



SELEÇÃO E DESAFIO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ISOLADAS DO INTESTINO DO TAMBAQUI *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818

Alexandre Vaz da Silva^{1*}; Emily Monteiro Lopes¹; Ana Claudia Carvalho da Silva¹; Danilo Vitor Vilhena Batista¹; Tays Brito Reis Santos²; Francisco Alex Lima Barros³; Joel Artur Rodrigues Dias³; Natalino da Costa Sousa⁴; Rodrigo Yudi Fujimoto⁵; Carlos Alberto Martins Cordeiro⁶.

¹ allexandrevaz1@gmail.com. Graduandos do Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Pará UFPA – Campus Bragança – Instituto de Estudos Costeiros (IECOS). Laboratório de Probióticos, Av. Leandro Ribeiro s/n bairro Aldeia, Bragança, PA. (CEP) 68600-000, Brasil.

² brito.thays@hotmail.com Mestranda do programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes (UNIT). Aracaju, SE (CEP) 49025-040, Brasil.

³ alxlbarrros@gmail.com. Doutorandos do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará-UFRA-EMBRAPA.

⁴ natal.engpesca@gmail.com. Doutor em Ciência Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará-UFRA-EMBRAPA.

⁵ ryfujim@hotmail.com Zootecnista, Doutor em Aquicultura, pesquisador Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av Beira Mar 3250, Aracaju, SE (CEP) 49025-040, Brasil.

⁶ camcordeiro2006@hotmail.com Engenheiro Químico, Doutor em Produção Vegetal, Docente do Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Pará UFPA – Campus Bragança – Instituto de Estudos Costeiros (IECOS). Laboratório de Probióticos, Av Leandro Ribeiro s/n bairro Aldeia, Bragança, PA. (CEP) 68600-000, Brasil.

RESUMO: O presente estudo objetivou isolar e selecionar cepas de bactérias com potencial probiótico do trato intestinal de *Colossoma macropomum*. Para o isolamento das bactérias foram utilizados quinze juvenis de *C. macropomum* saudáveis para a retirada do trato digestório, em seguida as cepas foram submetidas a ensaios *in vitro*, de pH e sais biliares. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com distintas concentrações de pH (4, 5, 6, 8 e 9) e um tubo contendo 5% (p/v) de sais biliares. Para o teste de antagonismo, foram retiradas quatro discos (Ø 0,8 cm) e inoculadas em meio de cultura TSA bactérias patogênicas. Posteriormente, as cepas com os melhores resultados foram identificadas. No total foram isoladas 31 cepas bacterianas dos juvenis de *C. macropomum*, sendo 8 cepas selecionadas para os ensaios *in vitro*. A cepa T12A e T4A tiveram menor redução no pH 6, 8 e 9 e para os sais biliares a cepa T12A apresentou redução de 9%. Em relação ao antagonismo, as cepas T3AR, T4AR, T12A e T2AR se destacaram por apontarem maior ação antagônica frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. Portanto, cepa T12A identificada molecularmente como *Bacillus cereus*, demonstrou potencial probiótico para *Colossoma macropomum* (Tambaqui).

Palavras-chave: Aquicultura, espécies nativas, alimento suplementar, bactérias patogênicas, probiótico.

ABSTRACT: The present study aimed to isolate and select strains of bacteria with probiotic potential of the intestinal tract of *Colossoma macropomum*. Fifteen *C. macropomum* juveniles were reduced to isolate the bacteria, reduced for removal of the digestive tract, then the strains were subjected to *in vitro* assays, pH and other tests. The experimental design was randomized with different pH variations (4, 5, 6, 8 and 9) and a tube containing 5% (w / v) bile salts. For antagonism tests, four discs (Ø 0.8 cm) were removed and inoculated in TSA culture medium with pathogenic bacteria. Subsequently, as strains with the best results were identified. No total was isolated from 31 bacterial strains of *C. macropomum* juveniles, with 8 strains selected for *in vitro* assays. Strain T12A and T4A had a lower reduction in pH 6, 8 and 9 and, for the others,



strain T12A decreased 9%. Regarding antagonism, such as T3AR, T4AR, T12A and T2AR strains, they stand out for pointing greater antagonistic action against Gram positive and Gram negative bacteria. Therefore, strain T12A was identified molecularly as *Bacillus cereus*, demonstrating probiotic potential for *Collossoma macropomum* (Tambaqui).

Key words: Aquaculture, native species, supplementary food, pathogenic bacteria, probiotic.

1- INTRODUÇÃO

A piscicultura corresponde a 70,9% de toda produção aquícola no Brasil, o cultivo de espécies nativas teve um crescimento de 40,3% em 2018 (PEIXE BR, 2018). Dentre as principais espécies o tambaqui *Collossoma macropomum*, contribui com 27% do total de peixes produzidos no país, contabilizando uma produção acima de 136 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2016). Esta expressiva produção decorre das suas características como boa rusticidade e adaptação ao cativeiro, rápido crescimento, tolerância a níveis críticos de oxigênio dissolvido, tecnologia reprodutiva estabelecida além da demanda do mercado consumidor (SILVA e FUJIMOTO, 2015; BARÇANTE, 2015).

O aumento na procura de pescado vem provocando uma maior intensificação na produção. Tais condições podem representar um ambiente estressor para os animais confinados acarretando no aparecimento de surtos de doenças, e consequentes mortalidades (VIEIRA et al., 2013; CARUSO et al., 2019). Dentre as principais doenças que representam problemas para a piscicultura, as de origem bacteriana podem causar grandes perdas econômicas na cadeia produtiva em um curto tempo (TAVARES-DIAS e MARTINS, 2017; LEIRA et al., 2017). O surgimento da bacteriose no sistema de cultivo implica, atualmente, no uso de antibióticos de forma indiscriminada pelos produtores, representando assim um risco ambiental e de saúde coletiva, uma vez que o mau uso de bactericidas pode promover maior resistências as bactérias (BANERJEE, 2017; AMARANTE et al., 2018).

Nesse âmbito, medidas alternativas ao uso de antibióticos são de grande interesse para a piscicultura sustentável. Dentre as principais medidas utilizadas atualmente com esse propósito está o uso de probióticos na dieta animal. Esse tipo de suplementação vem apresentando bons resultados para a sanidade dos peixes, além do incremento no desempenho zootécnico dos animais (MOURIÑO et al., 2015; AZEVEDO et al., 2016; MEHRABI et al., 2018; DIAS et al., 2018). Os probióticos são definidos como sendo microrganismos vivos que fornecidos ao hospedeiro, e colonizando o trato digestivo, é capaz de modular a microbiota intestinal, beneficiando a saúde do animal (GATESOUBE, 1999). Assim, diversos microrganismos podem ser utilizados como probióticos, destacando-se as bactérias do gênero *Bacillus* (DIAS et al., 2018; SOLTANI et al., 2019), que apresentam uma capacidade de agregação e colonização no sistema gastrointestinal do hospedeiro (THANKAPPAN et al., 2015), podendo diminuir o estresse, aumentar o número de células sanguíneas e das atividades de lisozimas, refletindo na melhora do sistema imunológico (NANDI et al., 2017; ZHOU et al., 2018; MORAES et al., 2018).

O uso de microrganismos autóctones da própria espécie aumenta as chances de colonização no trato gastrointestinal dos peixes (VERSCHUERE et al., 2000; MOURIÑO, et al., 2016; JATOBÁ, et al., 2017; MORAES et al., 2018), pois há uma maior possibilidade destas bactérias com potencial probiótico à resistir as ações fisiológicas do hospedeiro (MOURIÑO et al., 2016; DIAS et al., 2018). Assim, para determinar e selecionar as bactérias autóctones que melhor se adaptem as condições de colonização do trato gastrointestinal diversas avaliações químicas e físicas devem se realizadas, pois são capazes de determinar a capacidade da bactéria de sobreviver a mudanças osmóticas, de pH e à ação de sais biliares, simulando assim as características da situação do alimento ao passar pelo trato digestório. Esses testes determinarão se a via digestiva pode ou não comprometer a estrutura da parede celular do probiótico, determinando as limitações à



sobrevivência e a colonização intestinal da bactéria no hospedeiro (MOURIÑO et al., 2016; JATOBÁ, et al., 2017; DIAS et al., 2018).

Apesar da importância que a suplementação com probiótico na dieta de peixe vem representando para a piscicultura a aplicação dessa tecnologia em espécies nativas é escassa, bem como, literatura existente sobre bactérias probióticas autóctones de *C. macropomum*. Desta forma, o presente trabalho objetivou isolar e selecionar cepas de bactérias com potencial probiótico do trato intestinal de *Colossoma macropomum* através de testes “*in vitro*”.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Probiótico da Universidade Federal do Pará, *Campus* Bragança. As cepas foram isoladas do trato digestório de quinze juvenis de *Colossoma macropomum* saudáveis (0,986±0,20 g e 28,32±2,34 cm), obtidas do lago da EMBRAPA/Sergipe Tabuleiros Costeiros, e da Estação de Piscicultura da Universidade Federal Rural do Pará (UFRA). Todos os procedimentos com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo nº 29022016.003.

Para a remoção do intestino, os animais foram anestesiados com eugenol (60 mg.L⁻¹), eutanasiados através de secção da medula espinhal e então desinfetados com álcool 70%. Posteriormente, foi realizada, em condições estéreis, uma incisão na cavidade abdominal do animal para a coleta de fragmentos do intestino com peso de 0,1g. O material coletado foi homogeneizado em gral de porcelana com 1mL solução salina estéril (0,65%) diluídos serialmente (1:10) e semeado em placa de petri com meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) ágar contendo 0,1% de azul de anilina, sendo incubadas por 48 horas a 35 °C para crescimento (JATOBÁ et al., 2008). As cepas de interesse foram isoladas por esgotamento em placa de MRS até atingir a pureza do morfotipo isolado (JATOBÁ et al., 2008).

Para as avaliações *in vitro*, as cepas com potencial probiótico foram inoculadas em tubos contendo MRS caldo com distintas concentrações de pH (4, 5, 6, 8 e 9) e um tubo contendo 5% (p/v) de sais biliares, sendo então conduzidos para estufa bacteriológica a 35 °C durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura de três ml de cada cultura em cubetas por espectrofotometria a 630nm de absorvância. Sendo a resposta de cada cepa isolada, definida pelo percentual de redução da absorvância em comparação ao meio de cultura controle com pH (7) e sem adição dos sais biliares (VIEIRA et al., 2013).

Para o testes de antagonismo foi utilizado a técnica de halo de difusão (BAUER et al, 1966), para isso foram retiradas quatro discos (Ø 0,8 cm) das placas contendo as bactérias probióticas e inoculadas em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA), semeadas com *Aeromonas hydrophyla* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus durans* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Micrococcus luteus* (A270), cedidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

O halo inibitório é determinado pela zona formada ao redor do disco, onde não é observado crescimento do patógeno, a área fica com tonalidade mais clara. O diâmetro dos halos foi mensurado com auxílio de paquímetro, e a partir do halo inibitório foi possível analisar a capacidade antibacteriana frente ao agente patogênico (THANKAPPAN et al., 2015; KATO et al., 2016).

Para identificação do material genético, as cepas foram coletadas de isolados puros, mantidos em meio semissólido, no Laboratório de Probióticos da Universidade Federal do Pará (UFPA), *Campus* Bragança. As cepas foram semeadas com auxílio de alça de platina estéril em 10 ml de meio caldo MRS, incubados para crescimento durante 24 horas a 35°C.

O DNA foi extraído dos procariotos seguindo metodologia de Sambrook et al. (1989), adaptado por Jin (2006), assim, após o cultivo das cepas, foram centrifugados a 12000g, 1,4 ml de



cada cultura durante 2 minutos, e o pellet ressuspenso em 530 μL de Tris (100 mM) e EDTA (1 mM). Neste foi adicionado 28 μL de Dobicil Sulfato de Sódio (SDS) a 20% e 2 μL de proteinase K (2 mg/ml). Essas amostras foram mantidas a 37°C em estufa durante duas horas sem agitação, em seguida realizada extração utilizando 500 μL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), sendo retirado o sobrenadante e transferidos para um novo microtubo (1,5 ml) e adicionado 10 μL de NaCl a 5 M, obtendo concentração final de 10 mM, retirando o precipitado e lavando duas vezes com etanol absoluto gelado. O DNA foi armazenado por duas horas a temperatura -20°C, após descongelamento foi centrifugado a 12000g por 10 minutos. O precipitado foi lavado com álcool a 70% e ressuspenso em 100 μL de TE (100 mM de Tris e 1mM de EDTA) e tratado com 2 μL de RNase H (10 mg.ml⁻¹). Em seguida realizada quantificação de 4 μL da amostra com eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK e RUSSEL 2001).

Após quantificação do material genético, seguiu com o processo de amplificação dos genes selecionados para sequenciamento e identificação. Através da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), o isolado foi amplificado utilizando os primers de *phenylalanyl-tRNAsynthase* (pheS), com os iniciadores: pheS-21-F (5' CAYCCNGCHCGYGAYATGC 3') e pheS-23-R (5' GGRTGRACCATVCCNGCHCC 3') para análise de taxonomia de procaríotos (NASER et al., 2007). Para amplificação do fragmento de DNA, as reações foram conduzidas com 2,4 μL de DNTPs (1,25 mM), 1,5 μL de tampão (200 Mm Tris-HCl- PH 8, 500 mM KCl), 0,6 μL de MgCl₂ (50 mM), 0,6 μL de cada um dos iniciadores (50 ng/ μL), aproximadamente 25 ng de DNA molde, 0,1 μL de Taq Polimerase (5 U/ μL) e adicionado água ultrapura para completar volume final de 15 μL da reação. O ciclo de temperatura utilizada foi de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, congelamento a 58°C por 1,5 minutos, extensão a 72°C por 1,5 minutos, seguido por uma extensão final a 75°C por 5 minutos.

O sequenciamento das cepas foi realizado por eletroforese capilar, com aparelho ABI3730, utilizando-se o polímero POP7 e BigDye v.3.1, e enviados para arquivo individual para cada cepa, em formato FASTA, para leitura no sistema *Basic Local Alignment Search Tool*-BLAST, e identificadas pela comparação de suas sequências depositadas no acervo mundial GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os dados obtido foram submetidos ao teste de premissas de normalidade de Shapiro-Wilk e então à análise de variância (ANOVA-one way), sendo o valor de F significativo, as médias foram confrontadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat. Quando necessário os dados de contagens microbiológicas foram transformadas em raiz quadrada para atender a premissa de normalidade.

RESULTADOS E DISCURSSÃO

Foram isoladas 31 cepas bacterianas dos juvenis de *C. macropomum*. Destas, 22 foram identificadas morfológicamente pelo teste de coloração como Gram-positivas, das quais 8 apontaram afinidade com corante azul de anilina, indicador de bactérias ácido lácticas.

Nos testes de acidez foi observada redução da porcentagem de absorvância em todas as cepas avaliadas em pH 4, tendo como destaque a cepa T3AR como a de menor perda de crescimento em relação as demais. Em pH 5, as cepas T3A e T12A apresentaram maior resistência, com perda de densidade em 69,8 e 86,5%, sendo a cepa T12A juntamente com T4A a que apresenta menor redução no pH 6, 8 e 9 (Tabela 1).

Quanto aos ensaios à ação dos sais biliares (SB) a 5%, no período de 24 horas, observou-se que a cepa T12A apresentou apenas 9% da redução da densidade bacteriológica (Tabela 1), obtendo os melhores resultados para ambos os testes.

Tabela 1. Redução em porcentagem de absorvância das cepas de *Colossoma macropomum*, submetidas aos desafios frente a escalas de pH e concentração de sais biliares (SB).

CEPA	pH4 (%)	pH5 (%)	pH6 (%)	pH8 (%)	pH9 (%)	SB* (%)
T3AR	83.5±2.2A	84.5±2.7C	34.3±3.0B	37.6±4.2B	15.8±4.7B	57.8±0.9C
T4AR	86.4±1.2C	86.4±1.5D	37.9±1.4B	39.3±2.1B	29.4±2.3C	58.9±0.0C
T2AR	94.7±0.6D	92.7±0.8F	73.1±0.6E	68.2±1.0D	50.0±1.0E	58.4±1.9C
T1AR	93.8±0.3D	90.8±0.4E	53.8±0.1D	38.8±0.2B	45.0±0.2D	61.8±1.2D
T14A	85.0±1.1B	85.4±0.1C	44.1±0.2C	61.2±0.0C	42.2±0.1D	69.5±0.1E
T3A	85.1±0.0B	69.8±0.0A	8.2±0.3A	39.1±0.3B	56.9±0.1E	52.1±1.2B
T4A	86.6±0.0C	83.6±0.0C	5.7±0.3A	13.2±0.3A	4.5±0.4A	60.8±0.5D
T12A	86.5±0.0C	82.8±0.0B	2.7±0.3A	14.2±0.3A	7.0±0.2A	9.0±0.8A

*Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos na coluna pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os testes de resistência a diferentes concentrações de pH e a ação de sais biliares (SB) são de fundamental importância, pois, demonstram a capacidade da cepa isolada em resistir às alterações sofridas pelo alimento durante sua passagem pelo sistema digestório, e para isso, devem ter como resposta a sobrevivência em valores fisiológicos encontrados no animal de interesse (CHI et al., 2014; MOURIÑO, et al., 2016; JATOBÁ, et al., 2017). O pH do intestino de *C. macropomum* varia entre 7 e 8, mas o pH do estômago é muito ácido, sendo uma barreira que pode reduzir em até 90% a densidade de células bacterianas e diminuindo a disponibilidade destas bactérias no intestino (RAMESH et al., 2017; DIAS et al., 2018). Nas faixas de pH estudadas as cepas T3A, T4A e T12A foram as que apresentaram a menor redução de densidade em meios mais ácidos.

No entanto, para que um probiótico colonize com eficiência o trato intestinal de um peixe é importante que, além de resistirem aos níveis de pH, resistam aos sais biliares responsáveis pela emulsificação dos lipídios durante a digestão animal (NELSON e COX, 2014). Algumas bactérias tem a capacidade de hidrolisar a ação dos sais biliares, diminuindo seu efeito (BEGLEY et al., 2006), proporcionando uma vantagem seletiva a essas cepas.

No presente estudo a cepa T12A foi a que apresentou melhor resistência aos sais biliares. Em trabalho similar, no entanto, testando a resistência de cepas *Bacillus licheniformis* e *B. pumilus* isoladas de *Labeo rohita* mostrou que a viabilidade celular destas bactérias quando expostas a sais biliares (5%) foi de aproximadamente 75% e 55%, respectivamente (RAMESH et al., 2017), valores menores que os encontrados por Zhou et al. (2018) onde cepas de *Bacillus* sp. mostraram taxas de sobrevivência superiores a 85,3% em bile a 2% durante 12 horas, ainda assim, apresentando resultados inferiores ao do presente estudo.

Houve resultados positivos frente a todos os patógenos desafiados com as bactérias probióticas, apresentando halos de inibição de tamanhos superiores a 12 mm (Tabela 2). Ao qual, as cepas T3AR, T4AR, T12A e T2AR se destacaram por apontarem maior ação antagonônica frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo a cepa T3AR a cepa com maiores halos de inibição (>18mm) para todos os patógenos avaliados. Em relação a cepa T12A, foram observados diferença estatística para *Enterococcus durans*, quando comparado a cepa T3AR, já as cepas T4AR e T2AR apresentaram semelhança estatística com a cepa T3AR para as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus durans* e *Micrococcus luteus*.



Tabela 2. Avaliação antagonística *in vitro* das cepas com potencial probiótico isoladas de juvenis de *Colossoma macropomum*. Halo de inibição (mm) frente à *Escherichia coli* (EC), *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED), *Staphylococcus aureus* (StA) e *Micrococcus luteus* (ML).

CEPA	EC(-)	AH(-)	PA(-)	ED(+)	StA(+)	MC(+)
T3AR	19.9±1.2A	19.5±1.1A	21.1±1.4A	18.1±0.4A	18.3±0.1A	22.1±1.5A
T14A	16.9±0.7B	13.6±0.4D	12.5±0.5C	12.3±0.8C	17.6±2.0AB	19.9±2.0AB
T4A	17.6±0.7B	16.3±0.5B	16.8±0.3B	12.7±1.0C	16.8±0.4B	20.6±1.9A
T4AR	16.3±0.4B	19.5±0.4A	15.0±0.3B	18.7±0.7A	16.5±1.4B	19.5±0.4A
T12A	19.0±0.4A	18.7±0.4AB	21.0±1.8A	14.8±0.9B	18.8±1.6A	21.7±0.4A
T2AR	17.4±0.4B	20.4±2.1A	14.2±0.2BC	18.8±1.8A	17.5±0.7AB	21.5±0.5A
T3A	16.8±0.7B	17.1±0.4B	16.4±0.0B	15.4±0.2B	16.7±0.3B	17.9±0.6B
T1AR	15.5±0.3B	15.5±0.5C	15.9±0.2B	13.9±0.4BC	14.6±0.4C	18.0±0.6B

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos na coluna pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). (-): Bactéria Gram negativa, (+): Bactéria Gram positiva

As cepas que apresentaram melhores resultados *in vitro* seguiram para identificação molecular, sendo possível identificar as espécies trabalhadas com nítida leitura no banco de sequências GenBank e 98% similaridade de identidade. Sendo identificadas como: *Bacillus cereus* (T12A), *Bacillus thuringiensis* (T3A), *Enterococcus faecalis* (T3AR) e *Enterococcus faecalis* (T4A).

Em relação ao teste de inibição, no presente estudo, foram obtidos resultados positivos para todas as cepas em relação aos agentes patogênicos testados. São observados na literatura estudos que demonstram a capacidade inibitória dos gêneros *Bacillus* e *Enterococcus* frente a *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp., *Vibrio harveyi* e *Staphylococcus agalactiae* (DIAS et al., 2018; DIAS et al., 2019). A ação antagonística destas bactérias com potencial probiótico provavelmente ocorre pela competição por nutrientes, espaço, liberação de metabólitos e produção de bacteriocinas (DIAS et al., 2018), favorecendo a colonização do probiótico fornecido e a modulação da microbiota intestinal do hospedeiro (GIRI et al., 2014; MOURIÑO et al., 2016; DIAS et al., 2018).

Estudos mostram a utilização de *Bacillus* sp. com potencial probiótico, obtendo resultados benéficos tanto no controle de patógenos, como no desempenho produtivo dos peixes (DIAS et al., 2018; LIU et al., 2018).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a presença de cepas com potencial probiótica, isoladas do intestino de *Colossoma macropomum* (Tambaqui), sendo a cepa T12A identificada molecularmente como *Bacillus cereus*, a que apresentou melhor capacidade de suportar as condições simuladas do trato gastrointestinal da espécie. No entanto, estudos *in vivo* devem ser realizados para comprovar seu potencial como probiótico, bem como a melhor concentração a ser aplicada nas diferentes fases de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AMARANTE, J.F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A.I.; VARGAS, A.C.; COSTA, M.M.; AMARANTE, T.A.B. Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1-7, 2018.



- AZEVEDO, R.V.; FOSSE FILHO, J.C.; PEREIRA, S.L.; CARDOSO, L.D.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; DE ANDRADE, D.R. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 9-16, 2016.
- BANERJEE, G.; RAY, A.K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in veterinary Science**, v. 115, p. 66-77, 2017.
- BARÇANTE, B.; DE SOUSA, A.B. Características zootécnicas e potenciais do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para a piscicultura brasileira. **PubVet**, v. 9, p. 287-347, 2015.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.
- CARUSO, C.; GUSTINELLI, A.; PASTORINO, P.; ACUTIS, P.L.; PRATO, R.; MASOERO, L.; PREARO, M. Mortality outbreak by perch rhabdovirus in European perch (*Perca fluviatilis*) farmed in Italy: Clinical presentation and phylogenetic analysis. **Journal of fish diseases**, v. 42, p. 773-776, 2019.
- CHI, C.; LIU, J.Y.; FEI, S.Z.; ZHANG, C.; CHANG, Y.Q.; LIU, X.L.; WANG, G.X. Effect of intestinal autochthonous probiotics isolated from the gut of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on immune response and growth of A. **Japonicus**. **Fish & shellfish immunology**, v. 38, p. 367-373, 2014.
- DIAS, J.A.R.; ABE, H.A.; SOUSA, N.C.; SILVA, R.D.F.; CORDEIRO, C.A.M.; GOMES, G. F. E.; READY, J.S.; MOURIÑO, J.L.P.; MARTINS, M.L.; CARNEIRO, P.C.F.; MARIA, A.N.; RODRIGO YUDI FUJIMOTO, R.Y. *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). **Aquaculture international**, v. 27, p. 463-474, 2019.
- DIAS, J. A. R.; ABE, H. A.; SOUSA, N. C.; COUTO, M. V. S.; CORDEIRO, C. A. M.; MENESE, J. O.; CUNHA, F. S.; MOURINO, J. L. P.; MARTINS, M. L.; BARBAS, L. A.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; FUJIMOTO, R. Y. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Research**, v. 49, p. 3063-3070, 2018.
- GATESOUBE, F.J. **The use of probiotics in aquaculture**. **Aquaculture**, v.180, n.1-2, p.147-165. 1999.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; SEN, S. S.; JENA, P. K. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG 1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG 3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG 2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 163-171, 2014.
- IBGE. 2016. Produção da Pecuária Municipal 2016 - vol. 44. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>>. Acesso em: 01 jun. 2019.
- JATOBÁ, A.; MORAES, A.V.; STECKERT, L.D.; JESUS, G.F.A. Selection of autochthone probiotic for *Astyanax bimaculatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1645-1652, 2017.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.D.N.; BUGLIONE NETO, C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.
- JIN, J.D.; LEE, D.S.; SHIN, E.K.; KIM, S.J.; JUNG, R.; HAHN, T.W. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of *Salmonella*



- enterica subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar gallinarum. **Journal of veterinary medical science**, v. 68, p. 1321-1326, 2006.
- KATO, C.D.; KAHUMA, C.E.; NAMULAWA, V.T.; KASOZI, N. Antibacterial activity of *Lactobacillus spp* and *Lactococcus spp* Isolated from various Parts of pebbly fish, *Alestes baremoze*. **British Microbiology Research Journal**. v. 17, p. 1-7, 2016.
- LEIRA, M.H.; REGHIM, L.S.; CIACCI, L. S.; CUNHA, L.T.; BOTELHO, H.A.; BRAZ, M.S.; DIAS, N.P.; MELO, C.C.V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET**, v. 11, p. 538-645, 2017.
- LIU, C.H.; WU, K.; CHU, T.W.; WU, T.M. Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture international**. V. 26, p. 63-74, 2018.
- MEHRABI, F.; KHALESI, M.; HAZAIE, K. Effects of pre-and probiotics on growth, survival, body composition, and hematology of common carp (*Cyprinus carpio L.*) fry from the Caspian Sea. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. V. 18, p. 597-602, 2018.
- MORAES, A.V.D.; PEREIRA, M.D.O.; MORAES, K.N.; RODRIGUES-SOARES, J.P.; JESUS, G.F.A.; JATOBÁ, A. Autochthonous probiotic as growth promoter and immunomodulator for *Astyanax bimaculatus* cultured in water recirculation system. **Aquaculture research**. V. 49, p. 2808-2814, 2018.
- MOURIÑO, J.L.P.; PEREIRA, G.V.; VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.B.; USHIZIMA, T.T.; DA SILVA, B.C.; SEIFFERT, W.Q.; JESUS, G.F.A.; MARTINS, M.L. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach. **Aquaculture Reports**. v. 3, p. 166-171, 2016.
- MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; SILVA, B.C.; PEREIRA, G.V.; JESUS, G.F.A.; MARTINS, M.L. Symbiotic supplementation on the hemato-immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture nutrition**. V. 23, p. 276-284, 2015.
- NASER, S.M.; DAWYNDT, P.; HOSTE B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT M.; SWINGS J. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2777–2789, 2007.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.
- PEIXE BR. 2018. Anuário Peixe Br da piscicultura. 71p.
- RAMESH, D.; SOUISSI, S.; AHAMED, T. S. Effects of the potential probiotics *Bacillus aerophilus* KADR3 in inducing immunity and disease resistance in *Labeo rohita*. **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 408-415, 2017.
- SAMBROOK J.; RUSSELL D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York. US. 2001. 2344p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SILVA, C.A.da.; FUJIMOTO, R.Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazonica**, v. 45, p. 323-332, 2015.
- SOLTANI, M.; GHOSH, K.; HOSEINIFAR, S.H.; KUMAR, V.; LYMBERY, A.J.; ROY, S.; RINGØ, E. *Genus bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, 27(3), 331-379. 2019.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of parasitic diseases**, v. 41, p. 913-918. 2017.



CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA – XXI CONBEP

21 A 24 DE OUTUBRO DE 2019

MANAUS (AM) – A CAPITAL BRASILEIRA DA PESCA E DA AQUICULTURA

THANKAPPAN, B.; RAMESH, D.; RAMKUMAR, S.; NATARAJASEENIVASAN, K.; ANBARASU, K. Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita*—towards to identify novel probiotics against fish pathogens. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 175, p. 340-353, 2015.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**. v. 64, p. 655-671, 2000.

VIEIRA, F.D.N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, EA.; SOARES, M.; SILVA, B.C.D.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L.; VINATEA, L.A. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 48, p. 998-1004, 2013.

ZHOU, S.; XIA, Y.; ZHU, C.; CHU, W. Isolation of Marine *Bacillus* sp. with Antagonistic and Organic-Substances-Degrading Activities and Its Potential Application as a Fish Probiotic. **Marine drugs**, v. 16, p. 196, 2018.