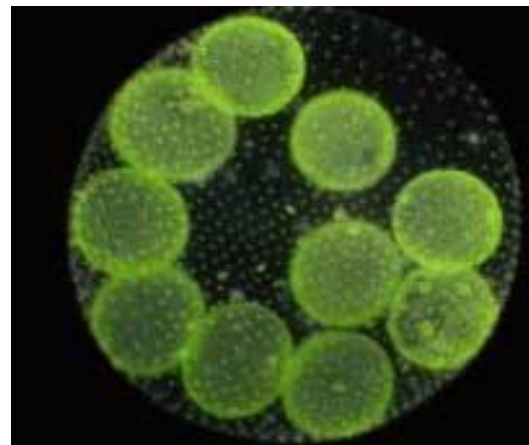
## Fungos – eucariotos



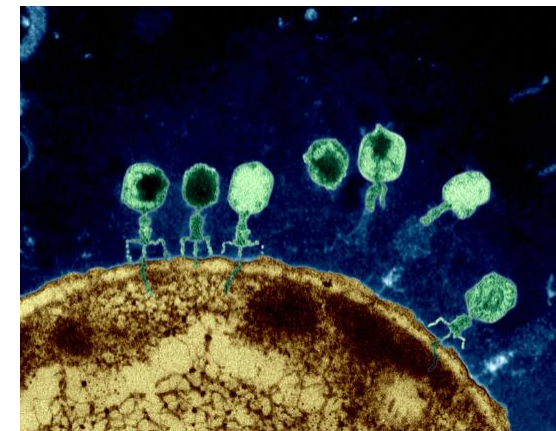
## Protozoários-eucariotos



## Microalgas-eucariotos

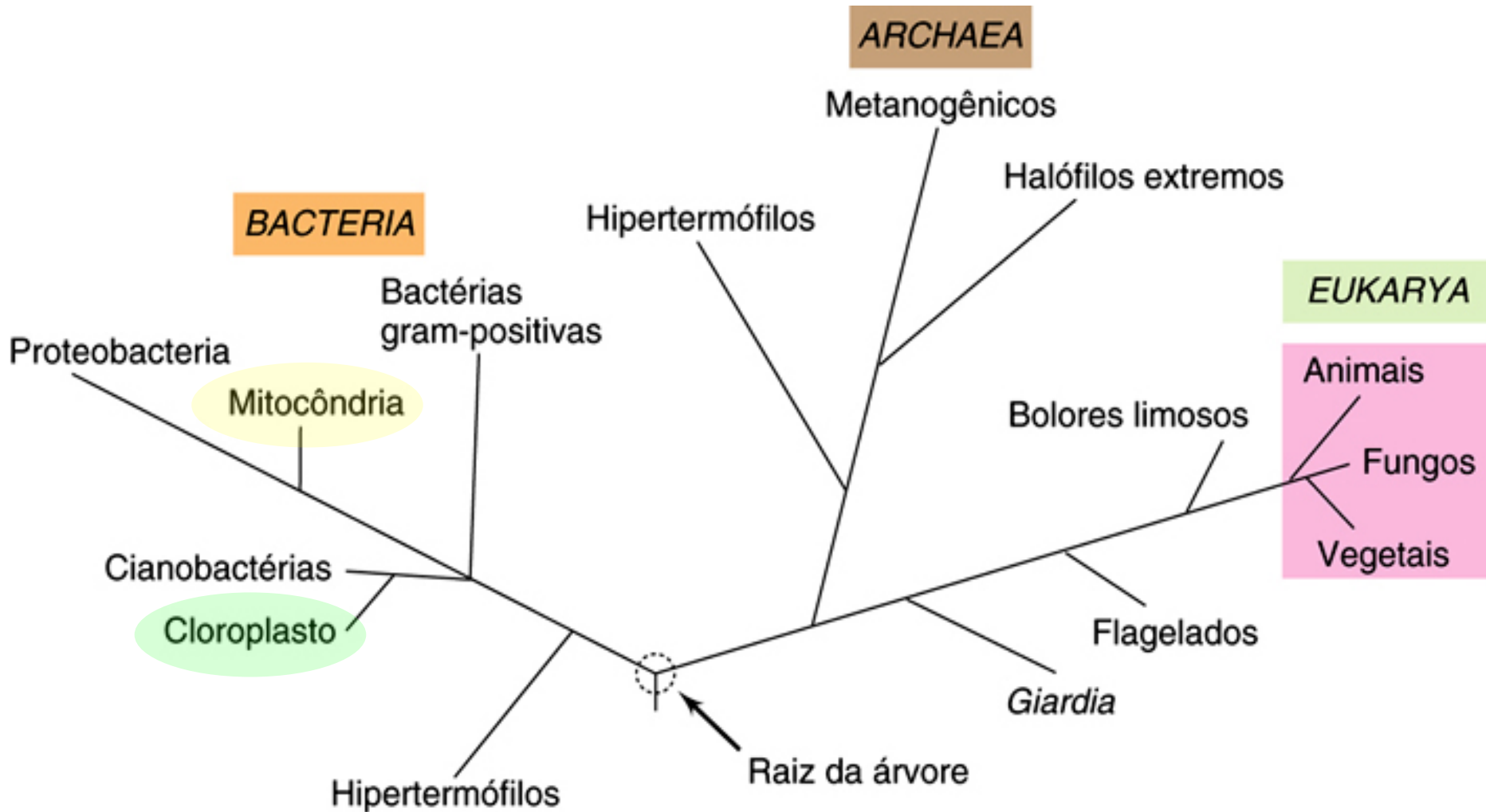


## Vírus parasitas celulares obrigatórios



# Classificação dos seres vivos

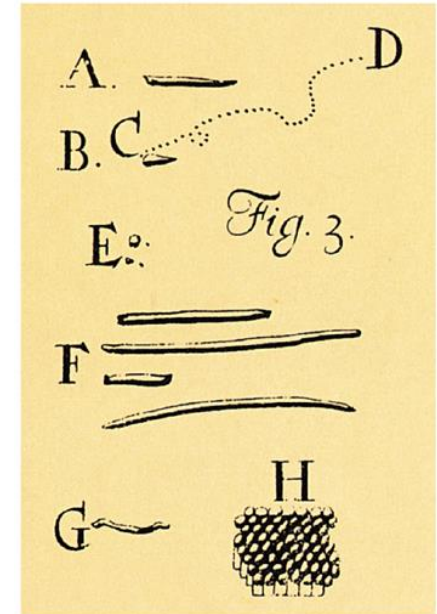
Carl R. Woese (1978)



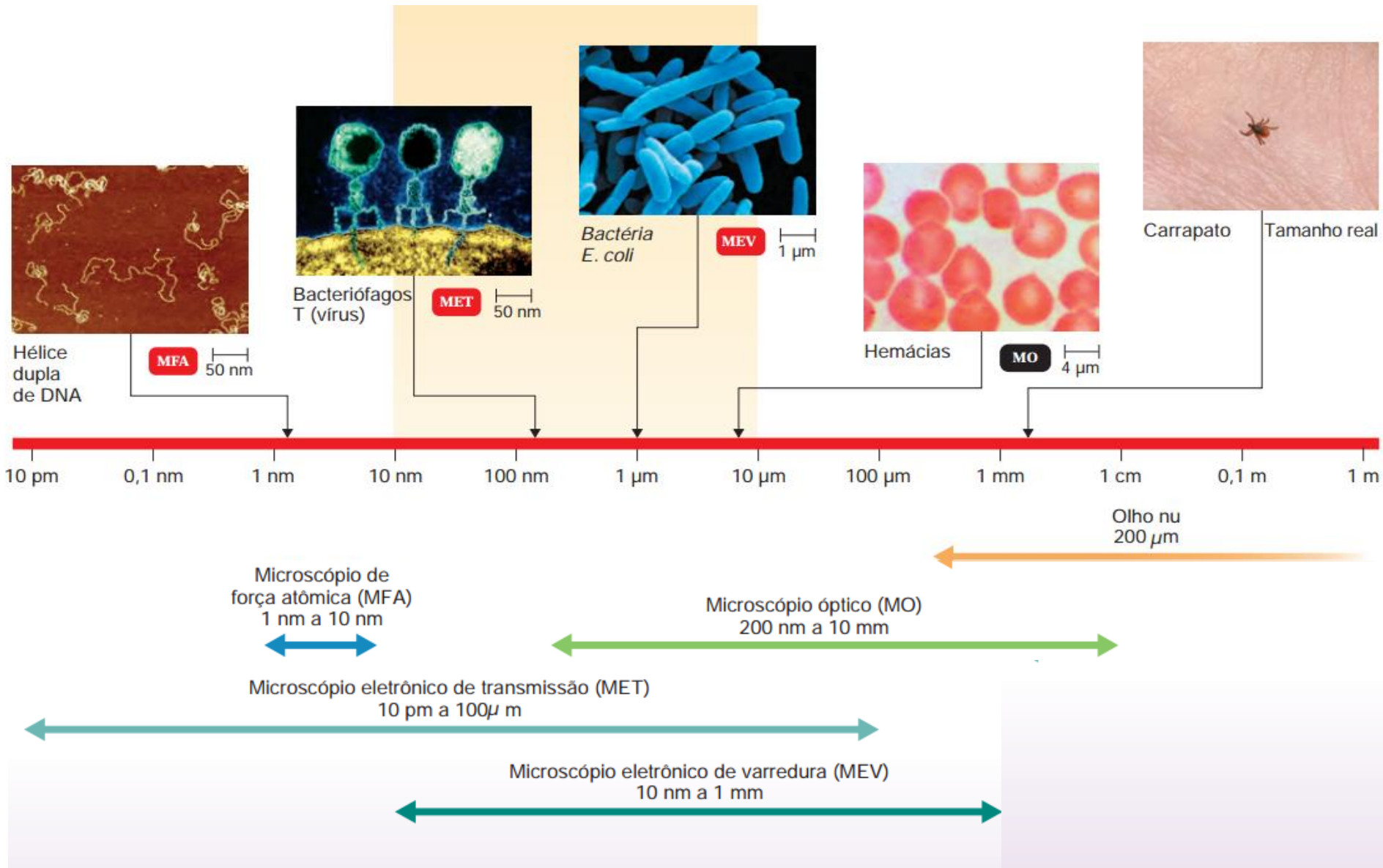
“Primeiro a observar microrganismos através de lentes de aumento (300x)”



Antonie Van Leeuwenhoek  
(1632 - 1723)



**Poder de resolução** é a capacidade de distinguir dois pontos muito próximos como pontos separados (0,1 mm olho nu).



# Comparação entre os tamanhos de Bactérias e Vírus

## Bactérias



*Oscillatoria* (cianobactéria)  
8 x 50  $\mu\text{m}$

*Bacillus megaterium*  
1,5 x 4  $\mu\text{m}$



*Escherichia coli*  
1 x 3  $\mu\text{m}$



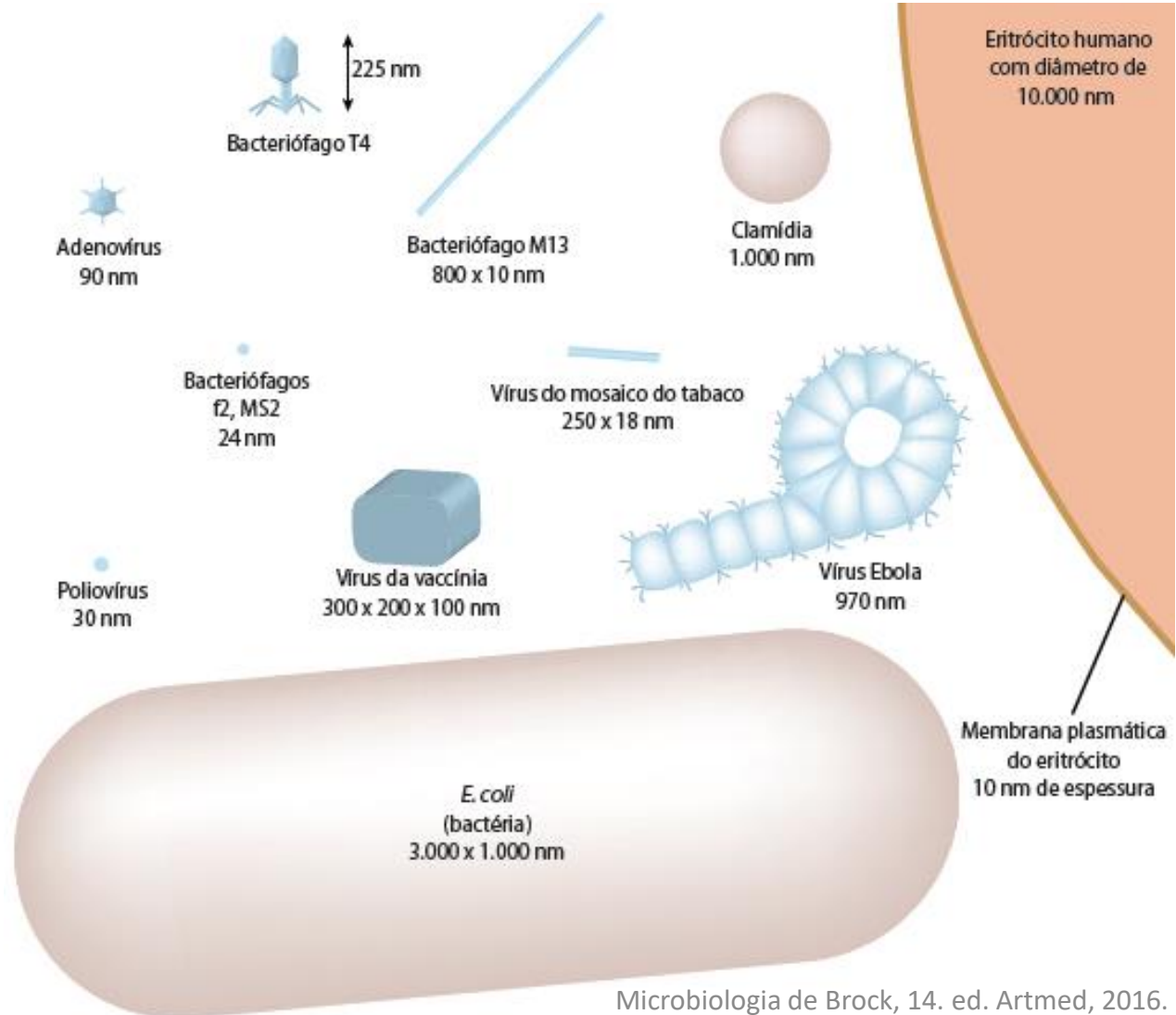
*Streptococcus pneumoniae*  
0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro



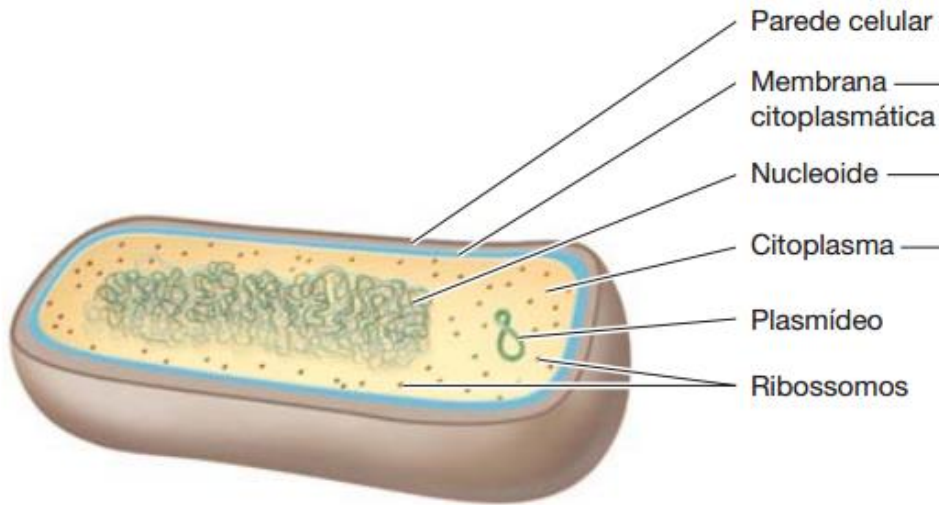
*Haemophilus influenzae*  
0,25 x 1,2  $\mu\text{m}$



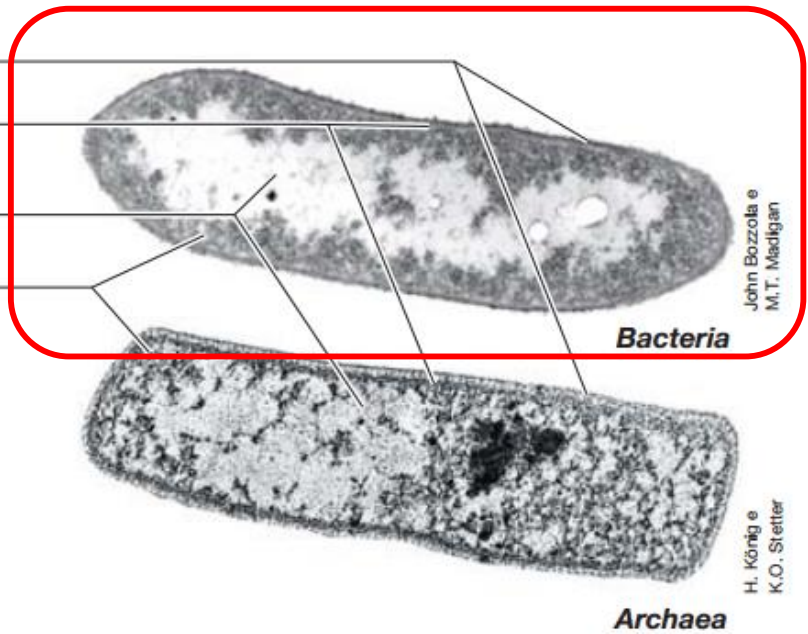
## Bactérias x Vírus





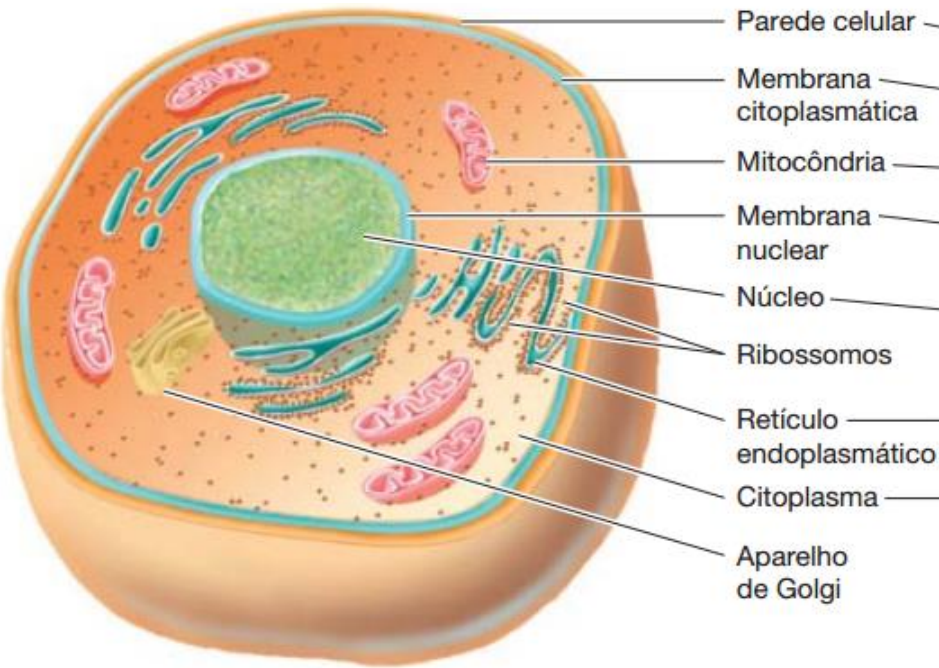


(a) Procariota

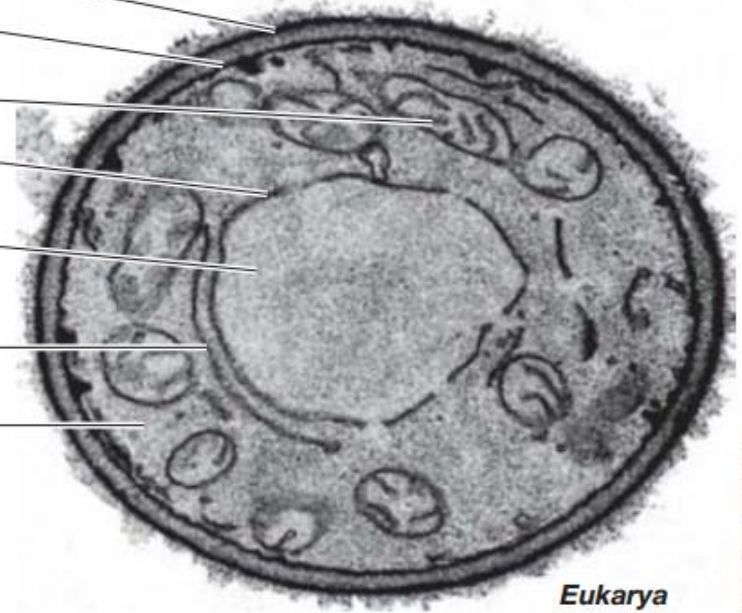


John Bozzola e  
M.T. Madigan

H. König e  
K.O. Stetter



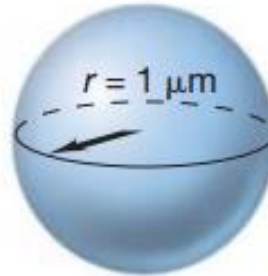
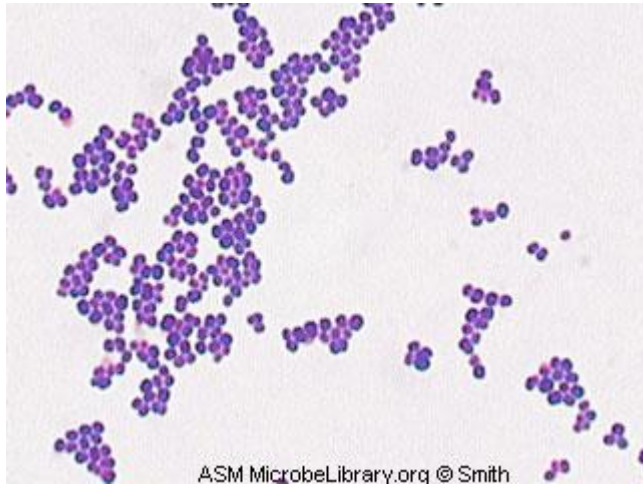
(b) Eucariota



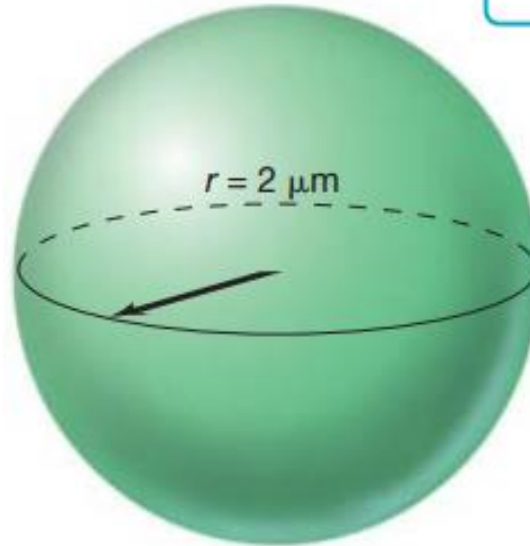
S.F. Conit e T.D. Brock

# Características Gerais de Bactérias

“A importância de ser pequeno”



$$r = 1 \mu\text{m}$$
$$\text{Área superficial } (4\pi r^2) = 12,6 \mu\text{m}^2$$
$$\text{Volume } \left(\frac{4}{3}\pi r^3\right) = 4,2 \mu\text{m}^3$$
$$\frac{\text{Superfície}}{\text{Volume}} = 3$$



$$r = 2 \mu\text{m}$$
$$\text{Área superficial} = 50,3 \mu\text{m}^2$$
$$\text{Volume} = 33,5 \mu\text{m}^3$$
$$\frac{\text{Superfície}}{\text{Volume}} = 1,5$$

**A capacidade de transportar nutrientes é maior em células menores.**

# Formas das células bacterianas



Bacilo



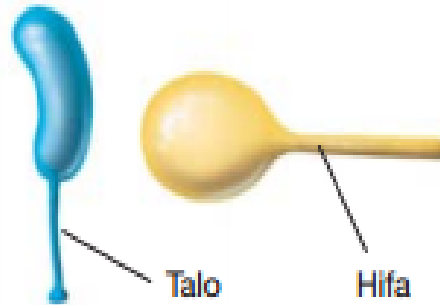
Coco



Espirilo



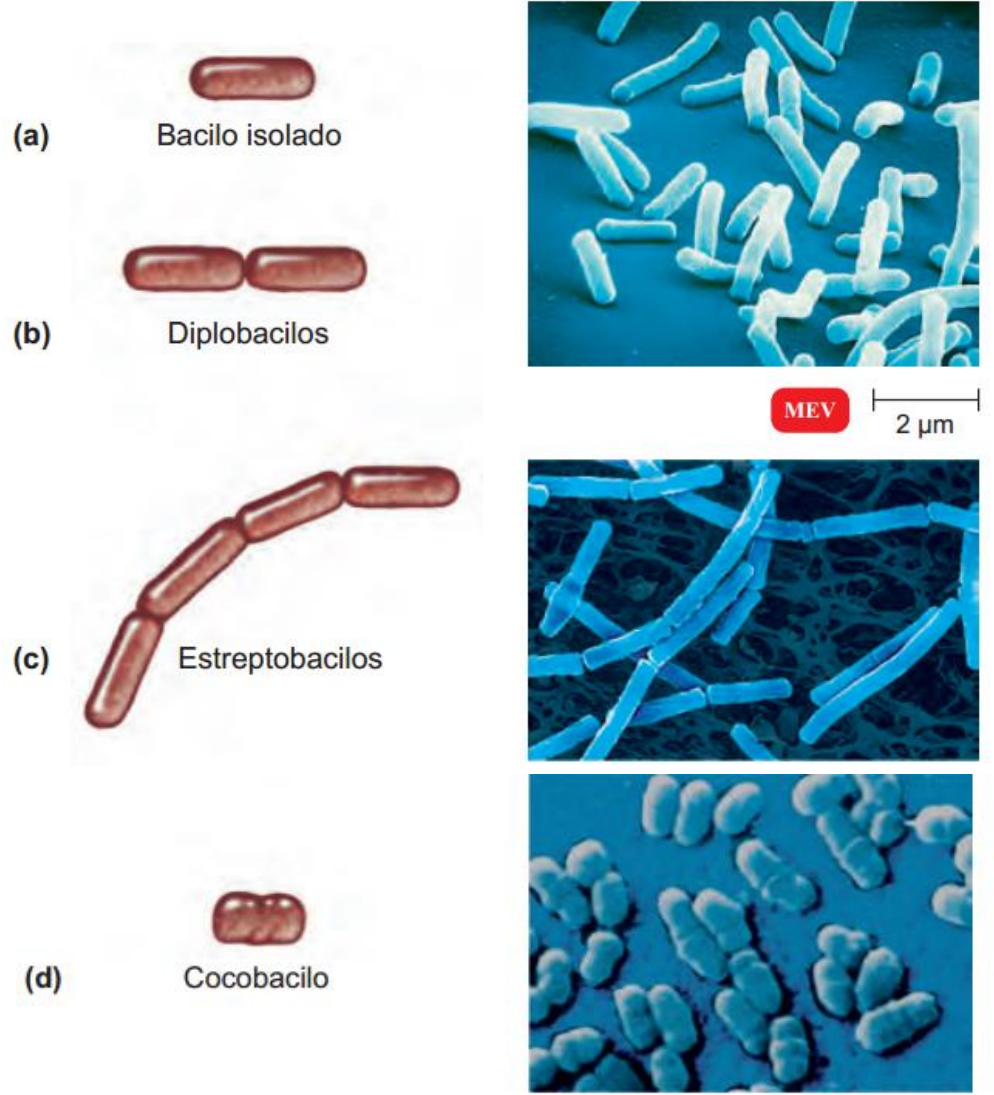
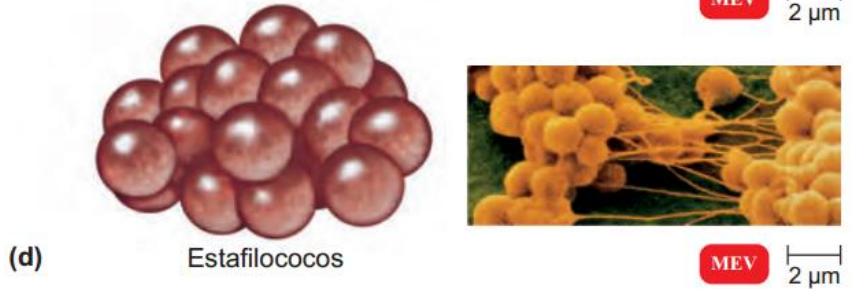
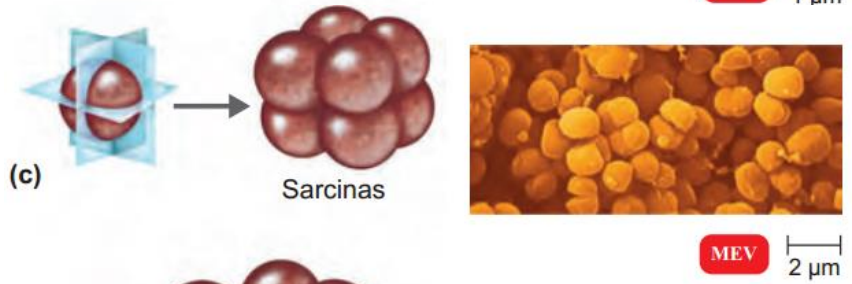
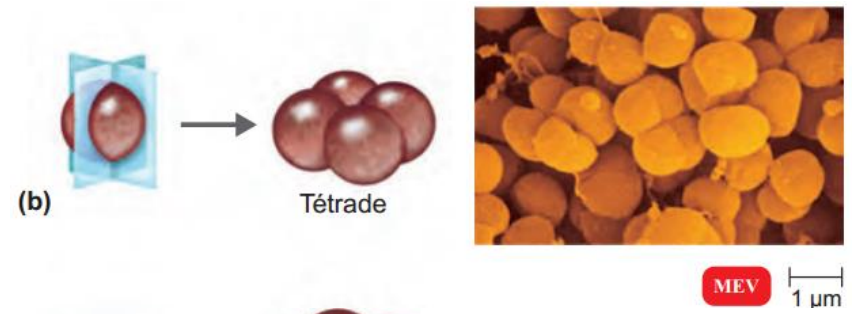
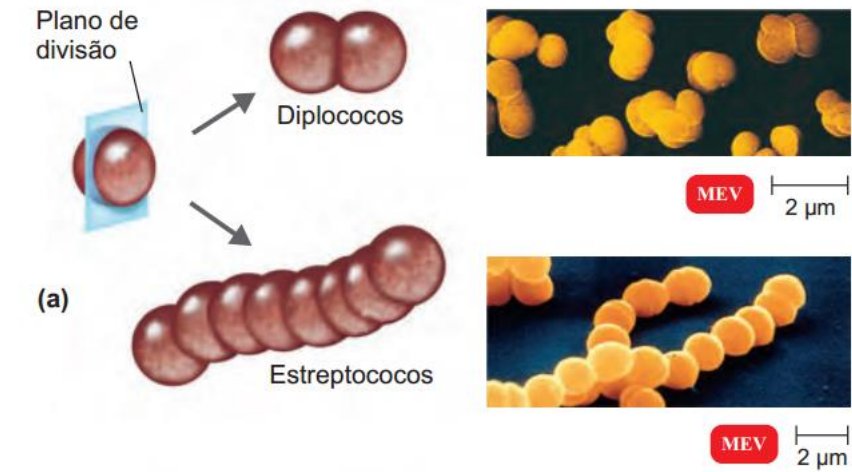
Espiroqueta



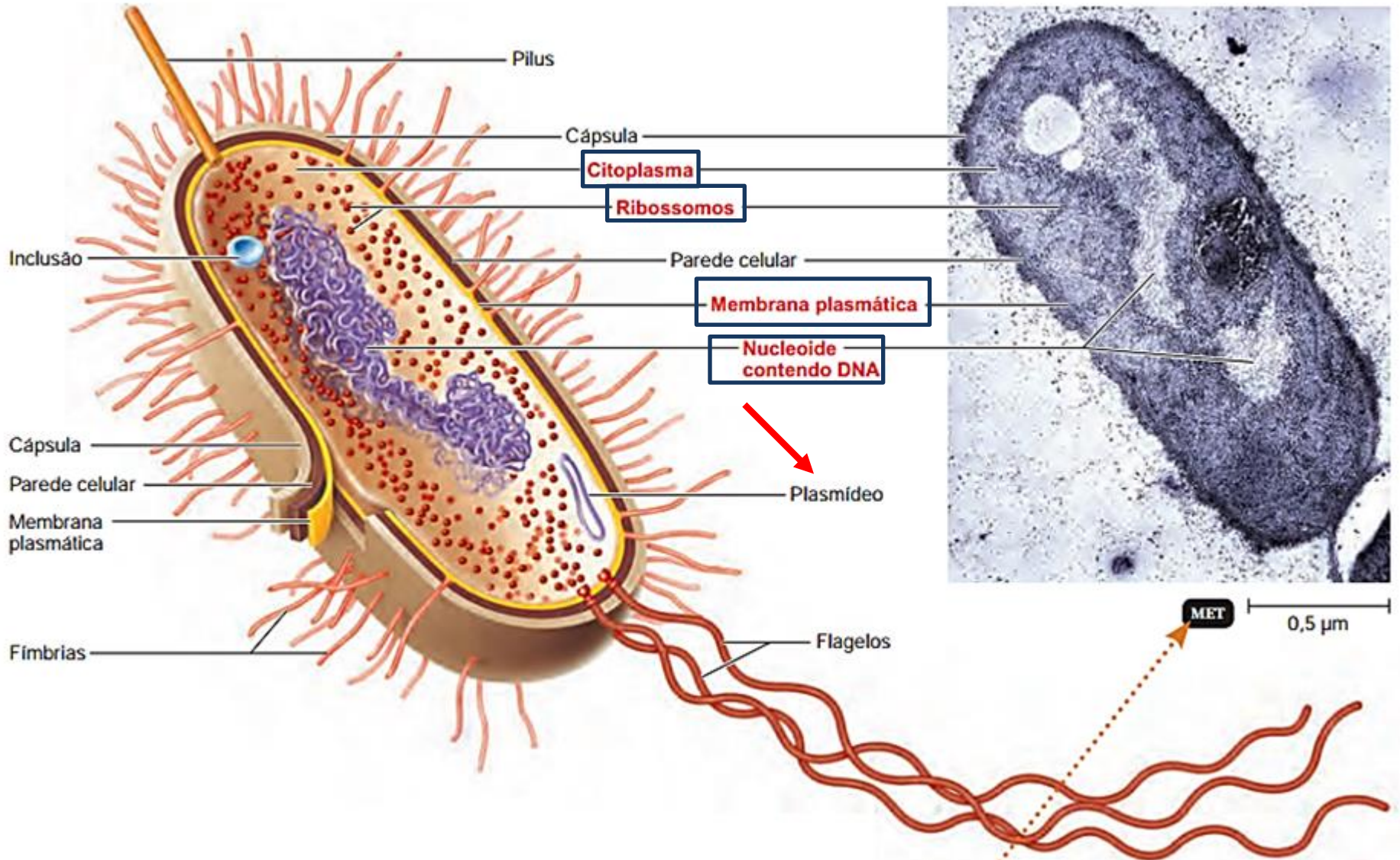
Brotamento e bactéria apendiculada



Bactéria filamentosa

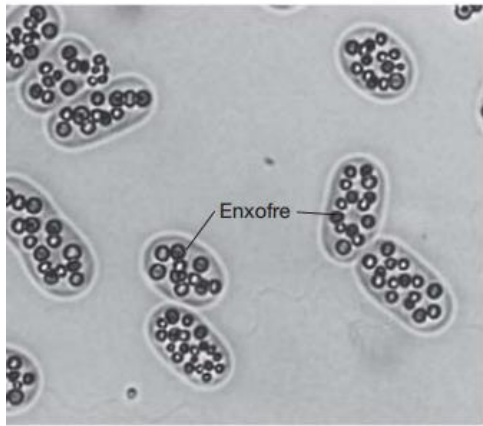


# Estrutura Celular de Bactérias

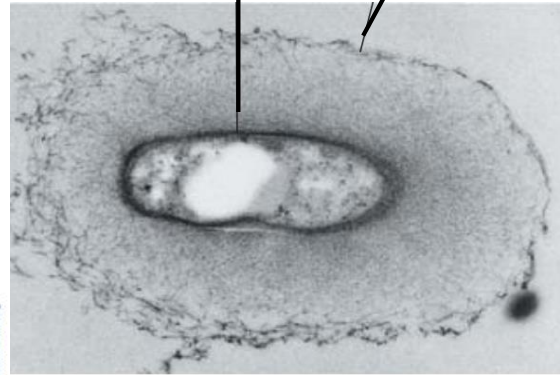


# Estruturas Bacterianas

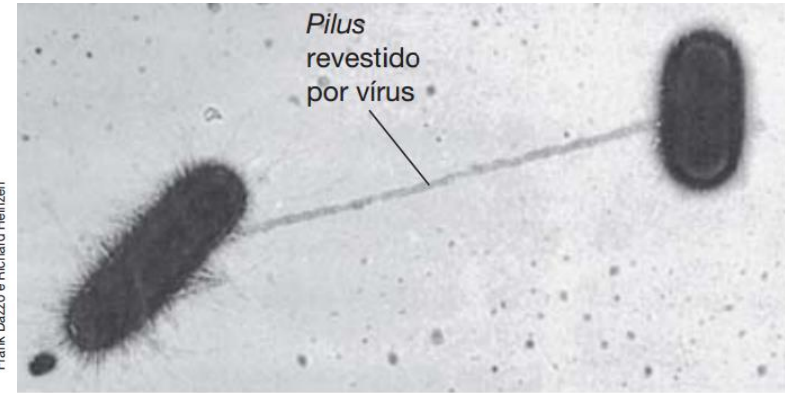
Inclusões



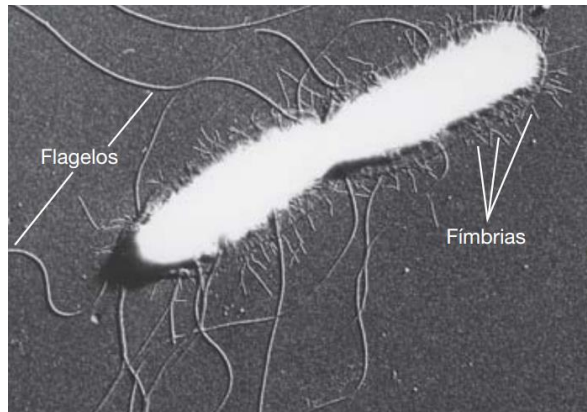
Célula Cápsula



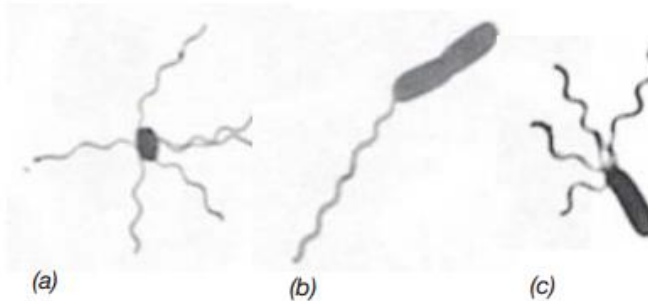
Pilus



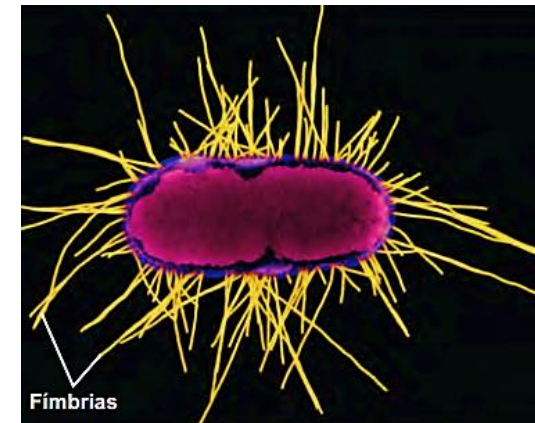
Flagelos



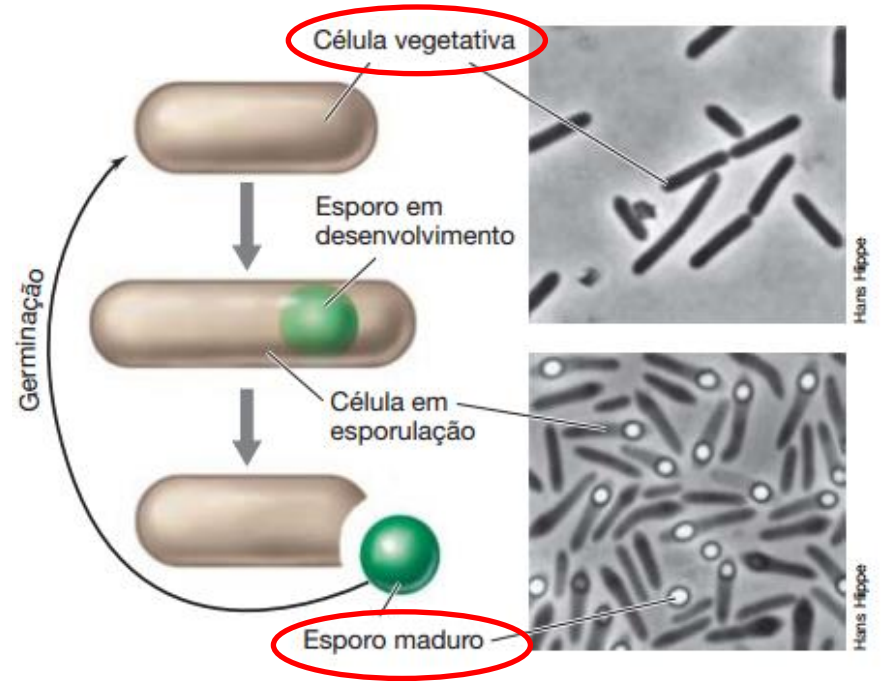
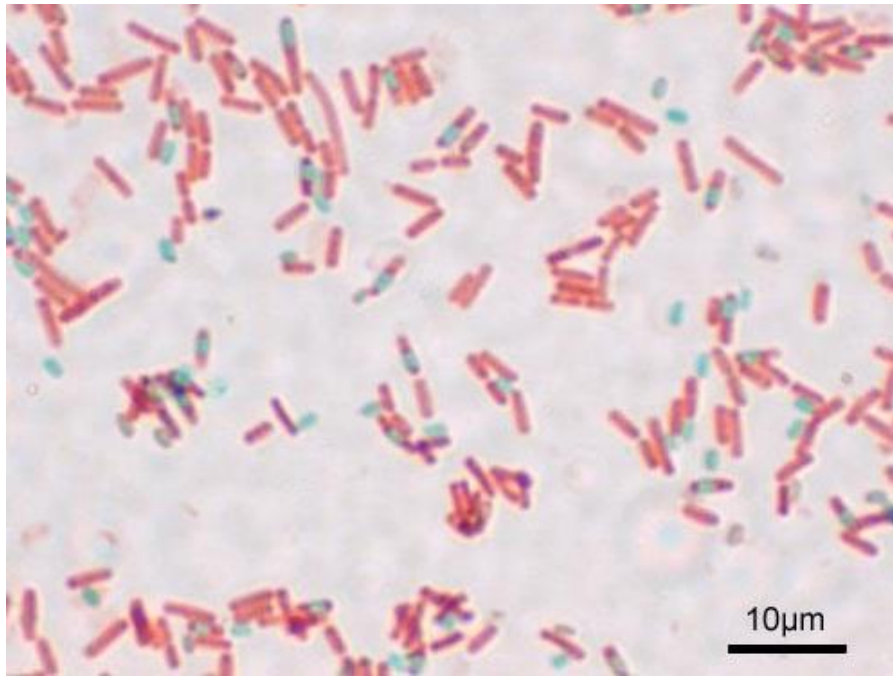
Flagelos



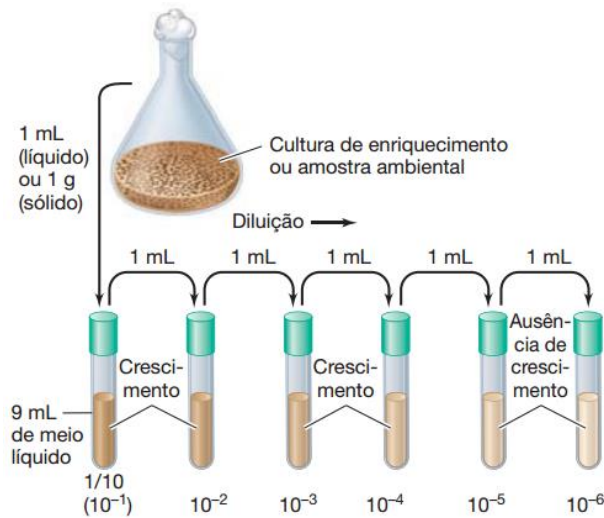
Fímbricas



# Endosporos

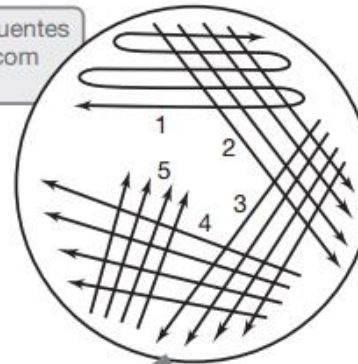


# Isolamento de micro-organismos



**Apenas 1% da microbiota é passível de crescer em meios sintéticos.**

As estrias subsequentes estão em ângulo com a primeira estria



Colônias isoladas ao final da sementeira

Crescimento confluinte no início da sementeira



**3.** Aspecto de uma placa bem-semeada após a incubação mostra colônias da bactéria *Micrococcus luteus* em uma placa de ágar-sangue

Colônias na superfície

**Placas ou tubos**

**1.** A alça é esterilizada e uma porção do inóculo é removida do tubo

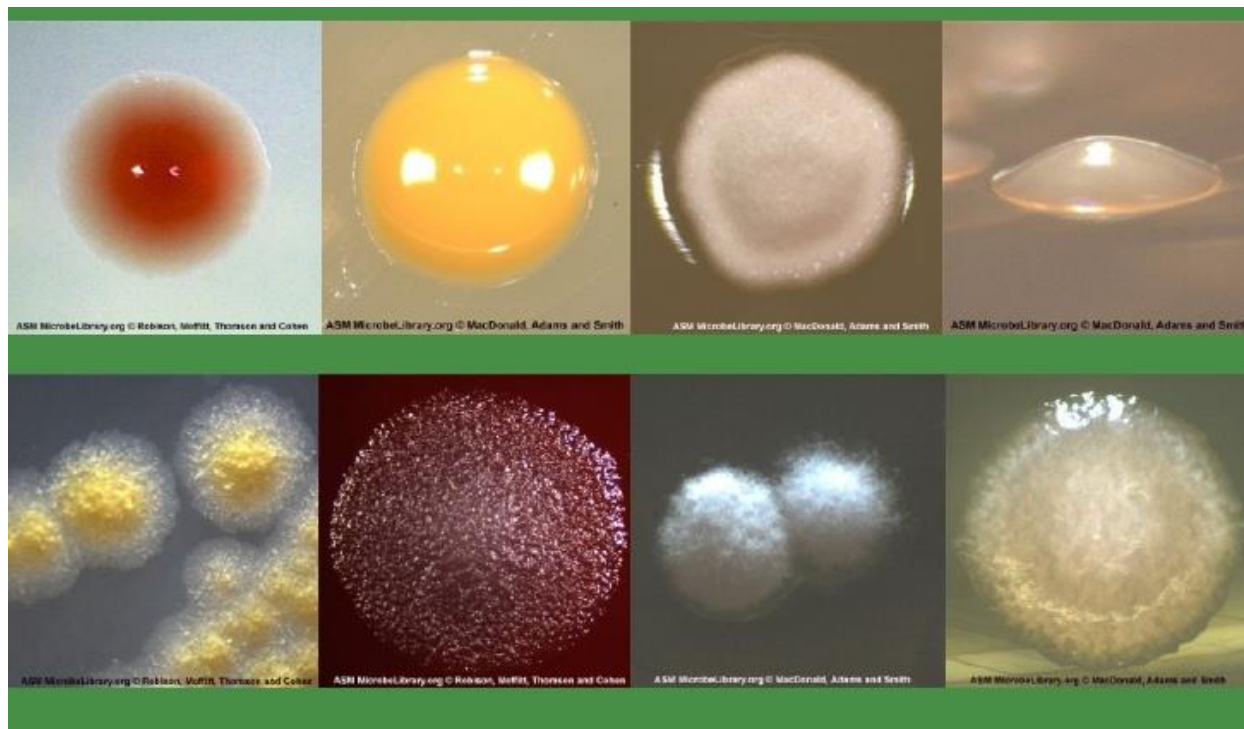
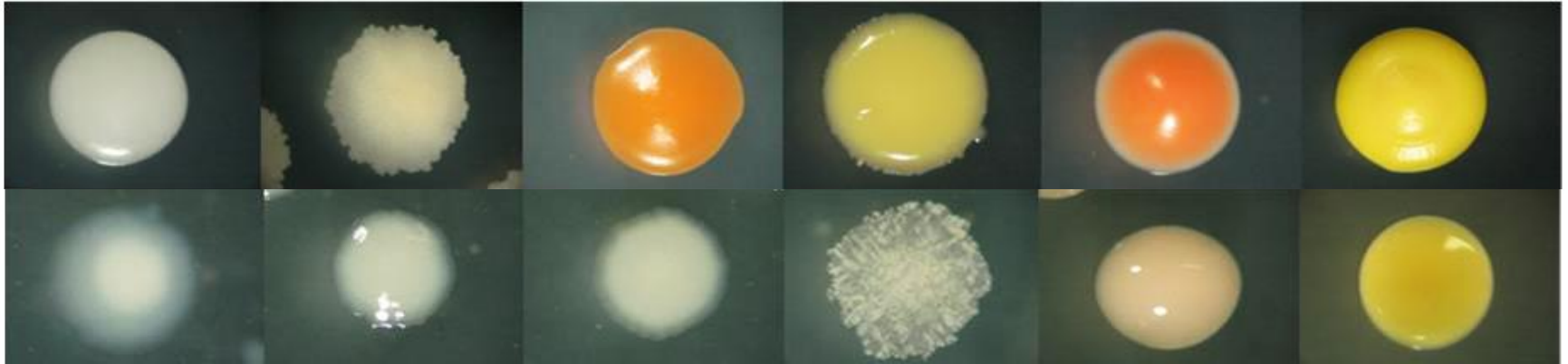
**2.** A sementeira inicial é realizada em uma porção da placa

**Sementeira por esgotamento**



# Características Fenotípicas

## Morfologia das colônias bacterianas

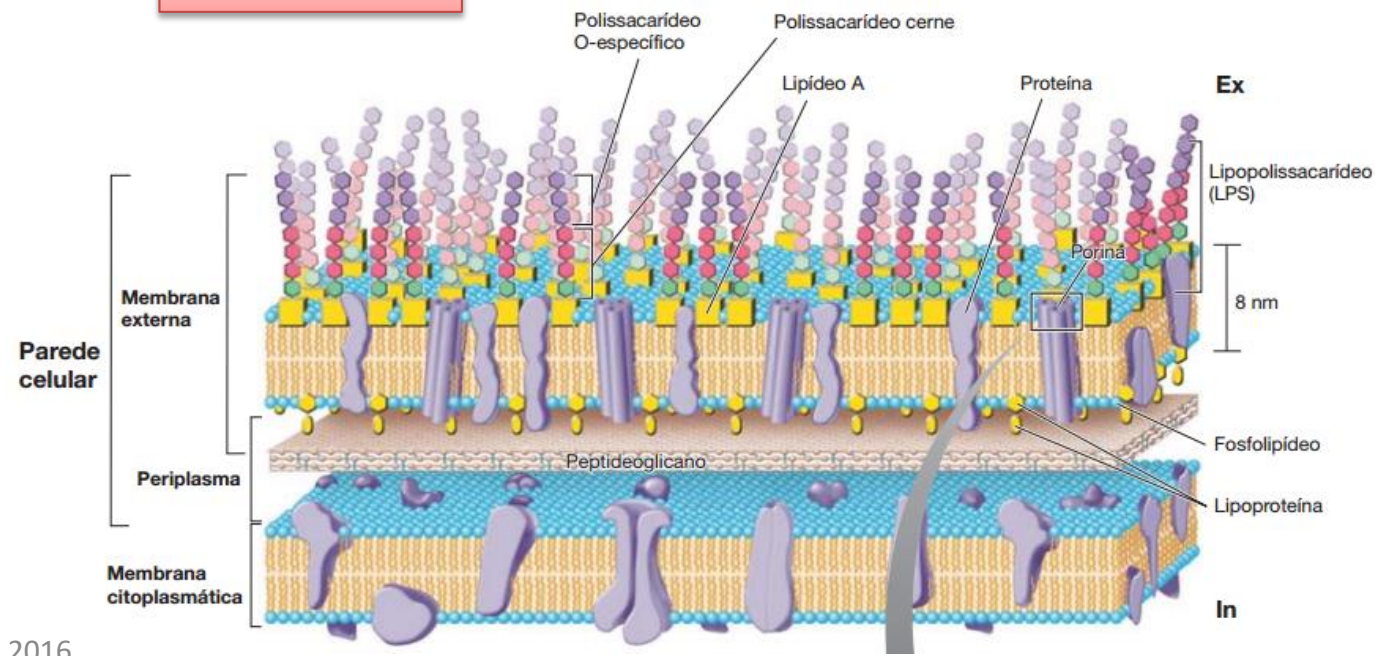
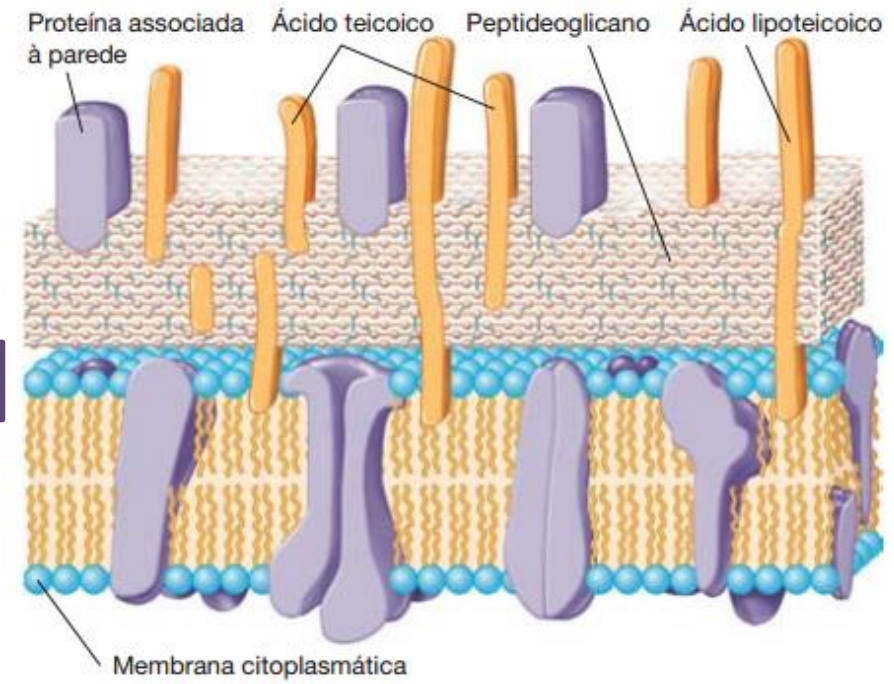


# Características Fenotípicas

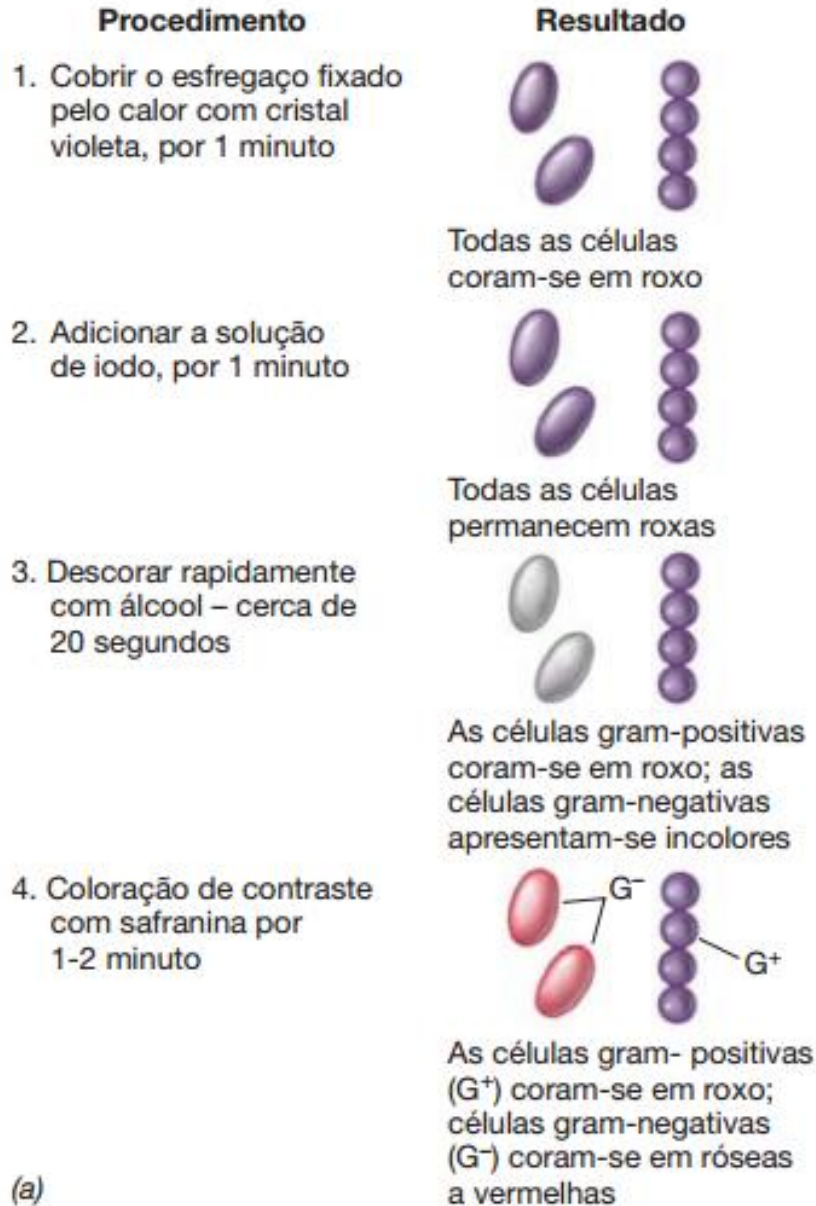
Composição da Parede Celular

GRAM +

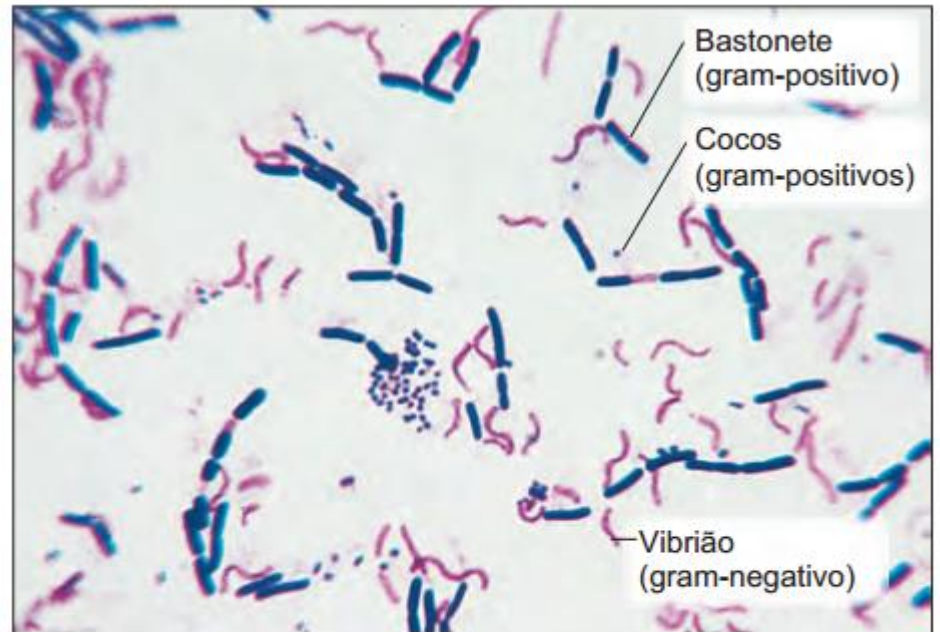
GRAM -



# Coloração de Gram (Christian Gram, 1884)



(a)



(b)

MO 5 µm

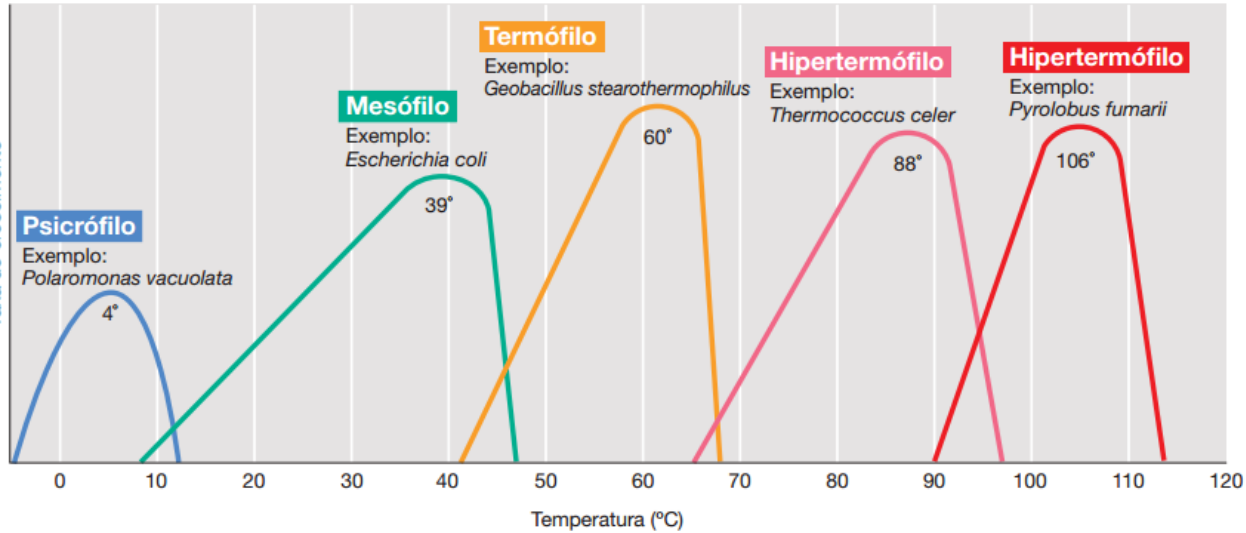
# Características Fisiológicas

- Temperatura
- pH
- Oxigênio
- Salinidade

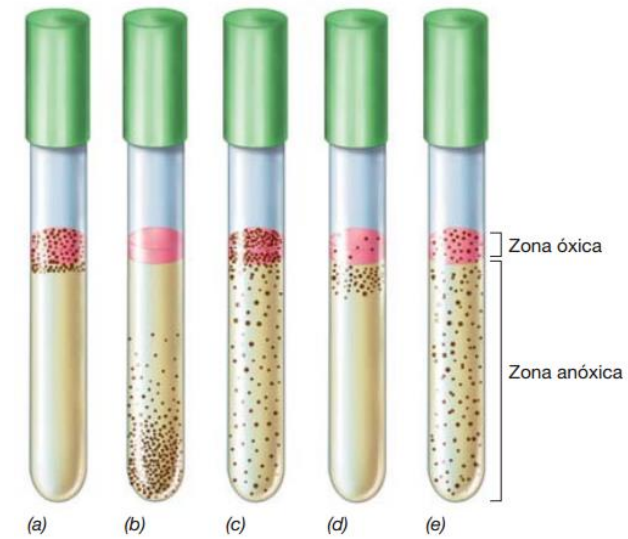
Fonte: Google imagens



## Temperatura



## Oxigênio (O<sub>2</sub>)

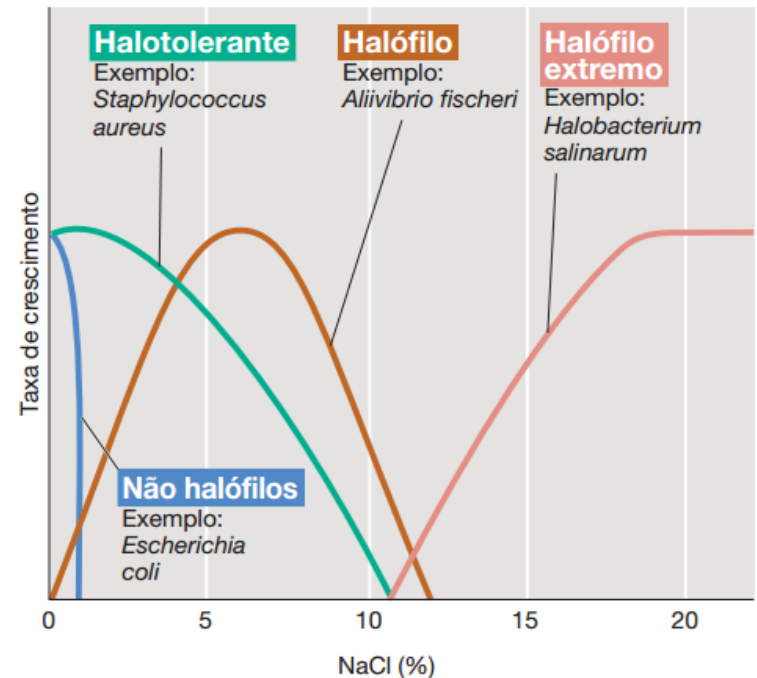


## pH

**Tabela 5.2** Relações dos microrganismos e pH

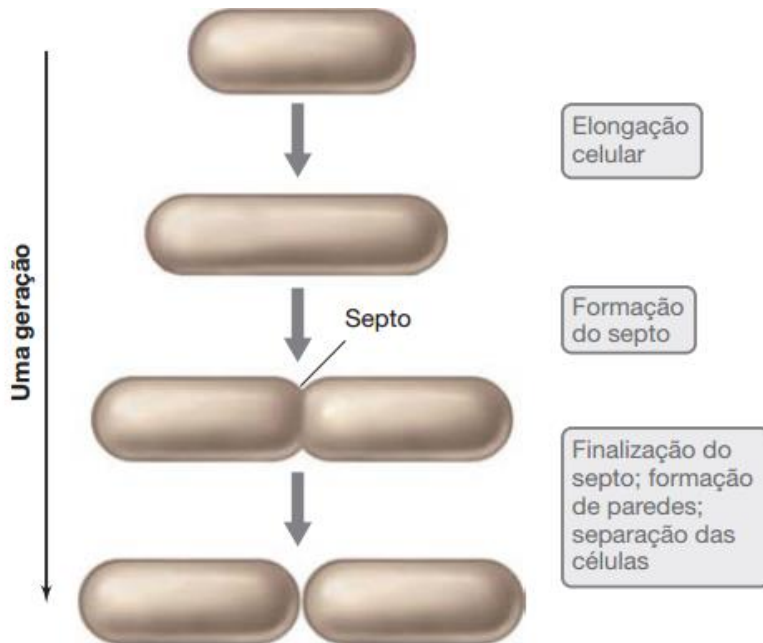
Classe fisiológica (faixa ótima)	pH aproximado para crescimento ótimo	Exemplo de organismo <sup>a</sup>
Neutrófilos (pH > 5,5 e < 8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidófilos (pH < 5,5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alcalifílicos (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

## Salinidade



# Divisão celular bacteriana

## FISSÃO BINÁRIA



**Figura 5.1** Fissão binária em um procarionte bacilar. O número de células duplica-se a cada geração.

## Número de gerações

$$N = N_0 2^n$$

$2^n$  = número de células, onde n é igual ao nº de duplicações (gerações) X número inicial de células = número final de células

## Tempo de geração

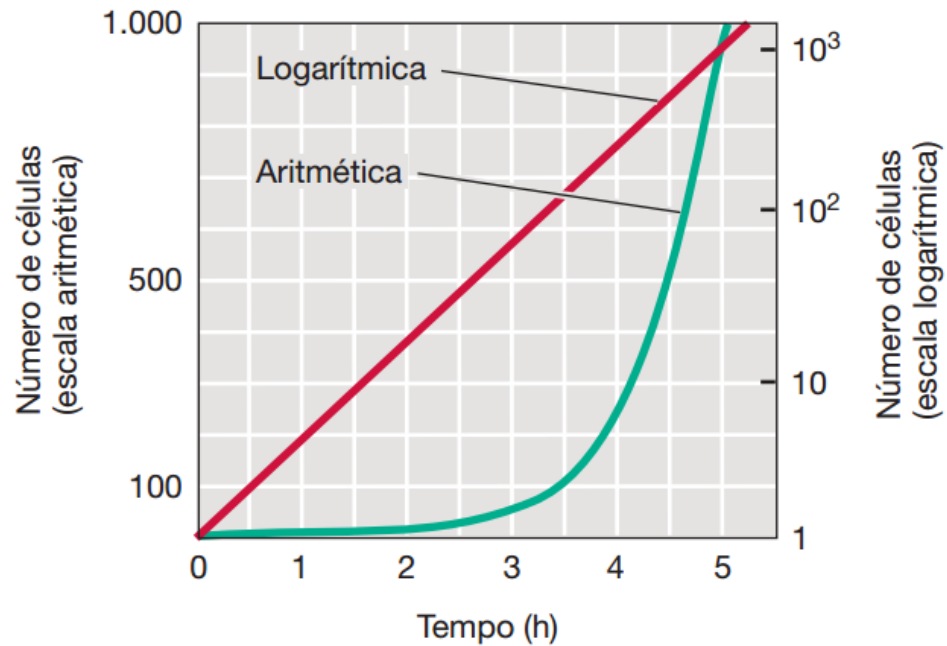
$$g = t/n$$

# Taxa de crescimento bacteriano

Tempo (h)	Número total de células	Tempo (h)	Número total de células
0	1	4	256 ( $2^8$ )
0,5	2	4,5	512 ( $2^9$ )
1	4	5	1.024 ( $2^{10}$ )
1,5	8	5,5	2.048 ( $2^{11}$ )
2	16	6	4.096 ( $2^{12}$ )
2,5	32	.	.
3	64	.	.
3,5	128	10	1.048.576 ( $2^{20}$ )

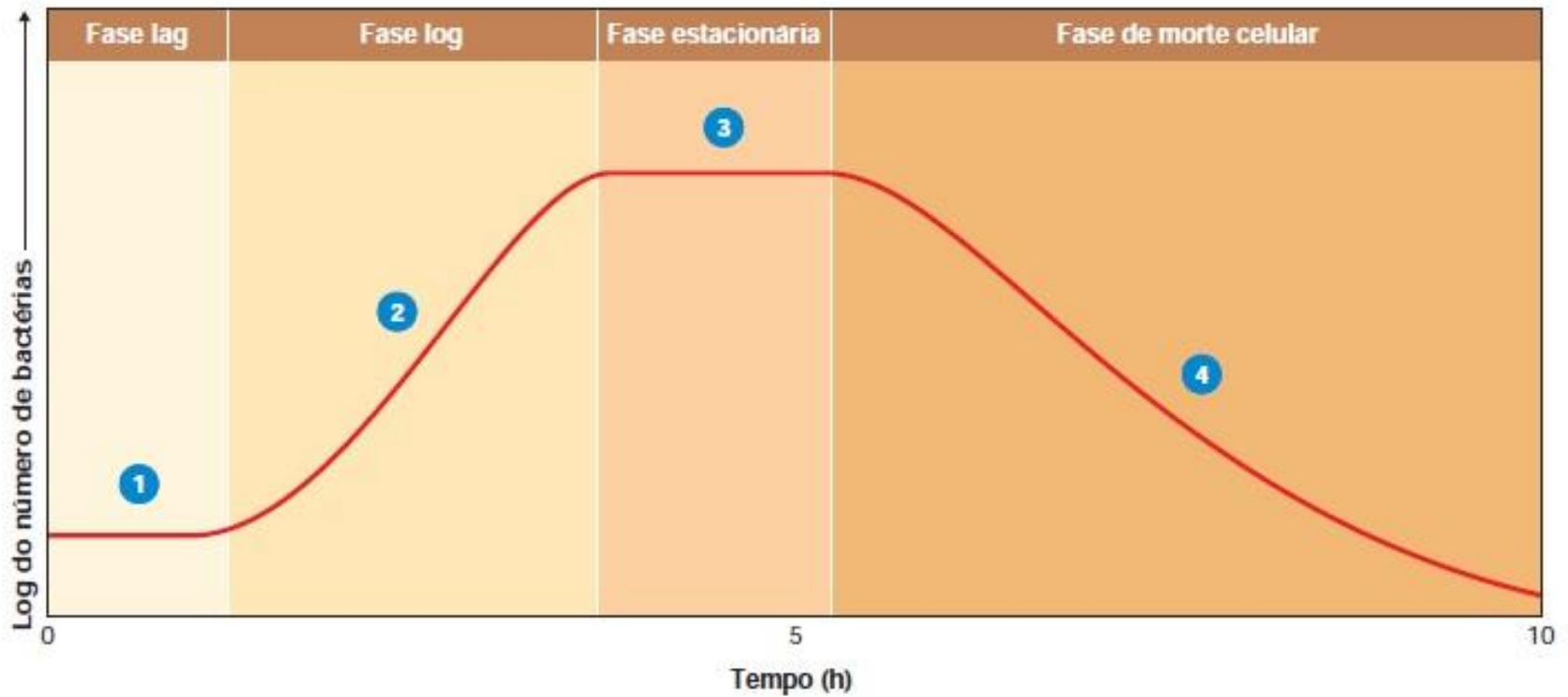
(a)

**Figura 5.9** Taxa de crescimento de uma cultura microbiana. (a) Dados de uma população que se duplica a cada 30 minutos. (b) Dados plotados em escalas aritmética (ordenada à esquerda) e logarítmica (ordenada à direita).



(b)

# Curva típica de crescimento bacteriano





# Cultivo bacteriano

## Crescimento em meios sólidos



## Crescimento em meios líquidos



Foto : <http://www.medicaexpo.com>

## Crescimento em meios semi-sólidos



Foto : <http://mercadodocacau.com>

## Crescimento de “não cultiváveis”

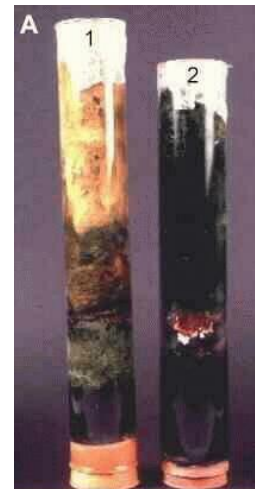


Foto:  
<http://archive.bio.ed.ac.uk>

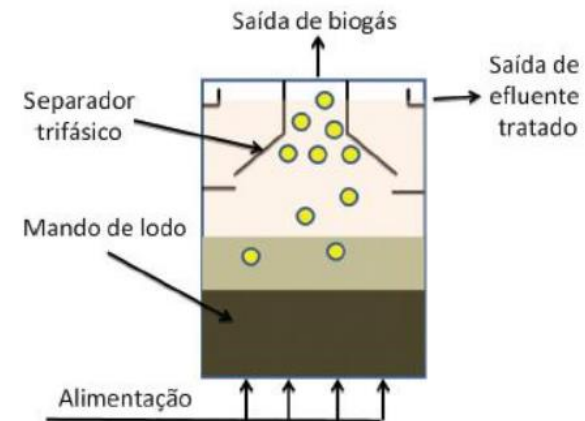
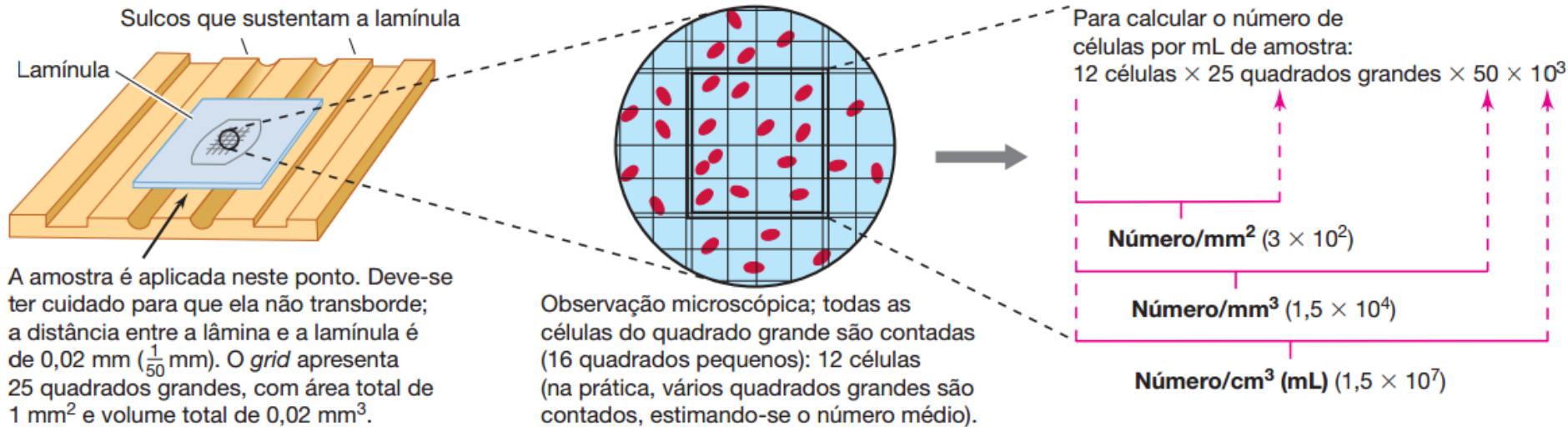


Foto:  
<http://www.revistatae.com.br>

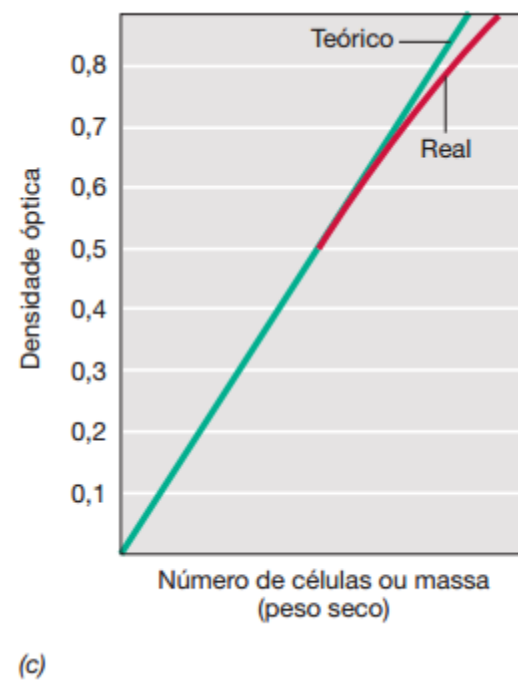
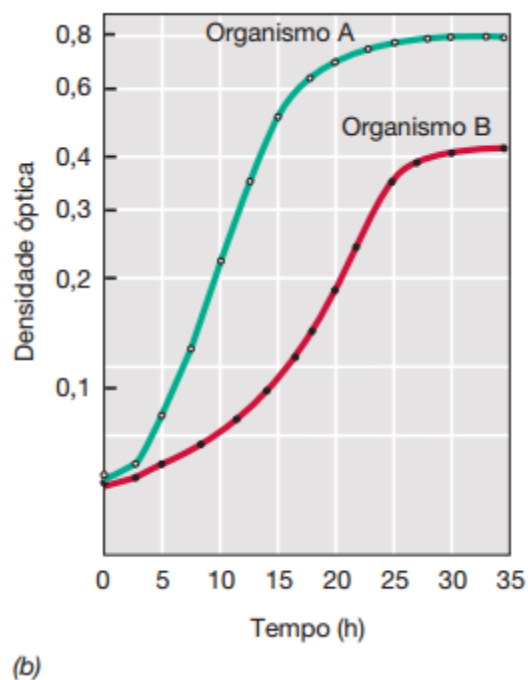
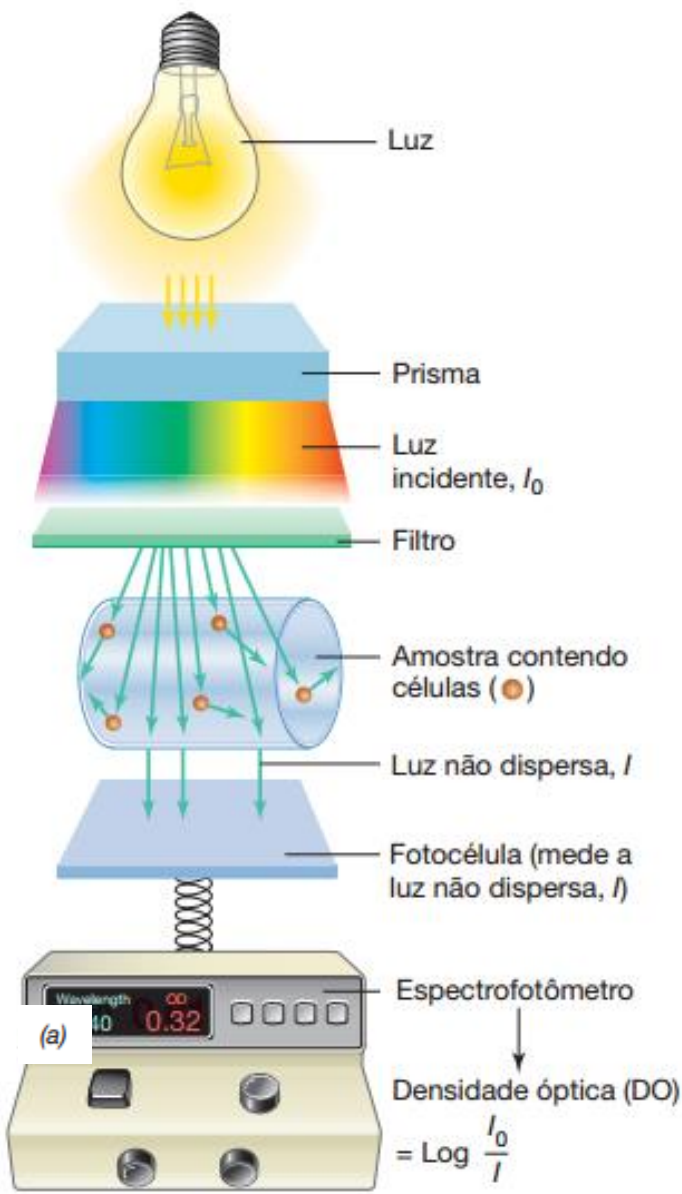
# Quantificação bacteriana

- Contagens microscópicas;
- Espectrofotometria;
- Contagem de células viáveis.



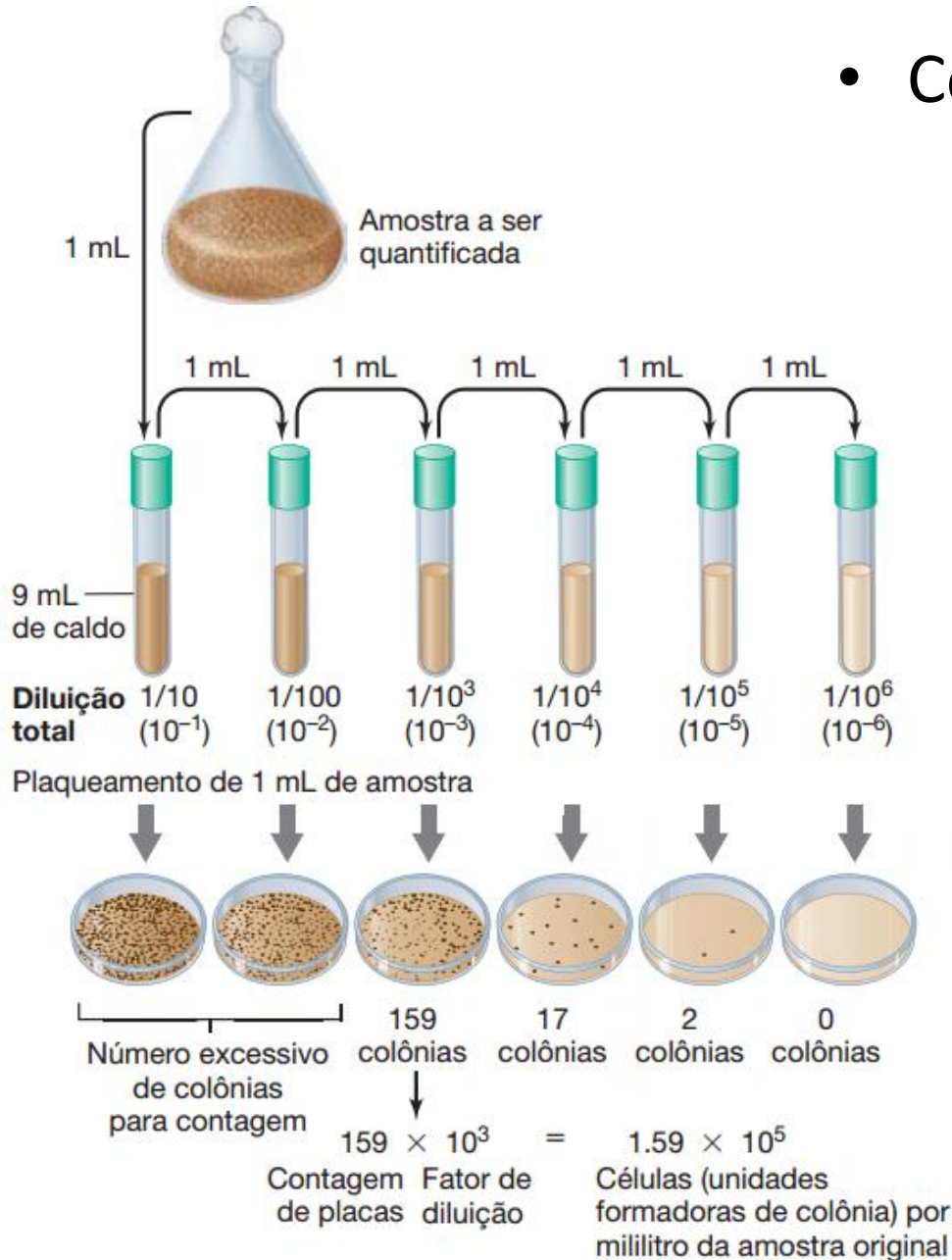
# Quantificação bacteriana

- Espectrofotometria



# Quantificação bacteriana

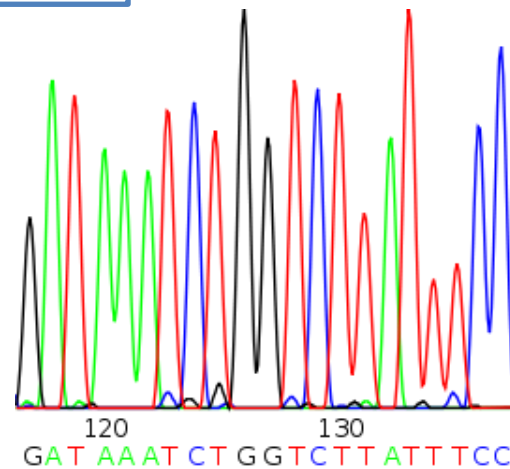
- Contagem de células viáveis



# Técnicas de Biologia Molecular



Metagenômica





# Aplicações comerciais dos micro-organismos



# Aplicações comerciais dos micro-organismos

- No século XX surgiram as modernas indústrias de biotecnologia;
- Alguns remédios vitais, como a insulina (curar diabetes), são produzidos por microorganismos geneticamente modificados;
- Produtos incluem antibióticos e outros remédios, enzimas, ingredientes e aditivos alimentícios, inclusive PROBIÓTICOS.



# Probióticos em Aquicultura no Brasil





# Aquicultura

Setor que mais cresce no MUNDO;



- Intensificação dos sistemas produtivos (equilíbrio ambiental e surgimento de doenças);
- Boas práticas de manejo e de ações preventivas são as principais estratégias para superar ou conviver com estes surtos;

Uso de antimicrobianos sintéticos

Seleção de micro-organismos resistentes

Transferência horizontal de genes

# Aquicultura

Uma estratégia promissora → Desenvolvimento de produtos eficazes e ambientalmente amigáveis.

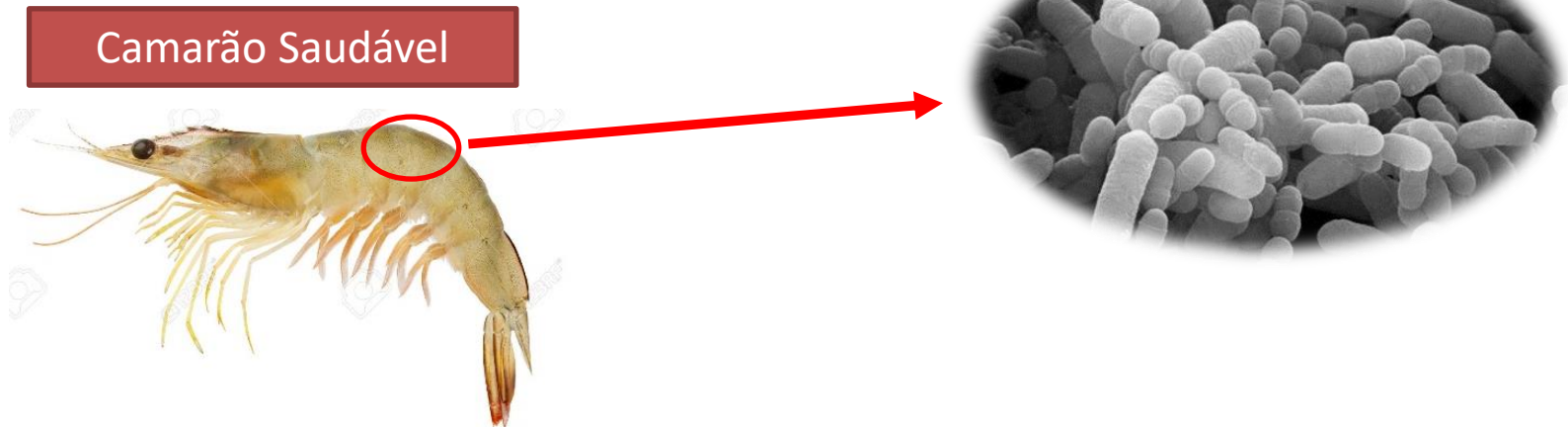
Probióticos: estratégia bastante utilizada e bem aceita



Muito usados no controle de micro-organismos patogênicos, uma vez que os probióticos promovem diversos benefícios que melhoram os parâmetros zootécnicos e o ambiente de cultivo.

# Probióticos

- Os probióticos são “Micro-organismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, FAO (2001);
- A microbiota no sistema digestivo pode ser manipulada alterando, regulando ou reforçando a microbiota de interesse para aumentar os benefícios positivos através de certas bactérias selecionadas;



- Existem diferentes definições de probióticos e alguns autores desconsideram a aplicação direta na água, no entanto, este conceito deve ser expandido quando se trata de animais aquáticos, devido a importância que um meio ambiente equilibrado tem sobre estes animais.

# Preparações Microbianas

Antagonistas de patógenos

Melhora a qualidade da água

Transitório ou residente do trato gastrointestinal

Gatesoupe (1999)

Moriarty (1998)

Incerto

Sim

Maeda *et al.* (1997)

Biocontrole

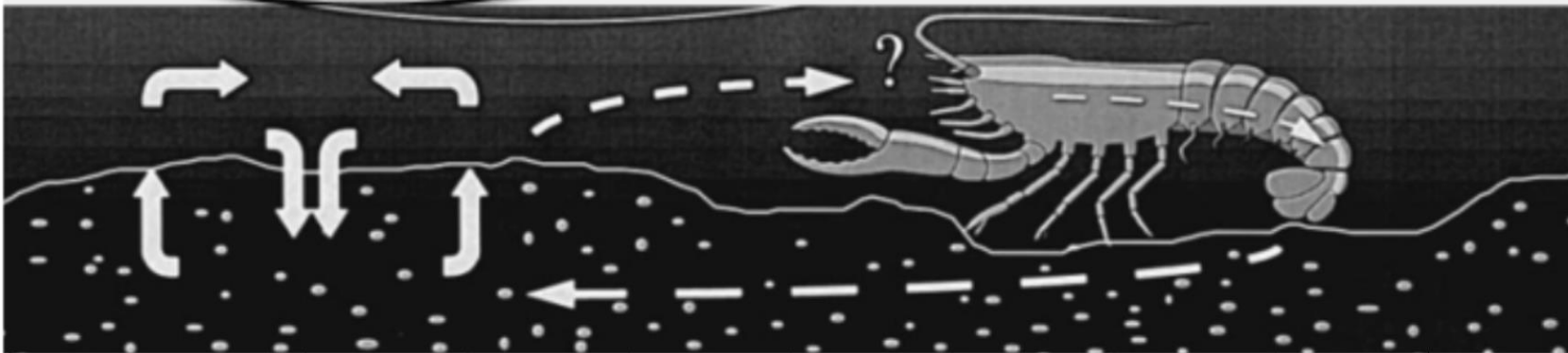
Probióticos

Prebióticos

Simbióticos

Preparações químicas

Biorremediador



# Conceito de Probiótico (Aquicultura)

(VERSCHUERE et al., 2000)

São micro-organismos vivos que tem um efeito benéfico sobre o hospedeiro, podendo ser capazes de:

- Modificar a microbiota (intestinal ou ambiental);
- Melhorar a absorção dos alimentos ou seu valor nutricional;
- Aumentar a resposta do hospedeiro em relação à doença;
- Melhorar a qualidade do ambiente de cultivo.

# Probióticos

---



## Efeitos na Nutrição

- Melhor absorção de nutrientes
- Melhor crescimento
- Liberação de Enzimas digestivas



## Efeitos na Qualidade de Água

- Reciclagem de Nitrogenados
- Redução de Matéria Orgânica
- Mineralização de nutrientes

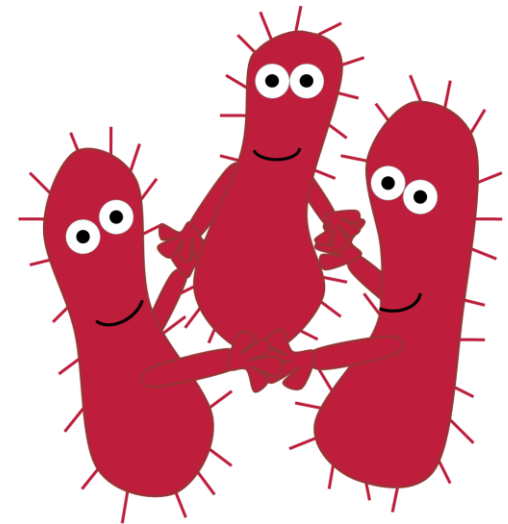


## Efeitos na Sanidade

- Exclusão competitiva
- Melhora da resposta imunológica
- Efeitos Antivirais
- Redução de Vibriose

# Micro-organismos Probióticos

- As linhagens de micro-organismos devem ser:
  - De ocorrência natural;
  - Autóctones ou alóctones;
  - Corretamente identificadas;
  - Não patogênicas;
  - Não modificados geneticamente (OGM);
- As formulações podem conter espécies únicas ou ser composta de consórcios microbianos.



# Consórcios microbianos

- Possuem diferentes espécies de micro-organismos com diferentes potenciais metabólicos.



- Os efeitos sinérgicos da utilização de consórcios microbianos despontam como uma ferramenta eficiente para aumentar o crescimento e otimizar a modulação do sistema imunológico dos animais frente a enfermidades.



# Micro-organismos usados em Probióticos em Aquicultura

- Bactérias ácido-láticas, tais como: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*.
- Bactérias gram-positivas formadoras de esporos de como: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii* e *B. megaterium*;
- Fungos, como é o caso das leveduras (principalmente espécies dos Gêneros *Saccharomyces*);
- Bactérias fotossintéticas e outros tipos de micro-organismos.

**Table 1**

Probiotics used in aquaculture acting on specific pathogens (updated from Ref. [79]. The pathogens controlled by the probiotics are given as Latin small letters.

Category of organism	Genus/groupings
Gram-positive bacteria	<i>Arthrobacter</i> (q, s), <i>Bacillus</i> (b, d, q, x), <i>Brevibacillus</i> (m), <i>Brochothrix</i> (a), <i>Clostridium</i> (b, n), <i>Carnobacterium</i> (n, r, x), <i>Enterococcus</i> (e, q, s), <i>Kocuria</i> (n, r), <i>Lactobacillus</i> (c, g, j, l), <i>Lactococcus</i> (n), <i>Leuconostoc</i> (g), <i>Microbacterium</i> (n), <i>Micrococcus</i> (b, c), <i>Pediococcus</i> (h, n), <i>Rhodococcus</i> (n), <i>Streptococcus</i> (q), <i>Streptomyces</i> (q, u), <i>Vagococcus</i> (n) and <i>Weissella</i>
Gram-negative bacteria	<i>Aeromonas</i> (a, c, g, l, w), <i>Agarivorans</i> , <i>Alteromonas</i> (p, t, v), <i>Bdellovibrio</i> (b), <i>Burkholderia</i> , <i>Citrobacter</i> (b), <i>Enterobacter</i> (f), <i>Neptunomonas</i> (p, t, v), <i>Phaeobacter</i> (n, s), <i>Pseudoalteromonas</i> (n, t, v), <i>Pseudomonas</i> (c, h, n, q), <i>Rhodobacter</i> (n), <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Roseobacter</i> (n), <i>Shewanella</i> (i), <i>Synechococcus</i> (q), <i>Thalassobacter</i> , <i>Vibrio</i> (c, n, q, x) and <i>Zooshikella</i> (l)
Non-bacterial candidates	
Bacteriophage	<i>Myoviridae</i> (k) and <i>Podoviridae</i> (k)
Microalgae (m, o, u)	<i>Dunaliellasalina</i> , <i>D. tertiolecta</i> , <i>Isochrysisgalbana</i> , <i>Navicula</i> , <i>Phaedactylumtricornutum</i> and <i>Tetraselmissuecica</i>
Yeast	<i>Debaryomyceshanseni</i> , <i>Phaffiarhodozyma</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (b, l), <i>S. exiguus</i> and <i>Yarrowialipolytica</i>

Pathogens: a → *A. bestiarum*, b → *A. hydrophila*, c → *A. salmonicida*, d → *Edw. ictaluri*, e → *Edw. tarda*, f → *F. psychrophilum*, g → *Lc. Garvieae*, h → *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, i → *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, j → *Ps. fluorescens*, k → *Ps. plecoglossicida*, l → *Streptococcus* sp./*St. iniae*, m → *Vibrio* spp., n → *V. anguillarum*, o → *V. campbellii*, p → *V. coralliilyticus*, q → *V. harveyi*, r → *V. ordalii*, s → *V. parahaemolyticus*, t → *V. pectenocida*, u → *V. proteolyticus*, v → *V. splendidus*, w → *V. tubiashii*, x → *Y. ruckeri*.

Akhter, N. et al, 2015

Bactérias utilizadas como probióticos na carcinicultura e seu modo de ação			
Bactéria	Ação	Espécie de Camarão	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	Aumento do crescimento	<i>L. vannamei</i>	FAR et al, 2009; LI et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al 2007a;2007b; TSENG et al, 2009
	Aumento na digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2009
	Aumento da sobrevivência	<i>L. vannamei</i>	FAR et al, 2009
	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	TSENG et al, 2009
<i>Bacillus sp.</i>	Aumento da resposta imune	<i>L. vannamei</i>	RENGPIPAT et al.,2000; Gullian 2004; LI et al 2009
	Aumento na resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>P. monodon</i>	RENGPIPAT et al.,1998,2000;
	Melhora na microbiota Intestinal	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2009 Gullian 2004; LI et al 2009
	Aumento da sobrevivência	<i>L. vannamei</i> <i>F. indicus</i>	WANG et al.,2005; ZIAEI-NEJAD et al, 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>L. vannamei</i>	WANG et al.,2005;
	Aumento na digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	LIN et al.,2004;
	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>F. indicus</i>	ZIAEI-NEJAD et al, 2006
	Aumento na atividade de enzimas digestivas	<i>F. indicus</i>	ZIAEI-NEJAD et al, 2006
<i>B. fusiformis</i>	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>L. vannamei</i> <i>F. indicus</i>	GUO et al, 2006
<i>Bacillus coagulans</i>	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>L. vannamei</i>	ZHUO et al, 2009
	Aumento na atividade de enzimas digestivas	<i>L. vannamei</i>	ZHUO et al, 2009
<i>Bacillus licheniformis</i>	Melhora na microbiota intestinal	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2007
	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2007
<i>Bacillus pumilus</i>	Aumento na sobrevivência na larvicultura	<i>P. japonicus</i>	EL-SERSY et al, 2006
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al, 2008
	Aumento da sobrevivência	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al, 2008
	Aumento das defesas antioxidantes	<i>L. stylirostris</i>	CASTEX et al, 2008

Fonte: Vieira, 2010.

<i>Lactobacillus sp</i>	Aumento na resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	PERAZA-GOMES et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>P. monodon</i>	PHIANPHAK et al, 1999
	Aumento do crescimento	<i>P. monodon</i>	PHIANPHAK et al, 1999
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	CHIU et al, 2007
	Aumento da digestibilidade	<i>L. vannamei</i>	BUGLIONE NETO et al, 2009
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	CHIU et al, 2007
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aumento do crescimento	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
<i>Lactobacillus sporogenis</i>	Aumento do crescimento	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
	Diminuição na conversão alimentar	<i>M. rosenbergii</i>	VENKAT et al, 2006
<i>Arthobacter sp</i>	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	LI et al, 2008
	Inibição in vitro de patógenos	<i>F. chinensis</i>	LI et al, 2006
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>F. chinensis</i>	LI et al, 2006
<i>Streptomicis sp</i>	Aumento do crescimento	<i>P. monodon</i>	DAS et al, 2006
<i>Micrococcus sp</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>M. rosenbergii</i>	JAYAPRAKASHI et al, 2005
<i>Vibrio fluvialis</i>	Aumento da sobrevivência	<i>P. japonicus</i>	EL-SERSY et al, 2006
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Aumento na resistência a infecção viral	<i>L. vannamei</i>	RODRIGUEZ et al, 2007
	Aumento na resposta imune	<i>L. vannamei</i>	GULLIAN et al, 2004
	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al, 2007a
<i>Roseobacter gallaeciensis</i>	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al, 2007b
<i>Pseudomonas aestumarina</i>	Aumento na resistência a infecção bacteriana	<i>L. vannamei</i>	BALCAZAR et al, 2007b
<i>Streptococcus phocae</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>P. monodon</i>	SWAIN et al, 2009
<i>Enterococcus faecium</i>	Inibição in vitro de patógenos	<i>P. monodon</i>	SWAIN et al, 2009

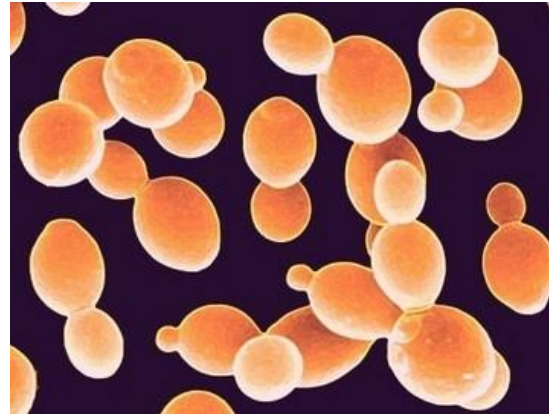
Fonte: Vieira, 2010.

# Probióticos

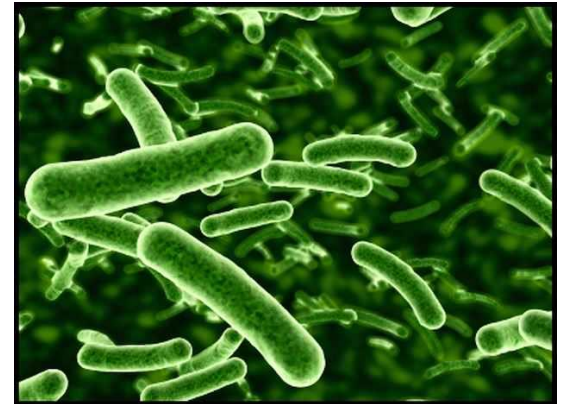
- O que considerar?
  - Número de espécies;
  - Concentração bacteriana;
  - Uso de cepas isoladas ou consórcios;
  - Descrição das espécies;
  - Estratégias de utilização;
  - Cuidados no manuseio.



*Bacillus* - Biorreciclagem,  
foco qualidade de água.



*Saccharomyces* (Levedura)  
foco em nutrição.



*Lactobacillus* - Imunidade,  
foco em sanidade.

# Micro-organismos presentes no Sistema de Cultivo



## Microalgas (Fotoautotróficas).

- Produzem seu próprio alimento.
- Precisam de Luz para fotossíntese.
- Consomem nitrato e produzem oxigênio.



## Bactérias Heterotróficas (aeróbicas, anaeróbicas ou facultativas)

- Não produzem seu próprio alimento.
- Consomem Matéria Orgânica e Nitrogênio.



## Bactérias Quimioautotróficas

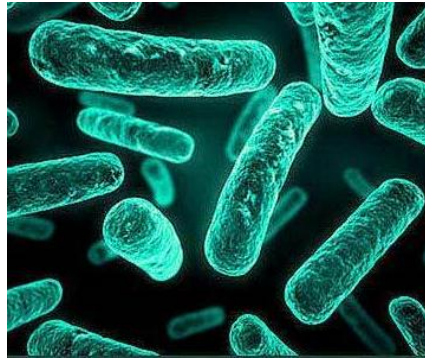
- Produzem seu próprio alimento.
- Ciclo do Nitrogênio (*Nitrobacter*, *Nitrospira*)
- Mineralização de nutrientes para as Algas.

# Importância de saber as espécies utilizadas

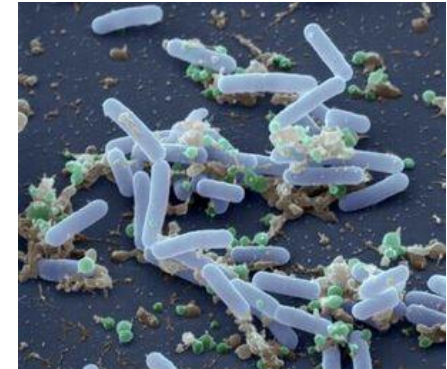
*Bacillus subtilis*



*Bacillus licheniformis*



*Bacillus pumilus*

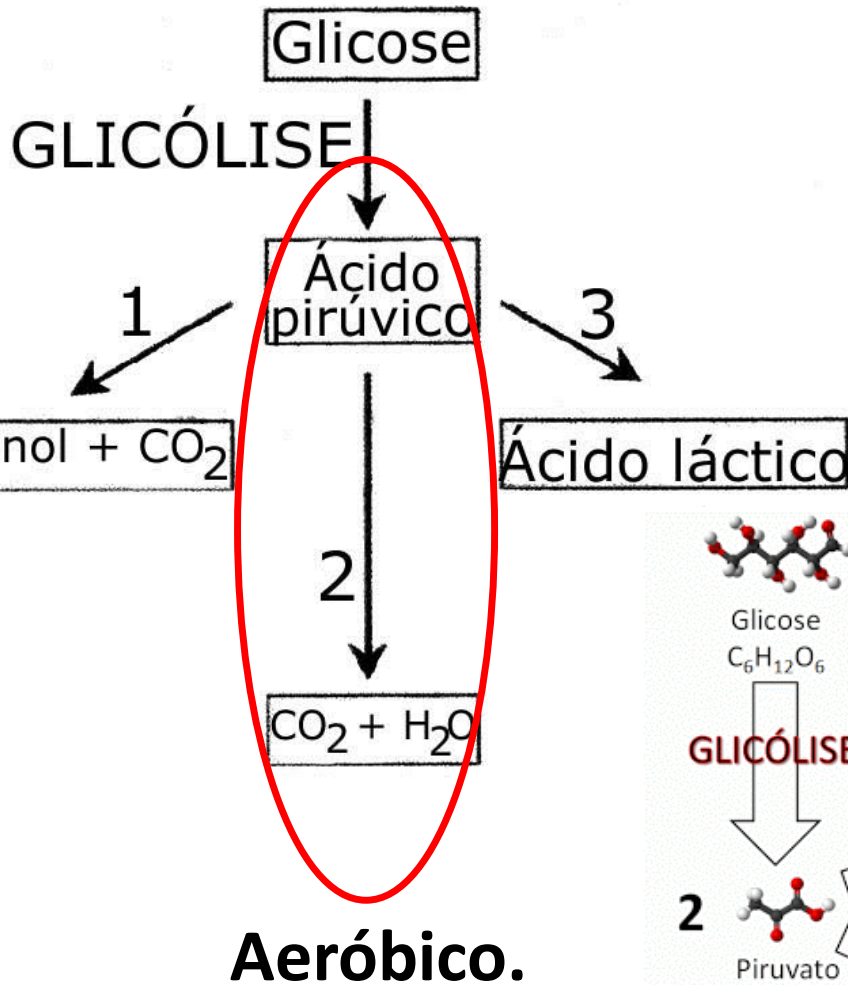


- Não patogênica (heterotrófica)
- Gram-positiva.
- Aeróbica.
- Realiza a Reciclagem.
- Produz enzimas
- Decomposição.
- Limita bactérias nocivas

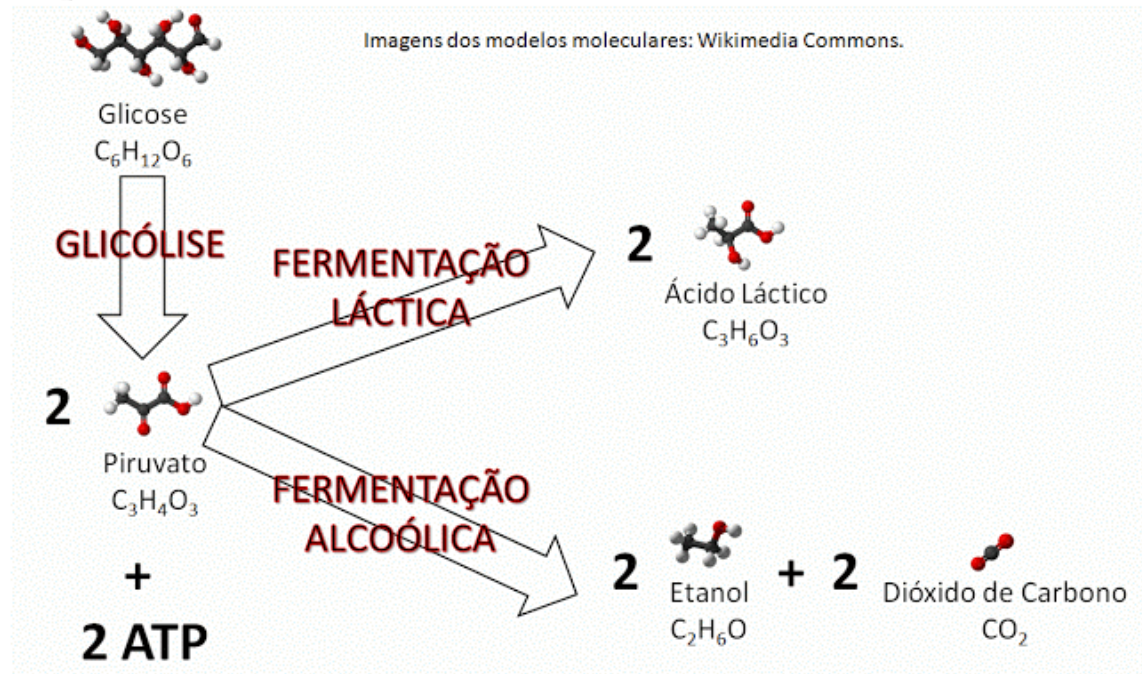
***Atenção a utilização de Bacillus Cereus.***

**Estas também são as principais espécies usadas em Bioflocos**

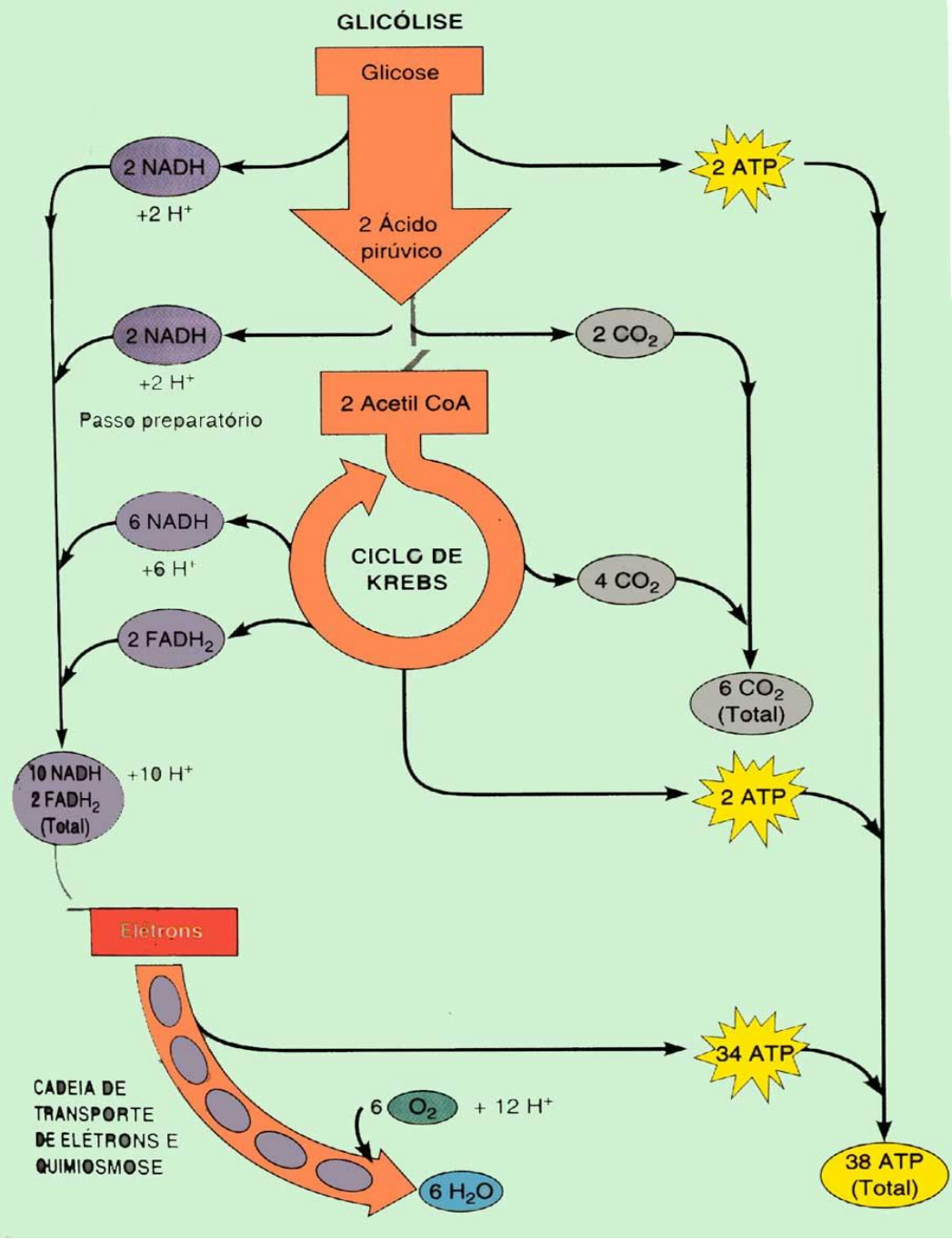
# Vias de Oxidação de Carboidratos



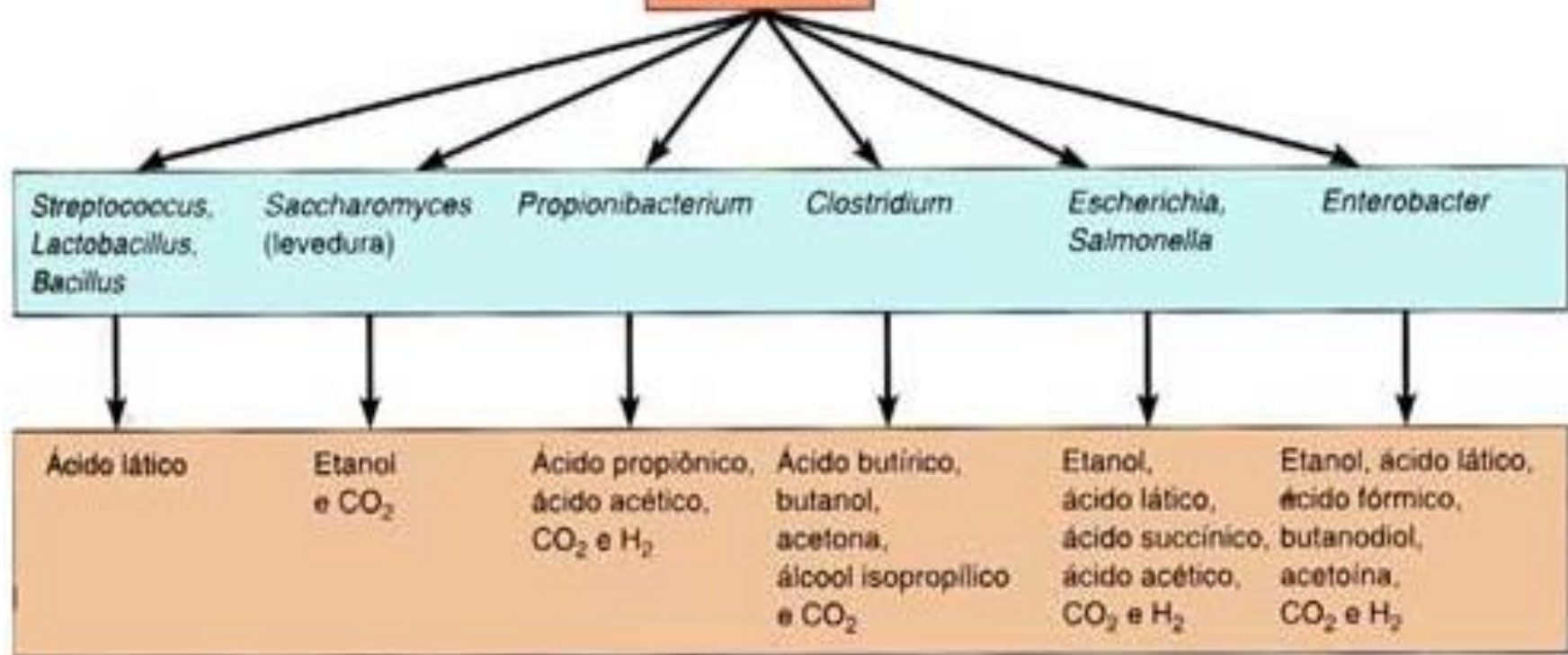
**Anaeróbicos.**

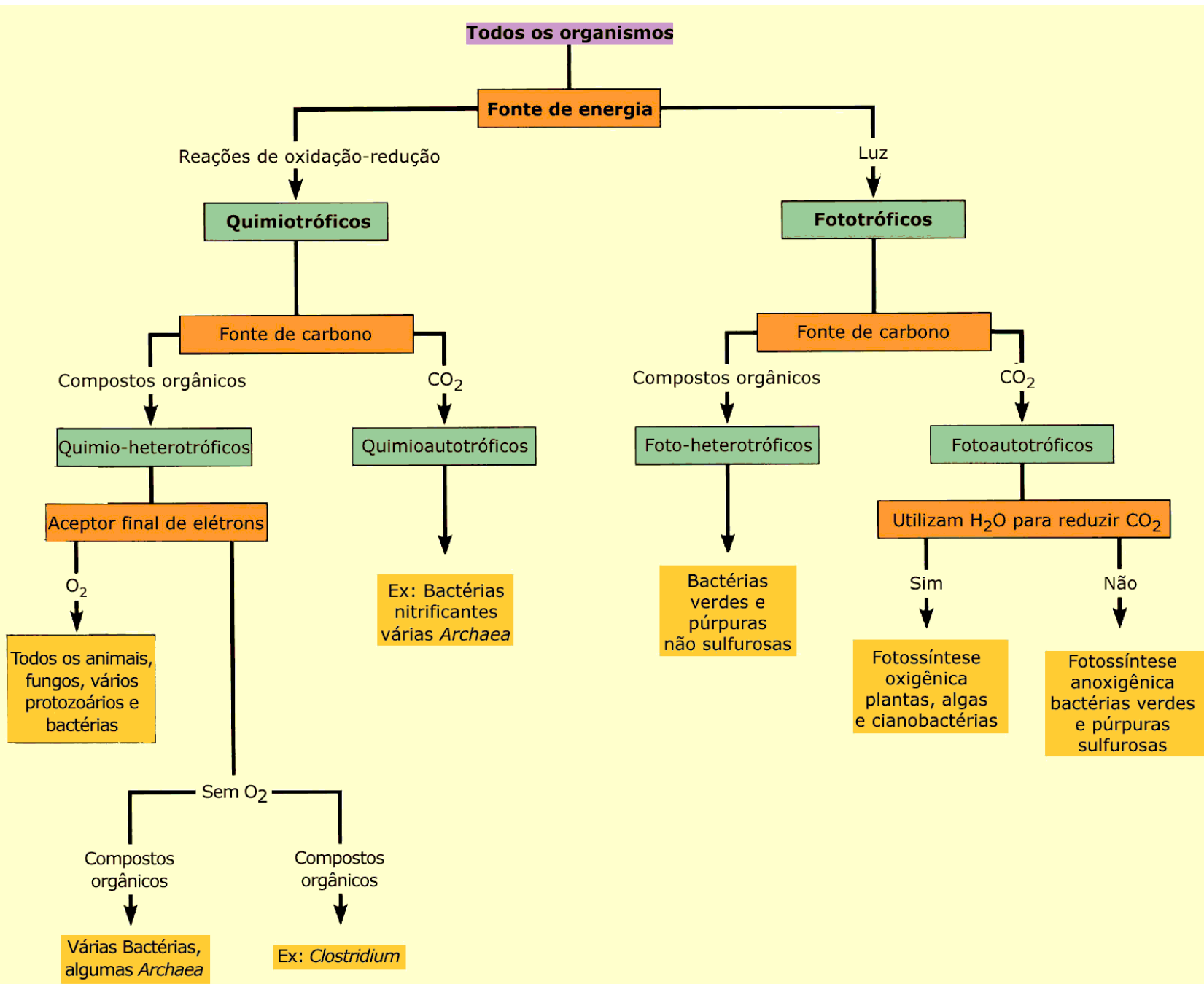






**Ácido Pirúvico**





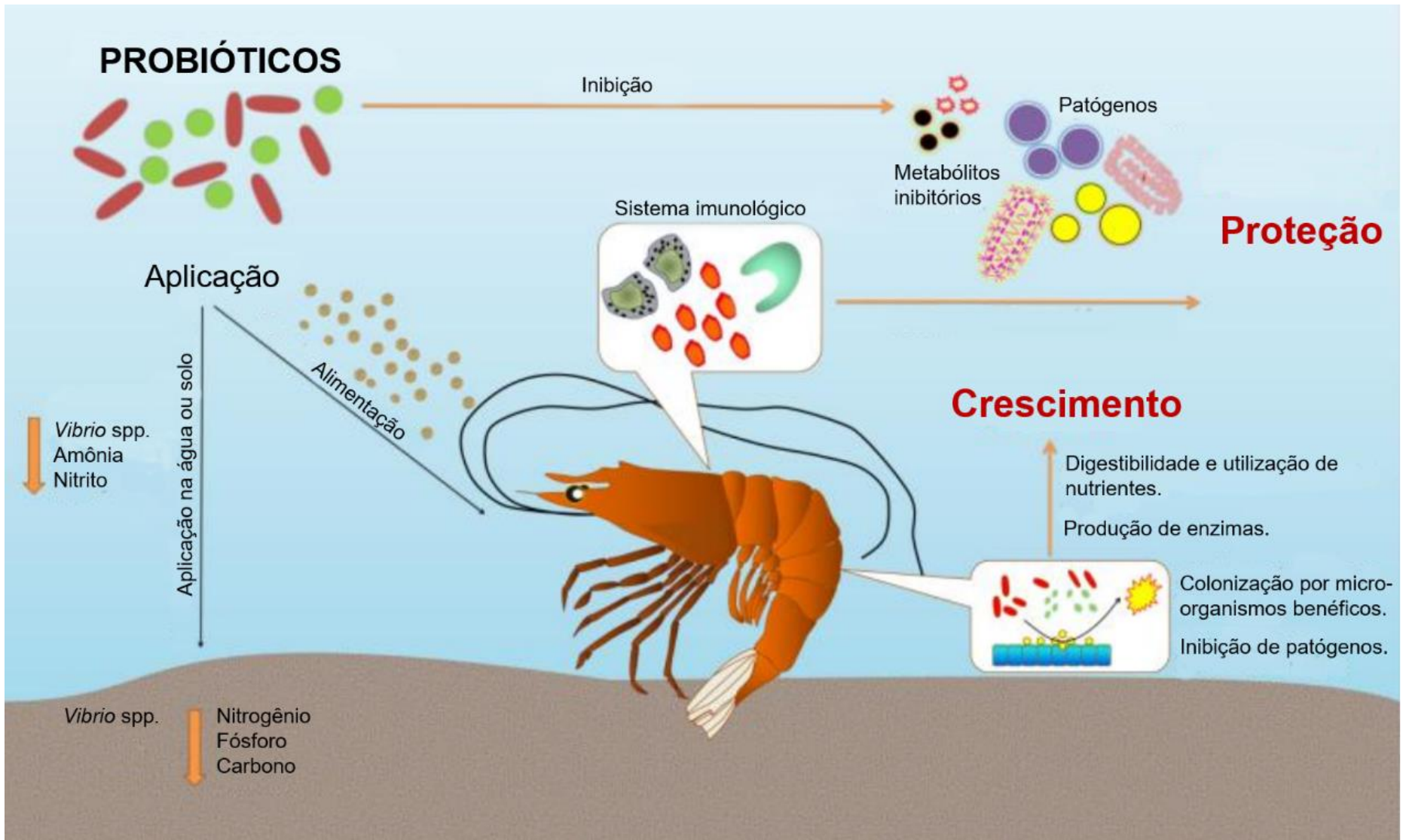
# Principais produtos registrados como Probióticos



# Mecanismos de ação dos Probióticos

- Atuam modificando a composição das comunidades microbianas nos ambientes onde são inseridos;
- O efeito da aplicação de probióticos não está relacionado a um único mecanismo;
- Resultam da utilização tanto na alimentação como na água e no solo, ou mesmo da combinação de ambos;
- Probióticos no trato digestivo proporciona uma proteção adequada para prevenir a dominância de micro-organismos prejudiciais à saúde do animal;
- A microbiota do trato digestório de animais aquáticos bem como as comunidades ambientais são passíveis de modificação através da aplicação de probióticos.

# Mecanismos de ação dos Probióticos



# Mecanismos de ação dos Probióticos

---

Exclusão competitiva de bactérias patogênicas

Produção de enzimas digestivas (crescimento e absorção de nutrientes)

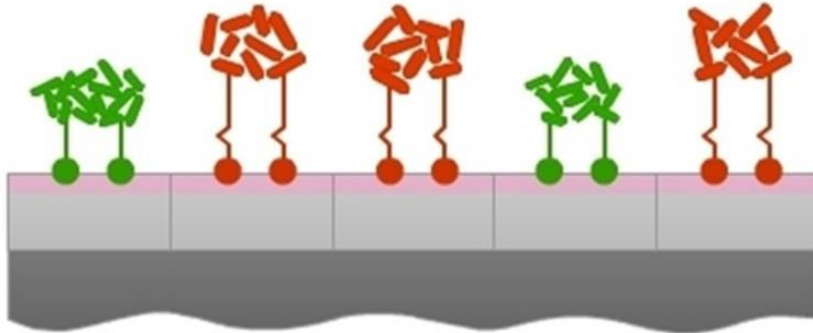
Modulação da resposta imune intestinal

Tratamento ambiental

# Mecanismos de exclusão competitiva

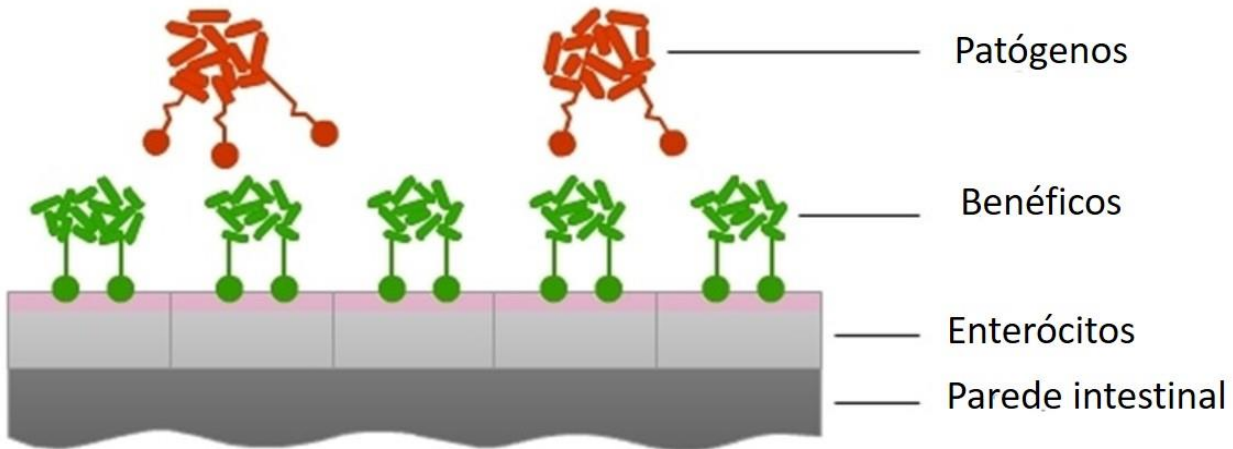
1

Bactérias ocupando sítios de ligação no intestino.



2

Bactérias probióticas competindo e assegurando sítios de ligação.



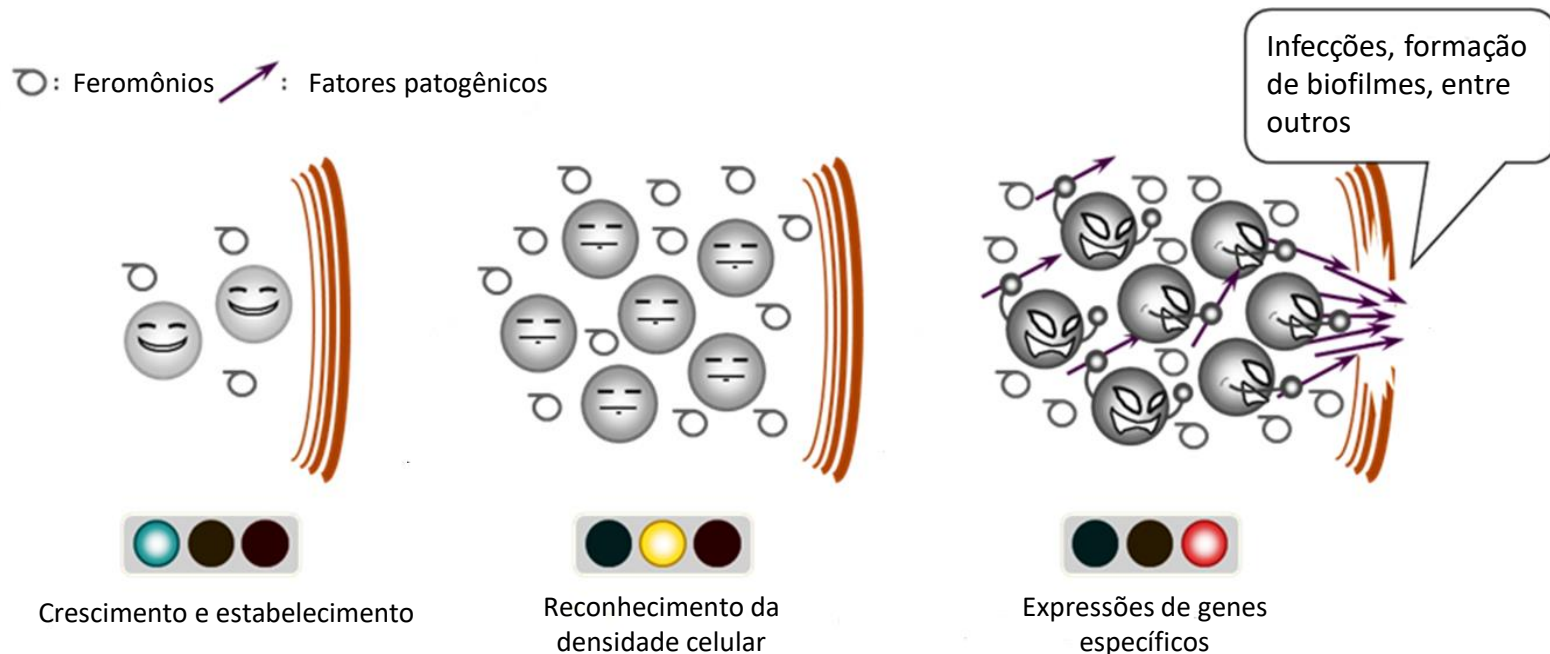


# Mecanismos de exclusão competitiva

- **(1)** criação de um microambiente hostil às outras espécies de bactéria, através da produção de ácidos orgânicos (propiónico, acético, butírico, láctico), peróxidos de hidrogénio e de outras moléculas;
- **(2)** ocupação dos sítios receptores por bactérias benéficas, o que dificulta a adesão e o estabelecimento de comunidades microbianas patogênicas no epitélio intestinal;
- **(3)** competição por nutrientes, causando indisponibilidade de nutrientes para os agentes patogénicos;
- **(4)** produção de substâncias que agem de forma antagonista ao mecanismo de comunicação celular (*quorum sensing*);
- **(5)** produção de metabólitos antimicrobianos com efeitos bactericidas ou bacteriostáticos, usualmente peptídeos (bacteriocinas, lisozimas, etc) ou enzimas com atividade bacteriolítica, que são ativos contra outros micro-organismos patogénicos.

# Quorum sensing (Sensor de quorum)

➤ Comunicação intra e interespecíes dependente da densidade populacional. Permite a detecção da concentração de moléculas específicas determinantes para o comportamento dos micro-organismos e para a regulação da expressão gênica.



**Expressão de genes dependente da densidade celular em quorum sensing .**

**Ex.: Expressão de fatores de virulência como de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio Harvey*.**

# ***Quorum sensing* (Sensor de quorum)**

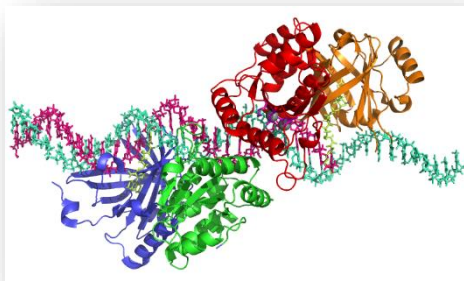
- Determina processos celulares de colonização de novos ambientes, de formação de biofilmes, de produção de fatores de virulência, de produção de bacteriocinas, de formação de esporos, dentre outros.
- Bactérias probióticas podem ser capazes de atrapalhar esta comunicação celular (*quorum sensing*) e de modular as comunidades microbianas patogênicas nos sistemas de aquicultura.

# Produção de metabólitos antimicrobianos



- As espécies ácido-lácticas presentes em produtos probióticos como, por exemplo, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Pediococcus acidilactici*, despontam como potenciais candidatas para produção de peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas).
- Nos últimos anos, vários estudos têm relatado a produção dessas moléculas também por bactérias do gênero *Bacillus*, como por exemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, dentre outros.

# Crescimento e absorção de nutrientes

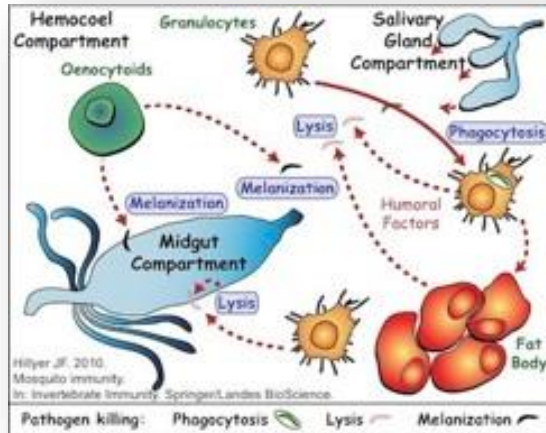


- Incremento no ganho de peso e maior comprimento corporal
- Produção de enzimas microbianas e estimulação da produção de enzimas endógenas do animal  
(Destaque: Proteases)
- Aumento do apetite;
- Melhor digestibilidade dos alimentos;
- Otimização da absorção de nutrientes e minerais;
- Melhores fatores de conversão alimentar

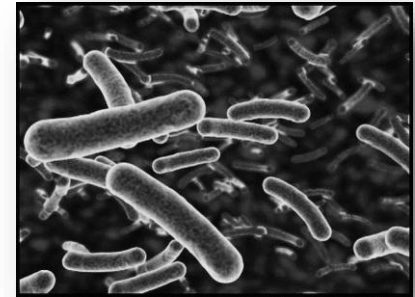
$$(FCA) = \frac{\text{Consumo total da ração}}{\text{Ganho de peso no tanque}}$$

# Modulação da resposta imune

O camarão possui apenas sistema imune inato



Estimulado por probióticos



Mecanismo parcialmente elucidado

- Aumento no número de hemócitos;
- Aumento de espécies reativas de oxigênio;
- Melhor atividade da fenoloxidase;
- Maior fagocitose hemocítica

Ativação e transcrição de vários genes relacionados com imunidade



# Modulação da resposta imune



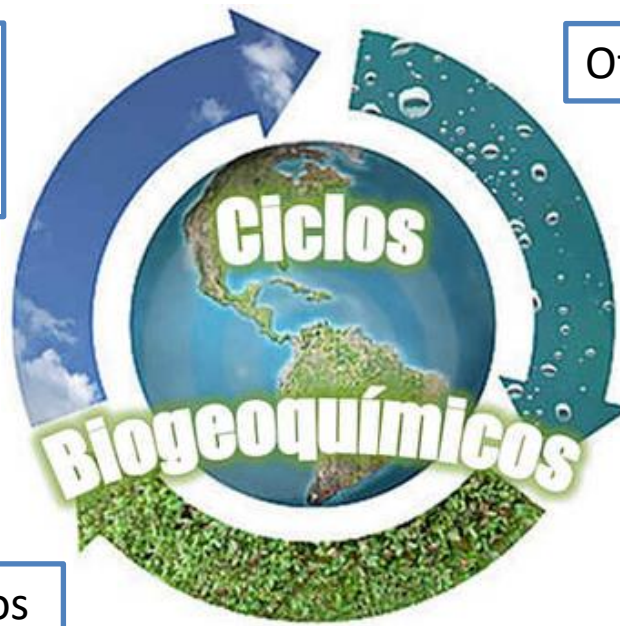
- Chiu et al., 2007 demonstraram que a utilização de *L. plantarum* na alimentação influenciou as defesas imunológicas celulares e aumentou as atividades de fenoloxidase, profenoloxidase, superóxido dismutase e a eficiência na supressão de *Vibrio alginolyticus*. A utilização de *L. plantarum* também aumentou a transcrição de mRNA de peroxinectina e a taxa de sobrevivência dos animais após o desafio com *V. alginolyticus*.
- É importante ressaltar que o tratamento com probióticos não só aumenta as defesas antioxidantes do camarão, mas também pode aliviar o estresse oxidativo induzido pela exposição a patógenos.

# Qualidade ambiental

- Os parâmetros físico-químicos e a atividade biológica do solo e da água nos sistemas produtivos são cruciais para o sucesso de um cultivo. Eventuais problemas com infecções podem estar relacionados à baixa qualidade ambiental
- Os micro-organismos probióticos no ambiente são capazes de ocupar vários nichos ecológicos

Favorecer o correto funcionamento dos ciclos biogeoquímicos

Otimizar as cascatas microbianas



Otimizar a ciclagem de resíduos orgânicos e de dejetos que contaminam a água

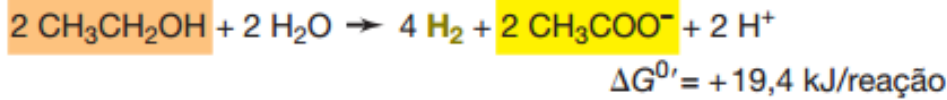
Controlar micro-organismos patogênicos



# Qualidade ambiental

## Sintrofia

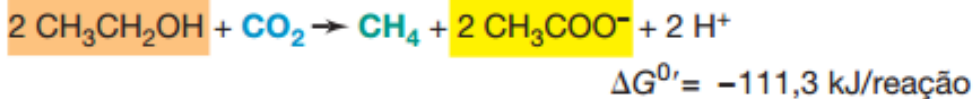
### Fermentação de etanol:



### Metanogênese:



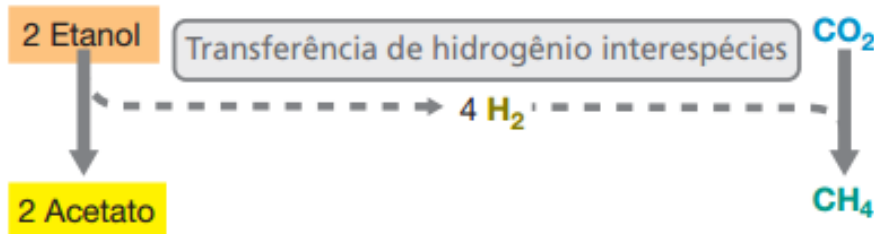
### Reação acoplada:



(a) Reações

### Fermentador de etanol

### Metanogênico



(b) Transferência sintrófica de H<sub>2</sub>

- Essenciais em ambientes anóxicos, pois eles utilizam os produtos da fermentação de fermentadores primários e liberam um produto essencial para os metanogênicos, acetogênicos e consumidores de H<sub>2</sub>
- Em condições óxicas, as relações sintróficas são desnecessárias.

Se O<sub>2</sub> ou NO<sub>3</sub> estiverem disponíveis como aceptores de elétrons, a energética da oxidação de um ácido graxo ou álcool é tão favorável, que as associações cooperativas com outros organismos para a degradação desses substratos não são necessárias.

**Figura 13.37** Sintrofia: transferência de H<sub>2</sub> interespecíes. A fermentação de etanol a metano e acetato, pela associação sintrófica de uma bactéria oxidante de etanol e um parceiro consumidor de H<sub>2</sub>, (metanogênico) é apresentada. (a) Reações envolvidas. Os dois organismos partilham a energia liberada pela reação acoplada. (b) Natureza da transferência sintrófica de H<sub>2</sub>.

# Qualidade ambiental

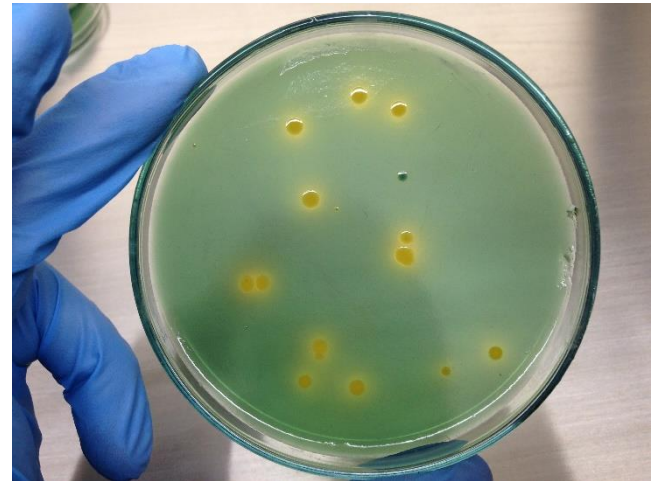
- Importância da bactérias anaeróbicas ácido-lácticas para as cascatas microbianas sintróficas
- Os micro-organismos mais eficientes em depurar matéria orgânica e compostos tóxicos são os pertencentes ao gênero *Bacillus*, por serem aeróbicos e capazes de degradar completamente os compostos orgânicos utilizando o oxigênio e produzindo biomassa, CO<sub>2</sub> e água.
- No que se refere aos compostos nitrogenados, a redução de amônia e nitrito é atribuída especialmente à capacidade das espécies de *Bacillus* de mineralizar a amônia via assimilação por degradação quimioheterotrófica de moléculas de carbono (açúcares).

# Qualidade ambiental

- Os compostos nitrogenados tóxicos, também podem ser metabolizados quando existem condições físico-químicas específicas, por bactérias quimiolitotróficas ambientais do ciclo do nitrogênio, como *Nitrosomonas spp.*, *Nitrobacter spp.*, etc.
- Devaraja et al. (2013) utilizaram um consórcio de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* para tratamento de água e de solo em sistemas produtivos de camarão. Estes autores relataram que o consórcio composto pelos três *Bacillus* foi capaz de biorremediar o ambiente através da produção de protease, amilase e lipase, e de inibir o desenvolvimento de diferentes espécies do gênero *Vibrio*, sem afetar a sanidade do camarão. As bactérias do gênero *Bacillus* também foram capazes de reduzir amônia e nitrito.

# Qualidade ambiental

- A vulnerabilidade a surtos de espécies patogênicas, como as espécies do gênero *Vibrio*, é um ponto que requer muita atenção.
- Os vibrios são bactérias presentes naturalmente em sistemas produtivos de camarão.
- Densidades nos estuários e cultivos de camarão.
- Quantidade excessiva de matéria orgânica e desequilíbrios nos parâmetros ambientais favorecem o crescimento excessivo destes micro-organismos, ocasionando infecções nos animais (vibriose).
- Vibriose X desenvolvimento do vírus da mancha branca.
- Os sistemas produtivos tratados com micro-organismos benéficos apresentam quantidades inferiores de agentes infecciosos, em especial os do gênero *Vibrio*, e limitada formação de compostos tóxicos como amônia, nitrito e sulfeto de hidrogênio, comparado a ambientes não tratados, onde ocorrem elevadas taxas de *Vibrio* spp. e excessiva produção de compostos tóxicos.

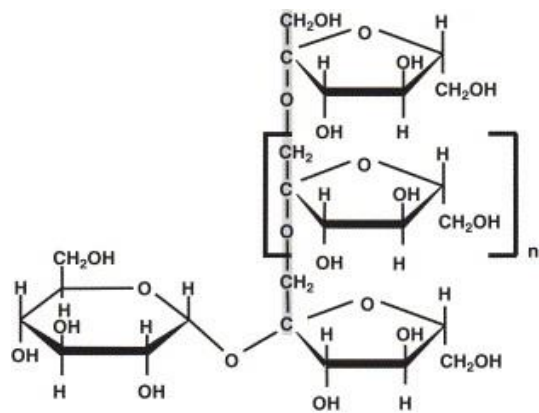


# Prebióticos

- Compostos não digeríveis pelo animal que são fermentados seletivamente pelos micro-organismos presentes em seu trato gastrointestinal, estas substâncias são fornecidas em ingredientes da dieta ou adicionadas posteriormente a partir de fontes exógenas (AZEVEDO et al. 2015; MERRIFIELD et al. 2010).
- Ou seja, os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que seletivamente estimulam o crescimento e/ou o metabolismo de bactérias promotoras da saúde do trato intestinal, que ocorrem naturalmente nesse ambiente, melhorando o balanço intestinal do organismo.

# Prebióticos usados em aquicultura

- Inulina;
- Fructooligosacarídeos;
- Nanoologosacarídeos;
- Galactooligosacarídeos;
- Arabinoxilan.



Molécula da inulina

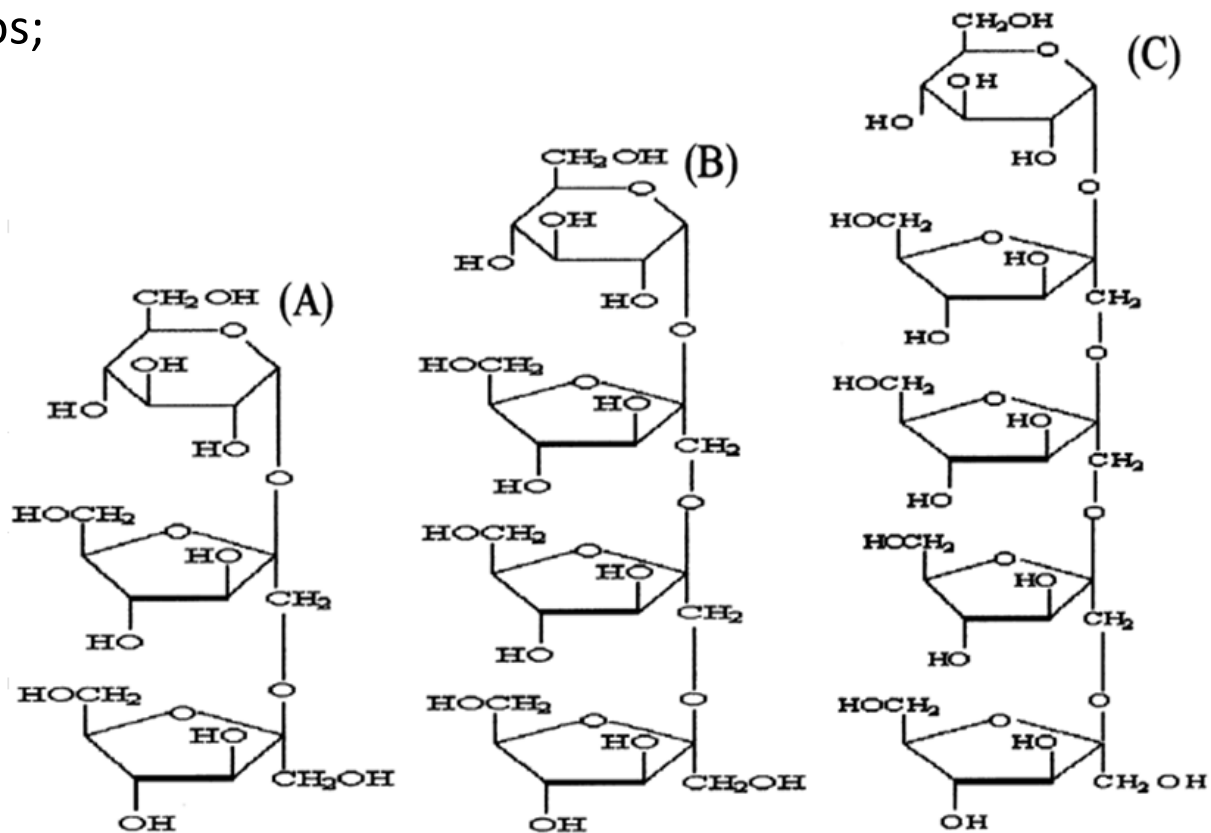


Figura 1 – Estrutura química dos principais fructooligosacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e fructofuranosil nistose (C).

Moléculas dos principais Fructooligosacarídeos

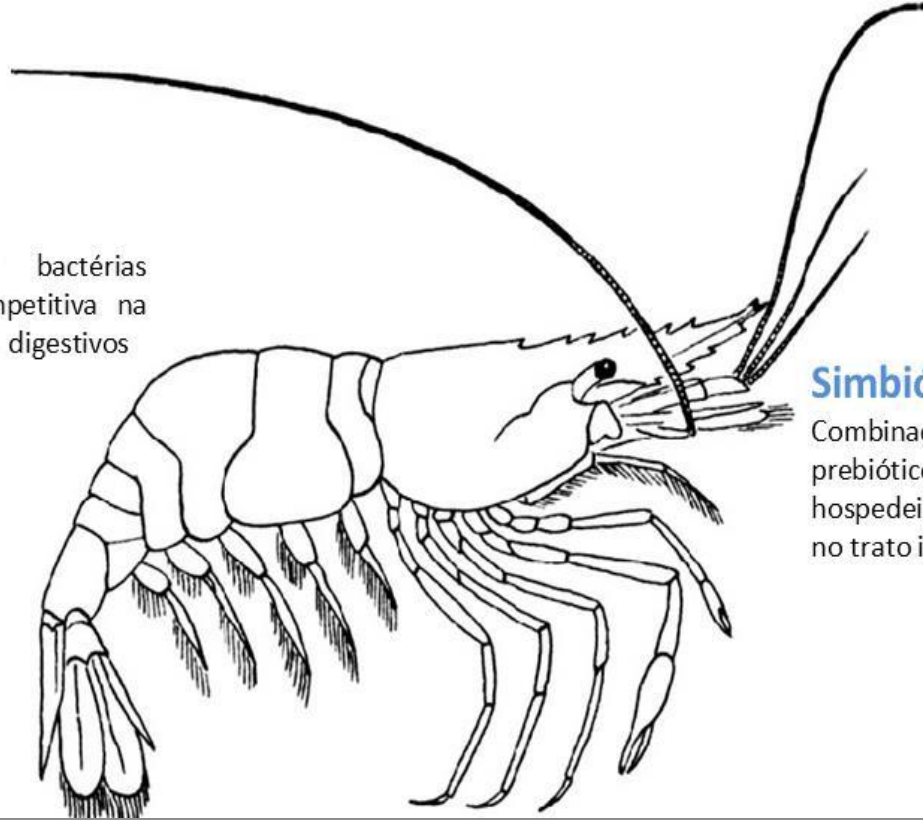
# Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

## Probióticos:

Reduzem a presença de bactérias patogênicas por exclusão competitiva na água ou diretamente nos tratos digestivos

## Prebióticos:

Estimulam o crescimento e a saúde das bactérias do trato intestinal



## Simbióticos:

Combinação balanceada de probióticos e prebióticos que assegurem mais saúde ao hospedeiro e o crescimento das bactérias no trato intestinal

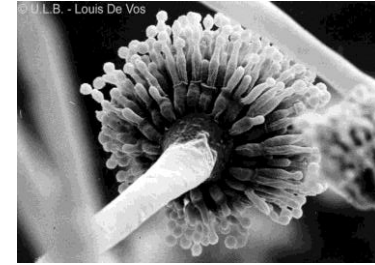
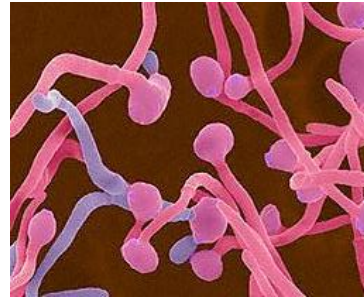
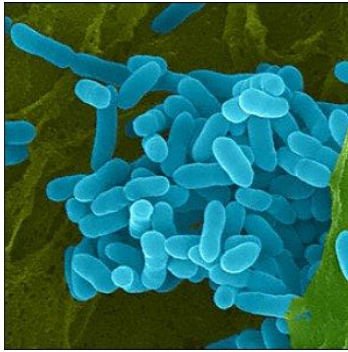
# Desenvolvimento de produtos Probióticos

- O desenvolvimento de um produto probiótico é um processo de múltiplas etapas focadas em segurança, funcionalidade e características tecnológicas.
- As etapas para obtenção de um probiótico comercial envolvem desde:
  - ✓ Coleta de informações;
  - ✓ Isolamento e seleção de cepas microbianas;
  - ✓ Estudos das características fisiológicas;
  - ✓ Estudo das propriedades probióticas e da capacidade de inibição de patógenos;
  - ✓ Ausência de patogenicidade e da avaliação de seus efeitos sobre o hospedeiro;
  - ✓ Estudo dos custos e da viabilidade econômica.
- Os produtos disponíveis no mercado devem estar registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como aditivo probiótico.



“O papel do infinitamente pequeno é infinitamente grande!”

Louis Pasteur (1822-1895)



“A diversidade microbiana constitui o mais extraordinário reservatório de vida da biosfera. Nela se encontram os recicladores naturais dos maiores poluentes da Terra”.

(Adaptado de *Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics*, *Current Science*, 89(1), p.101-112, 2005.)