



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE PESCA

EMILLY MONTEIRO LOPES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIA PROBIÓTICA DA ESPÉCIE ORNAMENTAL
AMAZÔNICA *Nannostomus beckfordi***

BRAGANÇA

2022

EMILLY MONTEIRO LOPES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIA PROBIÓTICA DA ESPÉCIE ORNAMENTAL
AMAZÔNICA *Nannostomus beckfordi***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a faculdade de Engenharia de Pesca, Instituto de Estudos Costeiros, da Universidade Federal do Pará, *campus* de Bragança-PA, como requisito a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Carlos Alberto Martins Cordeiro
Co-orientador: Natalino da Costa Sousa

BRAGANÇA

2022

EMILLY MONTEIRO LOPES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIA PROBIÓTICA DA ESPÉCIE ORNAMENTAL
AMAZÔNICA *Nannostomus beckfordi***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a faculdade de Engenharia de Pesca, Instituto de Estudos Costeiros, da Universidade Federal do Pará, *campus* de Bragança-PA, como requisito a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientador: Carlos Alberto Martins Cordeiro
Co-orientador: Natalino da Costa Sousa

Data de aprovação: ____/____/____

Conceito:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos Alberto Martins Cordeiro
Universidade Federal do Pará – Orientador

Prof. Dr. Natalino da Costa Sousa
Embrapa Tabuleiros Costeiros – Co-orientador

Francisco Alex Lima Barros – Mestre em Ciência Animal
Universidade Federal do Pará – Titular

Ítalo Antônio de Freitas Lutz – Mestre em Biologia Ambiental
Universidade Federal do Pará – Titular

Aos meus pais, Luiz Carlos, Ediléia Monteiro e
minha irmã Evillyn Lopes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as graças alcançadas e obstáculos superados ao longo do curso.

Agradeço aos meus pais, Luiz Carlos, Ediléia Monteiro, minha irmã Evillyn Lopes e ao meu tio Ailson Monteiro, por todo apoio e incentivo para que eu chegasse até aqui.

Sou muito grata ao meu Orientador Prof^o. Dr^o Carlos Alberto e Co-Orientador Prof^o. Dr^o Natalino Sousa pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade e paciência ao longo da minha trajetória.

Agradeço ao Laboratório de Probióticos da UFPA – Campus Bragança, coordenado pelo Prof^o. Dr^o. Carlos Alberto, pela disponibilidade para a execução do meu trabalho de conclusão de curso.

Agradeço ao Alexandre Vaz, por todo o apoio durante o curso.

Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para a elaboração do meu trabalho de conclusão de curso.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender o desconhecido...”

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar e selecionar *in vitro* bactérias com potencial probiótico do peixe ornamental Amazônico *Nannostomus beckfordi*. Para o isolamento, retirou-se o intestino de 12 espécimes, que foram macerados, homogeneizados e semeados em placa de petri contendo Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS). Posteriormente ao crescimento bacteriano (48 horas a 35°C), as cepas selecionadas foram mantidas em caldo MRS e submetidas a testes de resistência a NaCl (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 e 3,0%), pH (4, 5, 6, 8 e 9) e sais biliares (5% p/v). O antagonismo foi realizado frente as bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas jandaei*. Das cepas isoladas (23 cepas), apenas seis (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) apresentaram potencial probiótico. As cepas C1 e C6 tiveram maior resistência ($p < 0,05$) para o NaCl (0,5 e 1%) e pH (5 a 6), na presença de sais biliares somente a C1 teve a melhor resistência de crescimento. Para o antagonismo frente as bactérias patogênicas, a C1 apresentou halo de inibição maior que 9 mm. Sendo esta cepa bactéria (C1) identificada como *Enterococcus faecium* 11037 CHB. Portanto, este é o primeiro relato do isolamento da bactéria autóctone *E. faecium* em *N. beckfordi* com potencial probiótico.

Palavras-chave: peixe ornamental amazônico; probiótico autóctone; ensaio *in vitro*.

ABSTRACT

This study aimed to isolate and select *in vitro* bacteria with probiotic potential for the Amazon ornamental fish *Nannostomus beckfordi*. For isolate, twelve fish underwent surgery procedure to remove their intestinal tract, macerate and then inoculate in the plate petri containing de Man Rugosa Sharped Agar (MRS). After bacterial growth (48 hours at 35°C), selected strains were inoculated in MRS broth and submitted to resistance test with NaCl (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0%), pH (4, 5, 6, 8 and 9) and bile salts (5% w/v). Inhibition test against pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas Jandaei* was also performed. Within the isolated strains group (23 strains), only six (S1, S2, S3, S4, S5 and S6) showed probiotic potential. Strains S1 and S6 showed the greater resistance for NaCl (0.5% and 1%) and pH (5 and 6), but only S1 obtained better results to resist the bile salts. Even against pathogenic bacteria, the S1 showed the best results with inhibition halos greater than 9 mm. In the end, this bacterial strain (S1) was identified as *Enterococcus faecium* 11037CHB. Thus, this is the first report regarding isolated autochthonous bacterium *E. faecium* with probiotic potential of *N. beckfordi*.

Keywords: Amazon ornamental fish; autochthonous probiotic; *in vitro* assay.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO GERAL	11
2.1	Objetivos específicos	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1	Produção de peixes ornamental	11
3.2	Doenças bacterianas na piscicultura ornamental	13
3.3	Probiótico	15
3.4	Mecanismo de ação	16
3.5	Tipos de probióticos	17
3.6	Seleção das bactérias probióticas	19
3.7	<i>Nannostomus beckfordi</i>	20
	REFERÊNCIAS	21
	CAPÍTULO 1	31
	RESUMO	32
	ABSTRACT	32
	INTRODUÇÃO	33
	MATERIAL E MÉTODOS	34
	RESULTADO	35
	DISCUSSÃO	37
	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A indústria de peixes ornamentais movimenta uma receita de aproximadamente US\$ 15 bilhões, com a comercialização de equipamentos, rações, produtos para água e os peixes. Essa modalidade de piscicultura tornou-se altamente rentável, uma vez que os peixes são comercializados por unidade. A intensificação dos sistemas de criação com intuito de atender a demanda de consumidores, que crescem anualmente, gerou uma receita de aproximadamente US\$ 372 milhões somente com a comercialização de peixes ornamentais em 2017 (FAO, 2017; EVERS *et al.*, 2019; BORGES *et al.*, 2021).

Neste cenário, o Brasil é conhecido mundialmente como um dos principais exportadores de peixes ornamentais, devido à diversidade de espécies oriundos, principalmente da região Amazônica, com formatos e cores diversificados, além de tamanhos distintos, característica que são apreciadas nos mercados nacional e internacional (ABE *et al.*, 2019; BELTRÃO *et al.*, 2021). Contudo, há uma carência de informações no desenvolvimento de pacote tecnológico e estratégias na criação visando a sanidade e o crescimento das espécies Amazônicas (ABE *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2021).

Atualmente, com a intensificação da piscicultura ornamental, houve o aumento da incidência de doenças, principalmente de origem bacteriana, responsáveis por surtos de mortalidade e com isso prejuízo econômico na base da cadeia produtiva de peixes ornamentais (JATT *et al.*, 2019; HOSSAIN e HEO, 2021). A proliferação de doenças é relacionada a vários fatores, tais como o aumento na densidade de estocagem, manejo inadequado, má qualidade de água e rações desbalanceadas (WANJA *et al.*, 2020). Logo, uma das medidas para tratamento/controle e prevenção é o uso de antibióticos (oxitetraciclina) e quimioterápicos (formalina), que administrados de forma inadequada, podem contribuir para resistência de bactérias à esses fármacos, depleção do ambiente e riscos à saúde do manipulador (PINHEIRO *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2018; SICURO *et al.*, 2020, HOSSAIN *et al.*, 2020; MOG *et al.*, 2020).

Nesse sentido, a busca pelo desenvolvimento da piscicultura ornamental sustentável vem sendo foco de pesquisa, buscando-se estratégias que possa substituir os tratamentos convencionais. Logo, o uso de probióticos, que são microrganismos vivos que inseridos na dieta são capazes de colonizar o intestino do hospedeiro proporcionando efeitos benéficos à saúde (GATESOUBE, 1999; ALLAMEH *et al.*, 2017; JATOBÁ *et al.*, 2018). Na piscicultura ornamental, estes efeitos benéficos são relatados no crescimento, modulação da microbiota intestinal, melhoria do sistema imunológico e resistência às doenças (DIAS *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2020; ARANI *et al.*, 2021).

Dentre as bactérias probióticas relatadas na literatura para os peixes ornamentais, destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL), como por exemplo, as *Enterococcus faecium* (DIAS *et al.*, 2019), *Lactobacillus plantarum* (PAIXÃO *et al.*, 2020) e *Lactobacillus helveticus* (AHIRE *et al.*, 2019). Este grupo de bactérias veem demonstrando resultados promissores ao hospedeiro, promovendo a modulação da microbiota intestinal melhora do sistema imunológico, resistência a bactérias patogênicas, aumento da atividade das enzimas digestivas e da vilosidade intestinal que, conseqüentemente aumenta o desempenho de crescimento e a higidez dos animais (HOSEINIFAR *et al.*, 2018; RINGØ *et al.*, 2018; DAWOOD, *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; ARIANE *et al.*, 2021). Para os peixes ornamentais, há relatos em diversas espécies, tais como em acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) (DIAS *et al.*, 2019), guppy (*Poecilia reticulata*) (BALAKRISHNA, 2019), kinguio (*Carassius auratus*) (AHIRE *et al.*, 2019) e paulistinha (*Danio rerio*) (ARIANE *et al.*, 2021).

Contudo, a escolha e a segurança da bactéria com potencial probiótico é fundamental para garantir os efeitos benéficos aos peixes, sendo que 90% dos probióticos ofertados nas dietas para os peixes ornamentais são de origem exógena (GOBI *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2020), podendo não promover a melhoria no animal, devido a baixa resistência às condições fisiológicas do hospedeiro, impossibilitando a colonização destas bactérias na quantidade necessária para ocasionar os efeitos benéficos (DIAS *et al.*, 2019; TARKHANI *et al.*, 2020). Neste contexto, há necessidade de administrar bactérias autóctones nas dietas possibilitando maiores chances de colonização do intestino, resultando nos efeitos benéficos ao animal (SOUSA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2020).

Desta forma, a seleção e o isolamento de cepas com potencial probiótico através dos testes *in vitro* são critérios essenciais para certificar a segurança e resistência do isolado as condições fisiológicas do animal, que posteriormente deve ser administrado nas dietas, realizando os ensaios *in vivo* para verificar e validar que a cepa selecionada tem potencial probiótico, ocasionando efeitos benéficos ao hospedeiro (DIAS *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2020).

Os peixes ornamentais amazônicos são apreciados no mercado nacional e internacional, dentre as espécies com valor econômico e que vem ganhando espaço no cultivo é o *Nannostomus beckfordi* (Steindachner, 1876), da família Lebiasinidae distribuído desde o rio Amazonas até o Rio Negro. Essa espécie destaca-se devido ao seu formato fusiforme, comportamento pacífico, formação de cardume e coloração avermelhada nas nadadeiras, com valor unitário de 3,55 euros (AQUAEDEN, 2021). Apesar do aumento na procura desta espécie, ainda são escassas as informações sobre os protocolos de criação (ABE *et al.*, 2019), além disso,

não há estratégias nutricionais com intuito de proporcionar a higidez e o crescimento, resultando em espécies mais saudáveis, com qualidade e potencial competitivo para o mercado de peixes ornamentais.

Diante do exposto, o presente estudo é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias produtivas na criação de *N. beckfordi*, visando a sanidade do animal diante das condições adversas durante as fases de desenvolvimento na criação, e ao mesmo tempo proporcionando aumento da higidez e desempenho de crescimento, agregando o fortalecimento da cadeia produtiva de peixes ornamentais.

2 OBJETIVO GERAL

Selecionar *in vitro* bactérias com potencial probiótico da espécie ornamental amazônica *Nannostomus beckfordi* (Steindachner, 1876).

2.1 Objetivos específicos

- a) Isolar bactérias com potencial probiótico do peixe ornamental *N. beckfordi* em meio de cultura ácido láctico;
- b) Selecionar *in vitro* bactérias com potencial probiótico do peixe ornamental *N. beckfordi*;
- c) Realizar o antagonismo das bactérias com potencial probiótico frente a bactérias patogênicas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produção de peixes ornamental

A aquariorfilia é o termo empregado a manutenção de peixes em aquário, para fins de ornamentação, lazer e/ou estudos científicos. Os primeiros registros desta atividade datam o século XVI, com a publicação em 1569 do livro intitulado *Chu Sha Yu P'u*, que significa “Livro dos peixes vermelhos”, escrito pelo Chinês Chang Chi' En-Tê, ao qual descreveu os manejos de alimentação, limpeza e cuidados com temperatura, tornando-se o primeiro exemplar com informações sobre a criação de peixes em aquário (BOTELHO FILHO, 1990; LIMA, 2004).

Atualmente, a indústria de peixes ornamentais movimenta um montante de US\$ 15 bilhões, com a comercialização de equipamentos, rações, produtos, e os peixes ornamentais. Com a expansão da atividade entre os países, sendo praticada em aproximadamente 125 países, devido a demanda crescente de consumidores, a piscicultura ornamental vem se intensificando

com uso de tecnologias (bombas, alimentadores automáticos entre outros), estratégias para aumentar a produção e até mesmo iniciando a criação de novas espécies (ABE *et al.*, 2019; EVERS *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2021). Neste cenário, a piscicultura contribui com 90% das espécies destinado ao segmento da aquariofilia, mostrando-se uma atividade atrativa e economicamente rentável, sendo comercializado mais de um milhão de exemplares distribuídos em aproximadamente 5300 espécies, movimentando para o ano de 2016 uma receita de US\$ 347 milhões em exportações e US\$ 287 milhões em importações (FAO, 2017; EVERS *et al.*, 2019; TRIBUZY-NETO *et al.*, 2021).

Dessa maneira, o Brasil, é reconhecido como um dos principais fornecedores de espécies ornamentais de água doce da América do Sul, principalmente, oriundos da região amazônica (EVERS *et al.*, 2019), devido à variedade de espécies com formatos diferenciados e padrões de cores diversos (DOS ANJOS *et al.*, 2018; ABE *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2020). Logo, ocupa a 8ª posição no ranking da exportação, sendo estimado a comercialização de mais 142,2 milhões de exemplares entre os anos de 2006 a 2015, principalmente para União Europeia, Cingapura, Hong Kong, Japão, Estados Unidos e China, arrecadando uma receita estimada em US\$ 23 milhões (EVERS *et al.*, 2019; TRIBUZY-NETO *et al.*, 2021).

O aquarismo tornou-se um hobby popular e atrai milhares de pessoas ano após ano, aumentando o interesse na criação de peixes ornamentais em todos os países, isso explica a presença cada vez mais frequente de aquários em apartamentos, casas e pontos comerciais, pois além de decorar o ambiente, os cuidados aplicados a manutenção dos peixes ornamentais proporcionam uma sensação de tranquilidade e bem-estar ao cuidador (FARIA *et al.*, 2016). A aquariofilia faz parte do segmento pet, e somente no ano de 2019, o Brasil, apresentou uma população de 19,4 milhões de animais, ocupando o quarto lugar no ranking mundial na aquisição de peixes ornamentais, ficando atrás apenas dos EUA, China e Reino Unido (ABINPET, 2020).

Contudo, a indústria de peixes ornamentais está cada vez mais exigente, procurando qualidade, beleza e novas espécies. Para os peixes ornamentais amazônicos, a pesca ainda é a principal fonte de abastecimento do mercado, sendo os estudos com protocolos de criação das espécies nativas o primeiro passo para garantir a quantidade desses peixes neste mercado, além das estratégias na criação para sanidade, produção e variedades (ABE *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2020). Logo, as pesquisas com foco na sanidade, nutrição, crescimento e resistência, são fatores essenciais para alavancar a criação de peixes ornamentais amazônicos de interesse comercial para os mercados nacional e internacional.

3.2 Doenças bacterianas na piscicultura ornamental

As doenças tornaram-se um dos principais gargalos para o sucesso na piscicultura ornamental, principalmente de origem bacteriana, ocasionando surtos de mortalidade e perdas econômicas nos elos da cadeia de peixes ornamentais (RAJESWARI, 2019; CARDOSO *et al.*, 2021). As enfermidades bacterianas são ocasionadas por microrganismos oportunistas, podendo ser os responsáveis primário ou secundário das infecções nos peixes, são encontrados habitando naturalmente o ecossistema aquático marinho e de água doce. A infecção dos organismos aquáticos está associada ao desequilíbrio na tríade epidemiológica, decorrente de práticas inadequadas de manejo durante o ciclo de criação, predispondo assim o estresse e consequente redução na eficiência do sistema imunológico, contribuindo dessa forma, para a susceptibilidade dos animais (LEWBART, 2001; JATT *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2021).

A exemplo destas bactérias com potencial de disseminação na criação, podemos destacar o gênero *Aeromonas*, conhecido pela doença aeromoniose, são responsáveis por altos surtos de mortalidade em peixes ornamentais, podendo ocasionar até 100% de mortalidade nos animais em criação (DAS *et al.*, 2021). Estas bactérias são consideradas patógenos emergentes, que acometem os animais aquáticos (PEATMAN *et al.*, 2018). Este grupo de bactérias, são classificadas como anaeróbicas facultativas, fermentadoras e gram-negativas, apresentam forma de bacilos e oxidase positiva, e os componentes estruturais (flagelo, pili, lipopolissacarídeos e proteínas de membrana externa) tem papel fundamental para o processo de infecção nos tecidos dos animais (PESSOA *et al.*, 2020). Além disso, estas bactérias apresentam múltiplos fatores de virulência (como β -hemol) que aumentam a capacidade de infecção e colonização dos hospedeiros, podendo também resistir aos tratamentos convencionais (PARKER; SHAW, 2011; GONÇALVES PESSOA *et al.*, 2019; PESSOA *et al.*, 2020; HOSSAIN e HEO, 2021).

Os principais sinais clínicos observados em peixes ornamentais acometidos por *Aeromonas* spp. são: septicemia hemorrágica, úlceras dérmicas, hemorragias pontuais e vermelhidão no tegumento (LEWBART, 2001; WALCZAK *et al.*, 2017; HOSSAIN *et al.*, 2020), que já foram relatados em *Carassius auratus* (ARATHI *et al.*, 2018), *Xiphophorus hellerii* (DAS *et al.*, 2021), *Symphysodon discus* (CARDOSO *et al.*, 2021) e *Cyprinus carpio* (BHUVANESWARI *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado por Rozi *et al.* (2018), gourami (*Osphronemus gouramy*) com sinais de doenças bacterianas, isolou-se e identificou-se 18 cepas de bactérias, sendo a *Aeromonas hydrophila* com representação de 27,78%. Nesses animais foram observadas

hemorragias, úlceras, bolhas de ar expelidas pelo opérculo, nadadeiras corroídas e alterações histopatológicas no rim. Rosidah *et al.* (2020), observaram que as diferentes densidades de *A. hydrophila* aplicadas via injeção intramuscular no peixe-dourado (*Carassius auratus*), ocasionou a hiperplasia nas brânquias e no rim, além disso foi constatado hemorragias, necrose e congestão nas brânquias, fígado e rim. Huang *et al.* (2021), relataram que a bactéria patogênica *A. hydrophila*, é um potencial agente causador da doença da cauda de “agulha purulenta” em guppies (*Poecilia reticulata*).

Os patógenos bacterianos do gênero *Pseudomonas* são microrganismos ubíquos, gram-negativos, não fermentadores, aeróbicos estritos, em forma de bacilos (IGBINOSA *et al.*, 2012), responsáveis na mortalidade de peixes ornamentais (RAJESWARI, 2019). Haque *et al.* (2021), observaram que a infecção de anabás (*Anabas testudineus*) com o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* causou hemorragias, necrose lamelar, produção excessiva de muco, alterações histopatológicas no rim e fígado, além disso houve a diminuição na concentração de eritrócitos e hemoglobina, assim como a mortalidade dos peixes infectados.

Outro grupo importante de patógenos bacterianos na piscicultura ornamental, pertence ao gênero *Streptococcus* caracterizados como bactérias gram-positivas, aeróbicas facultativas, fermentadoras, não móveis, apresentam catalase negativa e forma de cocos, responsáveis por causar a doença infecciosa estreptococose (DU TOIT *et al.*, 2014). Em peixes ornamentais infectados com *Streptococcus* observou-se a coloração corporal escura, exoftalmia, natação errática, lesões nas brânquias, hemorragias dérmicas e alterações histopatológicas nos órgãos internos (LEWBART, 2001; VELAPPAN e MUNUSAMY, 2018; AMAL *et al.*, 2019). Nugrahani *et al.* (2021), observaram o aumento no número de neutrófilos e monócitos, além da diminuição de eritrócitos, leucócitos totais e linfócitos no peixe ornamental *Rasbora argyrotaenia* infectado por *Streptococcus agalactiae*.

As doenças tornaram-se um gargalo para a piscicultura ornamental, logo, o uso de quimioterápicos e antibióticos de amplo espectro comumente são utilizados, com intuito de ação profilática ou tratamento (RODGERS e FURONES, 2009; CHOWDHURY *et al.*, 2015; MO *et al.*, 2017; SANTOS e RAMOS, 2018). Nesse contexto, Anjur *et al.* (2021), listaram os principais antibióticos e quimioterápicos utilizados no tratamento e prevenção de doenças na piscicultura ornamental, o qual destacaram-se os antibióticos: tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfamerazina e eritromicina e quimioterápicos: acriflavina, sulfato de cobre, formaldeído, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e azul de metileno. O uso destes produtos químicos, foi observado por Chanda *et al.* (2011), na criação de peixes ornamentais, que em muitos casos não apresentam alta eficácia para tratamento, além de

aumentar a mortalidade dos animais decorrente da administração do produto.

Desta forma, para minimizar os impactos com o uso desses produtos e alavancar o desenvolvimento da piscicultura ornamental de forma sustentável, estratégias para substituir o uso desses produtos são focos de pesquisa, favorecendo o ambiente, o hospedeiro e minimizando o risco ao manipulador. Neste cenário, o uso de probiótico vem tornando-se uma alternativa profilática eficaz, devido aos seus efeitos satisfatórios proporcionados aos animais de criação, resultando no aumento do crescimento, melhoria do sistema imunológico e resistência às condições adversas da criação (ARANI *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2019; PAIXÃO *et al.*, 2020).

3.3 Probiótico

A palavra probióticos é oriunda da junção entre os termos latino “pro” e grega “bios” que significa para a vida (ZIVKOVIC, 1999). Inicialmente foi proposto por Metchnikoff em 1908, ao observar a longevidade proporcionada pela ingestão de bactérias ácido lácticas (BAL) em humanos. Em 1965 Lilly e Stillwell, caracterizaram os probióticos como substâncias secretadas por microrganismos que estimulam o crescimento de outro. Posteriormente, Fuller (1989), caracterizou os probióticos, como microrganismos vivos suplementado a dieta, capazes de modular a microbiota intestinal do hospedeiro, conferindo-lhes efeitos benéficos à saúde.

O conceito deste termo foi sendo moldado, tendo em vista, os métodos de administração dos probióticos bem como a influência da dinâmica do ambiente aquático na composição da microbiota intestinal dos hospedeiros. Gatesoupe (1999), definiu probióticos, como microrganismos vivos que colonizam o trato gastrointestinal e mantem-se em concentrações viáveis, proporcionando aumento no desempenho produtivo e principalmente a melhora no sistema imunológico do hospedeiro.

Verschuere *et al.* (2000), conceituaram o termo probióticos como microrganismos vivos capazes de promover efeitos benéficos tanto ao hospedeiro via suplementação alimentar quanto por meio da melhora da qualidade da água em tanques de criação. Sinalizando dessa forma, o emprego mais abrangente da palavra probióticos na aquicultura. Diante disso, os efeitos proporcionados pelos microrganismos probióticos na criação de animais aquáticos, pode ser dividida em probióticos, quando o mesmo é administrado via dieta (PAIXÃO *et al.*, 2020; ARANI *et al.*, 2021a, 2021b), biocontrole e biorremediação, quando atua na disseminação de microrganismos que não conferem patogenicidade, na melhora nos parâmetros químicos e

purificação de água residual (DAT *et al.*, 2019; ILLANJAM *et al.*, 2019; HLORDZI *et al.*, 2020).

Atualmente, o uso de probiótico em peixes vem sendo utilizado como estratégia para a criação, com resultados promissores para os peixes, sendo observado como efeito benéfico a modulação da microbiota intestinal, melhora do sistema imunológico, resistência a doenças, aumento da vilosidade intestinal e de enzimas digestivas, proporcionando o aumento no crescimento (SOUSA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2019).

Desta forma, o uso destes microrganismos em dietas para os peixes durante os ciclos de criação vem ganhando espaço, sendo atualmente incorporado nas rações para serem ofertadas aos animais, resultando na diminuição da mortalidade com aumento da produtividade, sendo que estes resultados são oriundos das bactérias autóctones, diminuindo a quantidade de cepas nas dietas, com redução do preço e garantindo seus efeitos benéficos ao hospedeiro.

3.4 Mecanismo de ação

A microbiota intestinal desempenha um papel importante em diversos processos regulatórios, logo, a quantidade e a diversidade microbiana presente no trato gastrointestinal influenciam diretamente nos processos fisiológicos do organismo (LAZADO e CAINPANG, 2014; BUTT e VOLKOFF, 2019). A composição de bactérias benéficas no intestino promove a competição por sítios de ligação no epitélio intestinal e nutrientes, favorecendo dessa forma, a diminuição e/ou exclusão de bactérias com potencial patogênico, além disso, a secreção de substâncias químicas, dentre outros metabólitos interage com as células absortivas no intestino auxiliando no processo digestivo, assim como, no estímulo de produção e liberação de hormônios e outros peptídeos que atuam no sistema imunológico melhorando a resposta imune do hospedeiro (BUTT e VOLKOFF, 2019).

A ação dos probióticos depende das características do microrganismo e sua inter-relação com o hospedeiro, pois os efeitos benéficos ocorrem com a capacidade de colonização das bactérias no intestino do animal, sendo diretamente relacionada com a resistência fisiológica do animal (BALCÁZAR *et al.*, 2006; CAIPANG e LAZADO, 2015). A colonização é uma das fases mais importante para considerar uma bactéria com características probióticas, e assim promove a modulação da microbiota intestinal, no qual ocorre por meio da competição por nutrientes e/ou sítios de ligação (GÓMEZ e BALCÁZAR, 2008; BORRELLI *et al.*, 2016), produção de bacteriocinas, peróxidos e ácidos orgânicos (VERSCHUERE *et al.*, 2000; BALCÁZAR *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2020). Estes efeitos moduladores da adição de

probióticos a dieta, foram observados no peixe barbo-rosado (*Puntius conchonius*) (PARVATHI *et al.*, 2012), peixe-zebra (*Danio rerio*) (ARANI *et al.*, 2021b), peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) (PAIXÃO *et al.*, 2020) e acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) (SOUSA *et al.*, 2020).

O estímulo na produção de enzimas digestivas, auxilia na digestão e melhor absorção de nutrientes (HOSEINIFAR *et al.*, 2017; ARANI *et al.*, 2019), conferindo melhor desempenho dos índices zootécnicos, tais como, ganho de peso, crescimento e conversão alimentar (DIAS *et al.*, 2019; HIRE *et al.*, 2020). Arani *et al.* (2019), avaliaram o efeito de *Pediococcus acidilactici* na suplementação dietética do peixe-zebra (*Danio rerio*) e observaram o aumento da atividade enzimática da lisozima no muco e melhora no desempenho produtivo. Sarojini *et al.* (2020), reportaram que a inclusão do probiótico *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* V1 produtor de bacteriocina, na dieta do peixe-dourado (*Carassius auratus*), favoreceu o aumento na atividade das enzimas amilase, protease e lipase, proporcionando melhor desempenho no crescimento, confirmando assim a influência da microbiota na nutrição animal.

A capacidade imunomoduladora das bactérias probióticas é um mecanismo de grande relevância para os hospedeiros, sendo um dos principais aspectos desejados para a piscicultura ornamental (DIAS *et al.*, 2019). O aumento da higidez, devido a atividade fagocítica proporcionado pelo incremento no número de neutrófilo, monócito e trombócito, potencializando as respostas imunológicas (LAZADO e CAIPANG, 2014; PAIXÃO *et al.*, 2020). Estes efeitos benéficos ao sistema imunológico é um dos pontos chaves para o sucesso da criação, proporcionando o bem-estar aos animais, e com isso o crescimento, a qualidade e a exuberância dessas espécies a serem ofertadas ao mercado de peixes ornamentais.

3.5 Tipos de probióticos

Os principais grupos de bactérias probióticas utilizadas em peixes, são as ácido lácticas (BAL) e bacillus, representados pelos gêneros *Enterococcus* (DIAS *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2019), *Lactobacillus* (PAIXÃO *et al.*, 2020), *Lactococcus* (SUN *et al.*, 2018), *Leuconostoc* (ALLAMEH *et al.*, 2012; SELIM *et al.*, 2019), *Pediococcus* (AHMADIFAR *et al.*, 2020; ARANI *et al.*, 2021a), (SANKAR *et al.*, 2017), *Weissella* (JAHANGIRI *et al.*, 2018) e *bacillus* (DIAS *et al.*, 2019).

As bactérias ácido lácticas (BAL), são microrganismos heterogêneos, microaerófilos, não móveis, gram positivas, catalase negativa, não formadores de esporos, produtores de ácido láctico como produto final de fermentação de carboidratos, podem apresentar forma de bacilos

e/ou cocos. O interesse na utilização de bactérias ácido láticas se deve aos efeitos proporcionados ao hospedeiro, tais efeitos incluem a capacidade em modular a microbiota gastrointestinal e produzir substâncias antimicrobianas exercendo assim, papel imunostimulante e antagônico frente aos patógenos (HOSEINIFAR *et al.*, 2018; RINGO *et al.*, 2018, 2020).

O grupo *Bacillus* com potencial probiótico, pertence à ordem Bacillales, são microrganismos quimiorganotróficos, móveis quando apresentam flagelos e não móveis, são gram positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, possuem forma de bastonetes retos ou levemente curvados com ocorrência individual, ou em pares, podendo formar cadeias ou filamentos longos, além de produzir endósporos (LOGAN e VOS, 2015).

Na piscicultura ornamental, a inclusão de probióticos a dieta de peixes, tem demonstrado efeitos satisfatórios na piscicultura ornamental, melhorando a performance do sistema imunológico inespecífico e não específico, além da resistência a infecções de origem bacteriana e melhor absorção de nutrientes (YAMASHITA *et al.*, 2017; GOBI *et al.*, 2018; ADORIAN *et al.*, 2019; GOPINATH *et al.*, 2019). Diante disso, pesquisas são desenvolvidas neste campo para avaliar os efeitos benéficos de probióticos em peixes ornamentais, efeitos esses observados nas espécies ornamentais *Pterophyllum scalare* (DIAS *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2020) e *Osphronemus goramy* (ILLANJAM *et al.*, 2019), inibição bactericida e/ou bacteriostática de patógenos em *Carassius auratus* (VADASSERY *et al.*, 2020), além de produzir substâncias extracelulares que estimulam células do sistema imune, relatado em *Danio rerio* (ARANI *et al.*, 2019) e *Amphiprion ocellaris* (PAIXÃO *et al.*, 2020).

A administração de *Pediococcus acidilactici* por sua vez, fortaleceu a imunidade e melhorou os índices de crescimento em *Danio rerio* (ARANI *et al.*, 2021b). Efeitos benéficos da formulação dietética contendo *Enterococcus faecium* foram observados nas espécies *Pterophyllum scalare*, constatando-se melhor desempenho de crescimento e sobrevivência (DIAS *et al.*, 2019). A suplementação com *Lactobacillus plantarum* proporcionou o aumento das vilosidades intestinais e melhor performance no desempenho produtivo em *Amphiprion ocellaris* (PAIXÃO *et al.*, 2020).

Sun *et al.* (2018), observaram o suplemento na dieta de *Cromileptes altivelis* com *Lactococcus lactis* HNL12 melhorou a taxa de crescimento e resposta imunológica contra o patógeno *Vibrio harveyi*. Allameh *et al.* (2012), relataram que a espécie *Channa striatus* alimentados com *Leuconostoc mesenteroides* apresentou resistência contra a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*. Alevinos de *Poecilia latipinna*, alimentados com artemia enriquecida com *Bacillus subtilis* apresentaram modulação da microflora intestinal, melhora

dos fatores reprodutivos, bem como, resistência ao patógeno bacteriano *A. hydrophila* (AHMADIFARD *et al.*, 2019). Hire *et al.* (2020), observaram que o enriquecimento de artêmia com *Bacillus* spp. proporcionou o aumento no desempenho de crescimento de larvas de *Carassius auratus*. Em um estudo realizado com juvenis de *Amatitlania nigrofasciata* alimentados com dieta contendo *Lacticaseibacillus casei* observou-se melhor desempenho de crescimento, aumento da atividade de enzimas digestivas como protease, amilase e lipase, assim como, aumento na atividade de lisozima (MOHAMMADIAZARM e MANIAT, 2021).

3.6 Seleção das bactérias probióticas

Os efeitos benéficos dos probióticos em peixes são cada vez mais evidenciados, aumentando a produção desses peixes na indústria. Contudo, ainda se observa que bactérias alóctones em dietas não são capazes de resistir as condições fisiológicas dos animais e com isso não colonizar o trato intestinal, e assim não apresenta os efeitos benéficos (Melo-Bolívar *et al.*, 2021). Desta forma, as bactérias autóctones apresentam características mais favoráveis para resistir e permanecer viáveis no sistema digestivo dos animais, e assim colonizar o intestino (YAMASHITA *et al.*, 2020).

Para a seleção de potenciais probióticos as cepas isoladas devem atender as premissas dos testes *in vitro* (VIEIRA *et al.*, 2013), que consistem em: avaliar a não patogenicidade; resistência as concentrações de NaCl, em função das alterações nas concentrações iônicas que podem contribuir para o rompimento da membrana bacteriana, (MORTEZAEI *et al.*, 2020); resistência as escalas de pH, visto que a acidez estomacal pode diminuir significativamente a densidade bacteriana (GIRIJAKUMARI *et al.*, 2018); resistência aos sais biliares, em virtude do efeito bactericida (BRANDVOLD *et al.*, 2019) e inibição frente a patógenos (YAMASHITA *et al.*, 2020). Portanto, esses critérios são essências para certificar a segurança e resistência do isolado para ser inserido na dieta.

Em pesquisas realizadas para avaliar a resistência de bactérias autóctones, candidatas a potenciais probióticos, os isolados que apresentaram resultados satisfatórios de resistência *in vitro* foram identificadas como: *Bacillus* sp. isolada do peixe-anabás (*Anabas testudineus*) (MIDHUN *et al.*, 2017); *Enterococcus faecium* isolada do peixe-anjo (*Pterophyllum scalare*) (DIAS *et al.*, 2019); *Lactobacillus plantarum* isolada do peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) (PAIXÃO *et al.*, 2019) e *Pediococcus acidilactici* isolada do peixe-zebra (*Danio rerio*) (ARANI *et al.*, 2021b).

3.7 *Nannostomus beckfordi*

Figura -1 peixe-lápis (*Nannostomus beckfordi*)



Fonte: Natalino Sousa (2021)

A espécie *Nannostomus beckfordi*, conhecida popularmente como peixe-lápis, pertence à Ordem dos Characiformes e Família Lebiasinidae. É uma espécie neotropical, nativa do Brasil, Guiana Francesa, Guiana e Suriname, comumente encontrada em rios lânticos em meio a raízes submersas e áreas pantanosas. São caracterizados como bentopelágicos, possuem reprodução ovípara e hábito alimentar onívoro, alimentam-se principalmente de pequenos crustáceos, vermes e insetos. Quando adultos podem atingir o tamanho máximo de 6 cm, no período reprodutivo o macho exibe cores mais intensas enquanto que a fêmea apresenta o corpo mais arredondado (PLANQUETE *et al*, 1996; ESCHMEYER *et al*, 2017).

Possuem comportamento pacífico e gregário, formato fusiforme, natação na diagonal, presença de uma faixa longitudinal de tonalidade escura que se estende desde o focinho até o pedúnculo caudal, coloração avermelhada nas nadadeiras e expectativa de vida de 3 anos. Os valores de pH ideal variam de 6,0 a 8,0 e temperatura de 24°C a 26°C. Tornando-se assim, uma espécie de interesse econômico para o mercado da aquarofilia (WEITZMAN e WEITZMAN, 2003; ABE *et al.*, 2019).

Esta espécie é apreciada nos mercados nacional e internacional de peixes ornamentais, contudo, a pesca ainda é responsável pela maior contribuição desta espécie na indústria, nesse contexto, a piscicultura ainda está em fase de elaboração e adaptação de protocolos, com o primeiro relato para esta espécie descrito por Abe *et al.* (2019). Portanto, se faz necessário o aprimoramento dos protocolos de criação e as tecnologias para a criação desta espécie, proporcionando a piscicultura estratégias para a sanidade e bem-estar, e assim expor ao mercado peixes com qualidade, saudáveis e competitivos.

REFERÊNCIAS

- ABE, Higo *et al.* Growth of Amazon ornamental fish *Nannostomus beckfordi* larvae (Steindachner, 1876) submitted to diferente stocking densities and feeding management in captivity conditions. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 8, p. 2276-2280, may. 2019.
- ABINPET. Mercado pet Brasil. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**, São Paulo, 2020. Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em: 08 jun. 2021.
- ADORIAN, Taida *et al.* Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growyh performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 1, p. 248-255, feb. 2019.
- AHMADIFAR, Ehsan *et al.* The effects of dietary *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, hemato-immunological parameters and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 516, p. 734656, oct. 2020.
- AHMADIFARD, Nasrollah *et al.* 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 and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 3, p. 957-965. sept. 2019.
- ALLAMEH, S.; NOAMAN, V.; NAHAVANDI, R. Effects of Probiotic Bacteria on Fish Performace. **Advanced Techniques in Clinical Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 11, june. 2017.
- ALLAMEH, Sayyed *et al.* Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 16, p. 3810-3816. feb. 2012.
- AMAL, Mohammad *et al.* Study on *Streptococcus agalactiae* infection in Javanese medaka (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854) model. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, p. 47-52, mar. 2019.
- ANJUR, Norashikin *et al.* An update on the ornamental fish industry in Malaysia: *Aeromonas hydrophila*-associated disease and its treatment control. **Veterinary World**, v. 14, n. 5, p. 1143-1152, may. 2021.
- AQUAEDEN. **Aquariofilia Moderna**. Portugal. Disponível em: <https://aquaeden-shop.net>. Acesso em: 05 mai. 2021.
- ARANI, Mohammadi *et al.* Dietary supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 854-861, feb. 2019.
- ARANI, Mohammadi *et al.* Effect evaluation of *Pediococcus acidilactici* (Bactocell) as a probiotic dietary supplementation, on growth performance, intestine microbiota and skin mucus bactericidal response in zebra fish (*Danio rerio*). **Journal of Ornamental Aquatics**, v. 8, n. 2, p. 15-25. july. 2021b.

- ARANI, Mohammadi *et al.* The effect of *Pediococcus acidilactici* on mucosal immune responses, growth, and reproductive performance in zebrafish (*Danio rerio.*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 153-162, nov. 2021a.
- ARATHI, Dharmaratnam *et al.* *Aeromonas hydrophila* associated with mass mortality of adult goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) in ornamental farms in India. **Indian Journal of Fisheries**, v. 65, n. 4, p. 116-126, dec. 2018.
- BALAKRISHNA, Aparna. Identification and biological activity of potential probiotic bacteria isolated from *Poecilia reticulata* (Guppy). **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 83-87, aug. 2019.
- BALCÁZAR, José *et al.* Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 18, n. 2, p. 65-70, may. 2006.
- BALCÁZAR, José *et al.* In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. **Veterinary microbiology**, v. 122, n. 3, p. 373-380, jan. 2007.
- BELTRÃO, Hélio *et al.* Trafficking of Ornamental Fish in the Brazilian Amazon. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, apr. 2021.
- BHUVANESWARI, Rajagopal *et al.* Recovery of *Cyprinus carpio* (ornamental Koi carp) experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* through phytotherapy. **Journal of Aquatic Research Marine Sciences**, v. 1, n. 2, p. 1-14, oct. 2018.
- BORGES, Ana *et al.* Caught in the (inter) net: Online trade of ornamental fish in Brazil. **Biological Conservation**, v. 263, p. 109344, nov. 2021.
- BORRELLI, Luca *et al.* Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, july. 2016.
- BOTELHO-FILHO, G. Síntese da história da aquariofilia. *Rio de Janeiro: Interciência*. 1990.
- BRANDVOLD, Kristoffer *et al.* A continuous fluorescence assay for simple quantification of bile salt hydrolase activity in the gut microbiome. **Scientific eports**, v.9, n. 1, p.1359, feb. 2019.
- BUTT, Robson; VOLKOFF, Helene. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 9, jan. 2019.
- CAIPANG, Christopher; LAZADO, Carlo. Nutritional impacts on fish mucosa: immunostimulants, pre-and probiotics. In *Mucosal health in aquaculture*. **Academic Press**, p. 211-272, 2015.
- CARDOSO, Pedro *et al.* Main bacterial species causing clinical disease in ornamental freshwater fish in Brazil. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 2, p. 231-239, nov. 2021.
- CHANDA, Mukti *et al.* The use of antibiotics and disinfectants in ornamental fish farms of West Bengal, India. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, july. 2011.

- CHOWDHURY, Afnan *et al.* Aqua drugs and chemicals used in aquaculture of Zakigonj upazilla, Sylhet. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, v. 1, n. 2, p. 336-349, nov. 2015.
- CIPRIANO, R.; BULLOCK, G.; PYLE, S. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **US Fish and Wildlife Service**, v. 68, p. 0-23, 1984.
- COUTO, Marcia *et al.* Alterações leucocitárias ocasionadas pelo estresse toxicológico agudo do óleo diesel em juvenis de tilápia-do-nilo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 84, p. 1-6, oct. 2017.
- DAS, Soumya *et al.* Disease inductive potential of *Aeromonas veronii* XhG1. 2 isolated from *Xiphophorus hellerii* in selected ornamental fish. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 11, p. 5891-5897, may. 2021.
- DAT, T *et al.* Isolation and screening of cellulose and organic matter degrading bacteria from aquaculture ponds for improving water quality in aquaculture. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 266, n. 1, p. 012002, apr. 2019.
- DAWOOD, Mahmoud *et al.* Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth-related gene expression. In GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137). **Aquaculture**, v. 505, n. 1, p. 127-136, nov. 2019.
- DIAS, Danielle *et al.* Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, p. 365-368, 2001, mar. 2011.
- DIAS, Henrique *et al.* Toxicological effects of four chemicals used for prophylaxis of Amazonian ornamental fish. **Biota Amazônia**, v. 8, n. 4, p. 13-16, nov. 2018.
- DIAS, Joel *et al.* *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). **Aquaculture International**, v. 27, n. 2, p. 463-474, 2019.
- DOS ANJOS, Hélio *et al.* Exportação de peixes ornamentais do estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 259-274, nov. 2018.
- DU TOIT, M. *et al.* The genus *Streptococcus*. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy** 9781444333: 457-505, 2014.
- ESCHMEYER, William *et al.* **Catalog of fishes: genera, species, references**. 2017.
- EVERS, H.; PINNEGAR, J.; TAYLOR, M. Where are they all from? – sources and sustainability in the ornamental freshwater fish trade. **Journal of fish biology**, v. 94, n. 6, p. 909-916, feb. 2019.
- FARIA, P. *et al.* Aquicultura ornamental: um mercado promissor. **Panorama Aquicultura**, v. 26, p. 24-37, 2016.

FERREIRA, V.; RODRIGUES, T.; SILVA, P. Avaliação do Comércio de Peixes Ornamentais no Estado do Amazonas - Brasil. **Revista Observatório de la Economía Latinoamericana**, v. 2, p. 1-21, mar. 2020.

FULLER Ray. Probiotics in man and animals, a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, may. 1989.

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

GIRIJAKUMARI, N.; ETHIRAJA, K.; MARIMUTHU, P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of probiotic properties of *Enterobacter cloacae* in Kenyi cichlid, *Maylandia lombardoi*. **Aquaculture International**, v.26, n. 4, p.959-980, mar. 2018.

GOBI, Narayanan *et al.* Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and sérum immune parameters, antioxidante enzyme activity as well as resistance Against *Aeromonas hydrophila* in tilápia *Oreochromis mossambicus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 74, p. 501-508, dec. 2018.

GÓMEZ, Geovanny; BALCÁZAR, José. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 145-154, mar. 2008.

GONÇALVES PESSOA, Rafael *et al.* The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, feb. 2019.

GOPINATH, J *et al.* Studies on Biochemical Parameters of Probiotic Supplemented Diet on Rohu (*Labeo rohita*) Fresh Water Fish Fingerlings. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)**, v. 7, n. 12, p. 172, may. 2019.

HAI, Guo-Jing. New impacts and countermeasures of nuclear waste water discharge from Japan on China's aquatic products trade. **E3S Web of Conferences**, v. 275, p. 1-5, june. 2021.

HAI, Ngo.; BULLER, Nicky.; FOTEDAR, Ravi. Effects of customized probiotics on the physiological and immunological responses of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896) challenged with *Vibrio harveyi*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 22, n. 4, p. 321-336, dec. 2010.

HAQUE, S.; BANDYOPADHYAY, P.; MONDAL, K. Studies on Growth, Behavior and Blood Profile in *Anabas testudineus* Infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 74, n. 1, p. 19-27, mar. 2021.

HIRE, J. *et al.* Effect of Probiotic, *Bacillus* spp. Enriched *Artemia* on growth of gold fish, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) Larvae. **Journal of Experimental Zoology, Indian**, v. 23, n. 1, p. 741-745, dec. 2020.

HLORDZI, Vivian *et al.* The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. **Aquaculture Reports**, v. 8, p. 100503, oct. 2020.

HOSEINIFAR, S.; DADAR, M.; RINGØ, E. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 8, p. 3987-4000, mar. 2017.

HOSEINIFAR, Seyed *et al.* Probiotic as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2429, oct. 2018.

HOSSAIN, S.; HEO, G. Ornamental fish: a potential source of pathogenic and multidrug-resistant motile *Aeromonas* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n.1, p. 2-12, aug. 2021.

HOSSAIN, Sabrina *et al.* Phylogenetic characteristics, virulence properties and antibiogram profile of motile *Aeromonas* spp. isolated from ornamental guppy (*Poecilia reticulata*). **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 3, p. 501-509, nov. 2020.

HUANG, Yuxi *et al.* *Aeromonas hydrophila* as a Causative Agent of Fester-Needle Tail Disease in Guppies (*Poecilia reticulata*). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 25, n. 2, p. 397-403, jan. 2021.

IGBINOSA, Isoken *et al.* Commensal *Pseudomonas* species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 7, p. 2537-2549, july. 2012.

ILLANJAM, S. *et al.* Comparative study of probiotic bacteria on ornamental fish Giant gourami, *Osphronemus goramy* for its survival and growth. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 12, n. 1, p. 262-268, jan. 2019.

JAHANGIRI, L. *et al.* Isolation of Probiotic Bacteria from guppy *Poeciliareticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 18, n. 6, p. 809-8015, apr. 2018.

JATOBÁ, Adolfo *et al.* Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 327-332, feb. 2018.

JATOBÁ, Adolfo *et al.* Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, sept. 2008.

JATT, A. *et al.* Isolation and identification of Pathogenic Bacteria Associated with Diseased Fish *Cirrhinus mrigala* (Ham) in Glass Aquarium. **Sindh University Research Journal-SURJ (Science Series)**, v. 51, n. 1, p. 97-100, jan. 2019.

KANCHAN, Chutharat *et al.* Virulence of *Aeromonas hydrophila* in Siamese Fighting fish (*Betta splendens*) and the bacterium susceptibility to some herbal plants. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 18, n. 2, p. 349-354, sept. 2019.

LADISA, C.; BRUNI, M.; LOVATELLI, A. Overview of ornamental species aquaculture. **FAO Aquaculture Newsletter**, v. 56, p. 39, apr. 2017.

LAZADO, Carlo; CAIPANG, Christopher. Mucosal immunity and probiotics in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, n. 1, p. 78-89, apr. 2014.

LEWBART, Gregory. Bacteria and ornamental fish. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. **WB Saunders**, v. 10, n. 1, p. 48-56, jan. 2001.

LILLY, Daniel; STILLWELL, Rosalie. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, feb. 1965.

LIMA, A. 2004. Aquicultura ornamental. **Panorama da Aquicultura**, n. 14, n. 83, p. 58-59.

LOGAN, Niall; VOS, Paul. Bacillus. **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**, 1-163, 2015.

MELO-BOLÍVAR, Javie *et al.* Multistrain probiotics use in main commercially cultured freshwater fish: A systematic review of evidence. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 1758-1780, feb. 2021.

METCHNIKOFF, Ilya. Prolongation of Life: Optimistic Studies. **Putnam & Sons, New York, NY**.1908.

MIDHUN, Sebastian *et al.* Antibacterial activity of autochthonous bacteria isolated from *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) and its in vitro probiotic characterization. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 312-320, oct. 2017.

MO, Wing *et al.* Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 8978–8989, oct. 2017.

MOG, Manu *et al.* Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, p. 1075-1082, apr. 2020.

MOHAMMADIAZARM, Hamid; MANIAT, Milad. Lacticaseibacillus casei in Diet of Juvenile Convict Cichlid Fish (*Amatitlania nigrofasciata*): Evaluating Growth Performance, Digestive Enzyme Activities, Immune Responses, and Stress Resistance. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 647-654, nov. 2021.

MORTEZAEI, F. *et al.* In vitro assessment of potential probiotic characteristics of indigenous *Lactococcus lactis* and *Weissella oryzae* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, p.1004-1019, apr. 2020.

NUGRAHANI, W.; KUSDARWATI, R.; Ulkhaq, M. Experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in silver rasbora (*Rasbora argyrotænia*): Effect to hematological profile from infected fish. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.718, n. 1, p. 1-6, mar. 2021.

- PAIXÃO, Peterson *et al.* 2019. In vitro selection of autochthonous lactic acid bacterium from (clownfish *Amphiprion ocellaris*). **Aquaculture Research**, v.00, n. 1, p. 1-4.
- PAIXÃO, Peterson *et al.* Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, v. 526, p. 735395, sept. 2020.
- PARKER, Jennifer; Shaw, Jonathan. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109-118, feb. 2011.
- PARVATHI, K. *et al.* A Study on the Effect of Commercial Probiotics on Physico-Chemical Parameters of Ornamental fish (*Puntius conchonius*) culture. **International Journal of Current Science Research**, v. 3, n. 7, p. 1305-1310, july. 2017.
- PEATMAN, Eric *et al.* Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 482, p. 1-8, jan. 2018.
- PESSOA, R. *et al.* Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104273, may. 2020.
- PINHEIRO, Raizza *et al.* Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, p. 4268-4279, 2015.
- PLANQUETTE, Paul *et al.* Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (Tome 1). **Muséum National d'Histoire Naturelle, Ministère de l'Environnement**, Paris, v. 22, p. 1-429, mar. 1996.
- RAJESWARI, K. Isolation and identification of bacterial gill disease in goldfish, *Carassius auratus* in Madurai. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 675-677, apr. 2019.
- RANZANI-PAIVA, Maria *et al.* Métodos para análise hematológica em peixes. **Editores da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM**, 2013.
- REIS, Ryuller. *et al.* Feed management and stocking density for larviculture of the Amazon ornamental fish L333 king tiger pleco *Hypancistrus* sp.(Siluriformes: Loricariidae). **Aquaculture Research**, v. 52, n. 5, p. 1995-2003, dec. 2021.
- RIBEIRO, Felipe *et al.* Culture systems for freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*)/Sistemas de criação para o acara-bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 459-467, oct. 2008.
- RINGØ, Einar *et al.* Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 116-136, 2020.
- RINGØ, Einar *et al.* Lactic acid bacteria in finfish-An update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1818, aug. 2018.

RODGERS, C.; FURONES, M. *et al.* Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. *Options Méditerranéennes*, v. 86, p. 41-59, 2009.

ROMANELI, Rafal *et al.* Efficacy of Benzocaine, Eugenol, and Menthol as Anesthetics for Freshwater Angelfish. **Journal of aquatic animal health**, v. 30, n. 3, p. 210-216, may. 2018.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

ROSIDAH, Rosidah *et al.* Histopathological changes in gold fish (*Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)) infected by *Aeromonas hydrophila* bacteria with various densities. **World Scientific News**, v. 142, p. 150-168, feb. 2020.

ROZI, *et al.* Study on characterization, pathogenicity and histopathology of disease caused by *Aeromonas hydrophila* in gourami (*Osphronemus gouramy*). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 137, p. 1-9, 2018.

SANKAR, H. *et al.* Effect of probiotics on digestive enzyme activities and growth of cichlids, *Etilapia suratis* (Pearl spot) and *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 852-864, mar. 2017.

SANTOS, Lúcia; RAMOS, Fernando. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 2, p. 135-143, aug. 2018.

SAROJINI, Kuttalampillai *et al.* Studies on the adhesion, aggregative properties and the probiotic efficiency of a potente bacteriocin-producing shrimp gut isolate *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquososorum* V1 against *Carassius auratus*. **Aquaculture International**, v. 28, n. 4, p. 1639-1656, apr. 2020.

SELIM, Khaled *et al.* In vitro evaluation of the probiotic candidates isolated from the gut of *Clarias gariepinus* with special reference to the in vivo assessment of live and heat-inactivated *Leuconostoc mesenteroides* and *Edwardsiella* sp. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 33-51, feb. 2019.

SEUYLEMEZIAN, Arman *et al.* Development of a custom MALDI-TOF MS database for species-level identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces. **Fronteiras em microbiologia**, v. 9, p. 780, may. 2018.

SICURO, Benedetto *et al.* Prevalence and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from imported ornamental fish in Italy: A translocation of resistant strains ?. **Preventive Medicine**, v. 175, p. 104880, feb. 2020.

SOUSA, Natalino *et al.* Enriched artemia naupliin with commercial probiotic in the larviculture of angelfish *Pterophyllum scalare* Lichtenstein (1823). **Journal of Fisheries Science**, v. 2, n. 1, p. 17-21, mar. 2020.

- SOUSA, Natalino. *et al.* Effects of an Enterococcus faecium-based probiotic on growth performance and health of Pirarucu, *Arapaima gigas*. **Aquaculture Research**, v.50, n. 12, p. 3720-3728, sept. 2019.
- SUN, Yun *et al.* Effects of dietary administration of Lactococcus lactis HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). **Fish & shellfish immunology**, v. 82, p. 296-303, nov. 2018.
- TARKHANI, Reza. *et al.* Comparative study of host-associated and commercial probiotic effects on serum and mucosal immune parameters, intestinal microbiota, digestive enzymes activity and growth performance of roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings. **Fish & shellfish immunology**, v. 98, p. 661-669, mar. 2020.
- TRIBUZY-NETO, Ivan *et al.* Analysis of the ornamental fish exports from the Amazon State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 46, n. 4, mar. 2021.
- VADASSERY, Divya; PILLAI, Devika. Quorum quenching potential of Enterococcus faecium QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1333-1343, jan. 2020.
- VELAPPAN, Muralidharan; MUNUSAMY, Deecaraman. Pathological investigation of gill, intestine, liver and kidney of naturally infected Streptococcus in ornamental fish, tiger oscar, *Astronotus ocellatus*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 11, n. 6, p. 2549-2554, aug. 2018.
- VERSCHUERE, Laurent *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, dec. 2000.
- VIEIRA, Felipe *et al.* In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 8, p. 998-1004, ago. 2013.
- WALCZAK, N.; PUK, K.; GUZ, L. Bacterial flora associated with diseased freshwater ornamental fish. **Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 445-449, dec. 2017.
- WANJA, Daniel *et al.* Fish husbandry practices and water quality in central Kenya: potential risk factors for fish mortality and infectious diseases. **Veterinary medicine international**, v. 2020, mar. 2020.
- WEITZMAN, M.; WEITZMAN, S. Lebiasinidae (Pencil fishes). Em: **Check list of the freshwater fishes of South and central America**. R.E. Reis, S.O. Kullander, & C. J. Ferraris, J (eds). EdiPURCS, Porto Alegre, p. 241- 250, 2003.
- YAMASHITA, M. *et al.* Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 1235-1243, feb. 2017.

ZHANG, Hai *et al.* Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* C20015 on growth, immunity, and disease resistance in koi carp. **Aquaculture International**, v. 28, p. 1797-1809, may. 2020.

ZIVKOVIC, R. Probiotics of microbes against microbes. **Acta Med. Croatica**, v. 53, n. 1, p. 23-28, jan. 1999.

CAPÍTULO 1

***In vitro* bacterial probiotic selection from *Nannostomus beckfordi*, an Amazon ornamental fish**

Artigo aceito para publicação na revista: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (V. 74, n. 1, 2022)

**Seleção *in vitro* de bactérias probióticas do peixe ornamental
Amazônico *Nannostomus beckfordi***

[*In vitro* bacterial probiotic selection from *Nannostomus beckfordi*, an
Amazon ornamental fish]

E.M. Lopes¹, A.V. Silva¹, M.V.S. Couto¹, F.A.L. Barros¹, A.F.L. Santos¹, C.A.M. Cordeiro¹,
P.E.G. Paixão², R.Y. Fujimoto³, N.C. Sousa^{1*}

¹ Universidade Federal do Pará, *Campus* Bragança, Bragança, PA, Brasil. *Autor correspondente: natal.engpesca@gmail.com

²Pós Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, Aracaju, SE, Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar e selecionar *in vitro* bactérias com potencial probiótico do peixe ornamental Amazônico *Nannostomus beckfordi*. Para o isolamento, retirou-se o intestino de 12 espécimes, que foram macerados, homogeneizados e semeados em placa de petri contendo Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS). Posteriormente ao crescimento bacteriano (48 horas a 35°C), as cepas selecionadas foram mantidas em caldo MRS e submetidas a testes de resistência a NaCl (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 e 3,0%), pH (4, 5, 6, 8 e 9) e sais biliares (5% p/v). O antagonismo foi realizado frente as bactérias patogênicas *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas jandaei*. Das cepas isoladas (23 cepas), apenas seis (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) apresentaram potencial probiótico. As cepas C1 e C6 tiveram maior resistência ($p < 0,05$) para o NaCl (0,5 e 1%) e pH (5 a 6), na presença de sais biliares somente a C1 teve a melhor resistência de crescimento. Para o antagonismo frente as bactérias patogênicas, a C1 apresentou halo de inibição maior que 9 mm. Sendo esta cepa bactéria (C1) identificada como *Enterococcus faecium* 11037 CHB. Portanto, este é o primeiro relato do isolamento da bactéria autóctone *E. faecium* em *N. beckfordi* com potencial probiótico.

Palavras-chave: peixe ornamental amazônico, probiótico autóctone, ensaio *in vitro*

ABSTRACT

This study aimed to isolate and select *in vitro* bacteria with probiotic potential for the Amazon ornamental fish *Nannostomus beckfordi*. For isolate, twelve fish underwent surgery procedure to remove their intestinal tract, macerate and then inoculate in the plate petri containing de Man Rugosa Sharped Agar (MRS). After bacterial growth (48 hours at 35°C),

selected strains were inoculated in MRS broth and submitted to resistance test with NaCl (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0%), pH (4, 5, 6, 8 and 9) and bile salts (5% w/v). Inhibition test against pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas Jandaei* was also performed. Within the isolated strains group (23 strains), only six (S1, S2, S3, S4, S5 and S6) showed probiotic potential. Strains S1 and S6 showed the greater resistance for NaCl (0.5% and 1%) and pH (5 and 6), but only S1 obtained better results to resist the bile salts. Even against pathogenic bacteria, the S1 showed the best results with inhibition halos greater than 9 mm. In the end, this bacterial strain (S1) was identified as *Enterococcus faecium* 11037CHB. Thus, this is the first report regarding isolated autochthonous bacterium *E. faecium* with probiotic potential of *N. beckfordi*.

Keywords: Amazon ornamental fish, autochthonous probiotic, *in vitro* assay

INTRODUÇÃO

A piscicultura ornamental é uma atividade economicamente rentável (FAO, 2017; Evers *et al.*, 2019), contudo, a intensificação nos sistemas de cultivo, aumentou a incidência de doenças, ocasionado surtos de mortalidade dos peixes (Walczak *et al.*, 2017; Shameena *et al.*, 2020). Neste cenário, manter o bem estar animal é fundamental para o sucesso no cultivo de peixes ornamentais. Assim, o uso de probiótico vem demonstrando resultados promissores como imunostimulante e antagônico às enfermidades, tornando-se uma estratégia na prevenção às doenças, resultando no aumento da produção (Sousa *et al.*, 2019; Jatobá *et al.*, 2018; Yamashita *et al.*, 2020). Estes efeitos benéficos com o uso de dietas suplementadas com probiótico, já foram confirmados em *P. scalare* (Dias *et al.*, 2019), *Carassius auratus* (Jinendiran *et al.*, 2019), *Danio rerio* (Mohammadi *et al.*, 2019) e *Poecilia latipinna* (Ahmadifard *et al.*, 2019).

Entretanto, a maioria dos probiótico aplicados na piscicultura ornamental é de fonte alóctone (Anuar *et al.*, 2017), que em muitos casos, não proporciona os efeitos benéficos ao hospedeiro (Marengoni *et al.*, 2010). Desta forma, a obtenção de cepas bacterianas específicas da própria espécie animal (probióticos autóctones) possibilita maior capacidade na colonização do intestino, pois essas bactérias apresentam maior resistência as barreiras fisiológicas do hospedeiro (Dias *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2019; Yamashita *et al.*, 2020). Assim, os ensaios *in vitro*, são importantes para verificar a resistência das bactérias em condições ambientais que apresentem variações de NaCl, pH, sais biliares além da capacidade de inibir bactérias patogênicas (Paixão *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2019). Critérios esses essenciais para selecionar cepas com potencial probiótico, e assim garantir os efeitos benéficos ao hospedeiro (Dias *et al.*, 2019; Paixão *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2019). Dentre os grupos de bactérias probióticas

autóctones, destacam-se as ácidos lácticas como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* e *Weissella cibaria* com efeitos benéficos aos peixes (Mouriño *et al.*, 2016; Jatobá *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2019; Yamashita *et al.*, 2020).

Os peixes ornamentais amazônicos são apreciados na aquarofilia nacional e internacional, devido aos padrões de cores e formato. Dentre as espécies de interesse, destaca-se o *N. beckfordi* da família Lebiasinidae, com formato fusiforme, comportamento pacífico e coloração avermelhada nas nadadeiras (Weitzman e Weitzman, 2003; ABE *et al.*, 2019).

Diante do contexto, não há informações sobre a seleção ou até mesmo a aplicabilidade de bactéria autóctone com potencial probiótico no cultivo de *N. beckfordi*. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e selecionar *in vitro* uma cepa de bactéria com potencial probiótico do peixe ornamental amazônico *N. beckfordi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para isolamento das bactérias ácido lácticas, foram utilizados 12 espécimes de *N. beckfordi* ($0,332 \pm 0,05$ g e $3,59 \pm 0,20$ cm) saudáveis, oriundos do ambiente natural (SISBIO 19515). Os peixes foram anestesiados com banho de imersão em solução de benzocaina (60 mg.L^{-1}) (Romaneli *et al.*, 2018) e eutanasiados pela secção medular, todos os procedimentos nos animais foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA –protocolo 16/2018). O intestino foi removido, homogeneizado em solução salina estéril (0,65%), diluídos em série (fator 1:10) e semeados em placa de petri contendo Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS), com adição de 1% de azul de anilina, as placas foram mantidas em estufa por 48 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (Mouriño *et al.*, 2016; Paixão *et al.*, 2019).

As colônias (cocos e bacilos) selecionadas pelas características de serem gram positiva, catalase negativa e afinidade com azul de anilina, foram inoculadas em meio de cultura em caldo (MRS) e mantidas por 24h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (Jatobá *et al.*, 2008; Mouriño *et al.*, 2016). Para a cinética de crescimento, as cepas com potencial probiótico foram inoculadas em tubos *falcon* (1:10) e em placa de petri de acordo com a metodologia de Paixao *et al.* (2019), para determinar a maior taxa de crescimento e a concentração final do inóculo (UFC.mL^{-1}).

A resistência das cepas em ensaio *in vitro*, foi realizada em delineamento inteiramente casualizado com diferentes concentrações de NaCl (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 e 3,0%), pH (4, 5, 6, 8 e 9) e a presença de sais biliares (5% p/v), todos em triplicata. Foram mantidos por 24 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente, as reduções percentuais na absorbância foram analisadas por espectrofotometria a 630 nm (Dias *et al.*, 2019; Paixão *et al.*, 2019).

Para o antagonismo frente a bactérias patogênicas, as cepas isoladas foram inoculadas em Ágar MRS por 48 horas a 35 °C, posteriormente, retirou-se três discos de 0,8 cm, que foram alocados em placas de petri contendo o meio de cultura ágar Triptona de Soja, previamente inoculadas com *Aeromonas hydrophila* (CPQBA22808 DRM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Streptococcus Agalactiae* (LAQUA) e *Aeromonas jandaei* (LAQUA), todos em triplicatas. Após o período de crescimento (35°C a 48 horas), foi determinando o halo de inibição (mm) (Dias *et al.*, 2019). A cepa bacteriana com potencial probiótico selecionada após os testes *in vitro* foi identificada por espectrometria de massa pela técnica de MALDI-TOF (Microflex) (Paixão *et al.*, 2019, Sousa *et al.* 2019).

Os dados foram submetidos ao teste de premissas de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene's), e então submetidos à análise de variância (ANOVA), posteriormente, realizou-se o teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre as médias. Os dados de percentual de absorvância foram transformados em raiz quadrada e as contagens microbiológicas transformadas em $\log(x + 1)$.

RESULTADO

Foram selecionadas 23 cepas em ágar MRS, sendo que seis cepas (Cp₁, Cp₂, Cp₃, Cp₄, Cp₅ e Cp₆) apresentaram características para os ensaios *in vitro* (gram positiva, catalase negativa e afinidade por azul de anilina). Destas, quatro cepas (Cp₁, Cp₃, Cp₅ e Cp₆) tiveram a maior taxa de crescimento por hora, atingindo a concentração máxima de 10^9 UFC.mL⁻¹ em 24h (tabela 1). No ensaio *in vitro*, o maior crescimento ($p < 0,05$) bacteriano foi observado para as cepas Cp₁ e Cp₆ nas concentrações de 0,5 e 1 % de NaCl (%) e na faixa de pH entre 5 e 6 (tabela 1). Na presença de sais biliares (5%), a maior resistência foi observada para a Cp₁, seguida da Cp₅ e Cp₆ (tabela 1).

Todas as cepas apresentaram halo de inibição frente aos patógenos, contudo, a Cp₁ apresentou maior atividade antagônica, com halo acima de 9 mm, a todos os patógenos testados (tabela 2). O menor halo de inibição observado, foi para a Cp₅ aos patógenos *A. jandaei* e *S. Agalactiae* (tabela 2). A cepa com melhores resultados nos testes de resistência e com maior atividade antagônica, foi identificada como *Enterococcus faecium* 11037 CHB (MALDI-TOF score de 2,13).

Tabela 1: Taxa de crescimento máximo por hora (TCM por hora = Log UFC. mL⁻¹), concentração final após crescimento em 24h (UFC.mL⁻¹) e o percentual (%) de crescimento a diferentes concentrações de NaCl (%), pH e sais biliares (5%) das cepas de bactérias isoladas do trato intestinal do *N. beckfordi*.

Cepas	TCM.h ⁻¹	Concentração final	NaCl (0,5)	NaCl (1,0)	NaCl (1,5)	NaCl (2,0)	NaCl (2,5)	NaCl (3,0)
CP ₁	0,77±0,02a	2,7±0,12 x10 ⁹ a	78,7±1,83a	75,26±0,72a	64,38±1,33a	54,15±0,79a	51,49±1,52a	43,94±0,98a
Cp ₂	0,67±0,03b	1,8±0,11 x10 ⁸ b	63,02±4,97b	64,51±2,16c	58,92±1,77b	52,28±1,02a	47,36±0,98b	28,75±1,64d
Cp ₃	0,78±0,03a	2,6±0,18 x10 ⁹ a	70,64±3,56ab	68,46±1,40bc	46,32±1,67c	40,58±1,61b	48,42±0,87ab	29,72±0,86d
Cp ₄	0,65±0,04a	2,2±0,19 x10 ⁸ b	72,75±3,59a	70,26±1,23b	43,13±2,08c	39,77±1,75b	50,37±1,59ab	33,81±1,14c
Cp ₅	0,77±0,02a	2,7±0,11 x10 ⁹ a	71,80±2,55ab	69,06±1,53b	65,10±1,73a	54,07±1,75a	50,98±0,99a	39,20±1,13b
CP ₆	0,76±0,04a	2,6±0,12 x10 ⁹ a	73,03±2,60a	74,01±1,32a	65,76±2,49a	54,60±1,159a	50,78±1,11a	43,24±0,92a
Valor -p	0,00162	0,00140	0,00686	0,00097	0,00001	0,00003	0,00691	0,00018
Cepas	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8	pH 9	Sais Biliares		
CP ₁	23,29±0,54a	79,37±0,84a	84,94±1,12a	40,94±0,89a	38,33±0,66a	59,30±3,01a		
Cp ₂	22,43±0,72a	66,03±1,04c	71,75±0,92b	39,02±0,37b	34,74±0,97b	28,85±3,14cd		
Cp ₃	8,77±0,85b	68,49±0,71b	70,61±1,02b	31,88±0,59c	18,85±0,76c	34,86±3,26c		
Cp ₄	9,32±0,45b	67,62±0,85bc	69,34±1,30b	40,19±1,02ab	18,23±0,75c	21,78±2,09d		
Cp ₅	21,69±0,84a	62,19±0,81d	56,49±0,98c	38,72±0,47b	37,93±0,88a	48,26±2,29 b		
CP ₆	23,30±0,87a	77,15±0,95a	85,60±1,02a	41,26±0,45a	36,21±0,44	55,88±3,37ab		
Valor -p	0,00043	0,00217	0,00001	0,00011	0,00317	0,00402		

Valores (média ± desvio padrão) com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 2: Halo de inibição (mm) das cepas bacterianas candidatas a probióticas para *N. beckfordi* contra os patógenos *A. hydrophila* (AH), *A. jandaei* (AJ), *P. aeruginosa* (PA) e *S. agalactiae* (AS).

	AH	AJ	PA	SA
CP ₁	9,66±0,57a	12,41±0,74a	11,74±0,56 ^a	11,61±0,48a
Cp ₂	9,73±0,51a	9,68±0,58b	9,01±0,23c	9,08±0,17b
Cp ₃	8,27±0,67b	12,36±0,56a	10,38±0,57b	11,36±0,58a
Cp ₄	9,05±0,39ab	9,74±0,61b	9,03±0,15c	9,42±0,57b
Cp ₅	9,73±0,57a	1,33±0,61c	9,39±0,54bc	1,66±0,57c
CP ₆	9,88±0,24a	10,87±0,32a	12,21±0,42a	9,44±0,48b
Valor -p	0,01524	0,00321	0,00029	0,00012

Valores (média± desvio padrão) com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

DISCUSSÃO

Na piscicultura ornamental há relatos dos efeitos benéficos do uso de probiótico ao hospedeiro (Anuar *et al.*, 2017; Paixão *et al.*, 2020), contudo, escassas são as informações sobre a seleção e isolamento de bactérias autóctone nas espécies amazônicas. Foi relatado até o momento a utilização da bactéria autóctone *E. faecium* na espécie amazônica *P. scalare* oriundo de cultivo (Dias *et al.*, 2019). No presente estudo a cepa *E. faecium* isolada de *N. beckfordi*, oriundo do ambiente natural, apresentou maiores valores de resistência nos ensaios *in vitro* e atividade antagônica e maior velocidade de crescimento, podendo aumentar as chances de colonização no intestino e assim garantir efeitos benéficos espécie específicos no *N. beckfordi*. Uma vez que a colonização é o critério essencial para validar o potencial probiótico da bactéria isolada para o animal (Sousa *et al.*, 2019; Yamashita *et al.*, 2020).

Os sais biliares são produzidos pelo hospedeiro para a emulsificação dos lipídios, que durante o processo de digestão atuam como bactericida (Jahangiri *et al.*, 2018; Brandvold *et al.*, 2019), podendo reduzir o crescimento de bactérias, como observado em *L. plantarum* isolada de *Amphiprion ocellaris* (Paixão *et al.*, 2019), porém no presente estudo a CP₁ (*E. faecium*) apresentou resistência à presença de sais biliares com crescimento acima de 60%, similar aos achados de Dias *et al.* (2019) para *E. faecium* isolada de *P. scalare*. A resistência do *E. faecium* aos sais biliares é relacionada com a expressão do gene *gltK* presente nesta bactéria (Zhang *et al.*, 2013).

Outro critério que vem sendo abordado para seleção destas bactérias são as diferentes concentrações de NaCl, pois alterações na concentração iônica do hospedeiro no sistema digestivo pode afetar a viabilidade da bactéria probiótica, provocando o rompimento na membrana deste microrganismo (Moniruzzaman *et al.*, 2018; Mortezaei *et al.*, 2020), corroborando ao relato de Viera *et al.* (2013), que não observaram o crescimento de *L. plantarum* na concentração de 1,5% de NaCl. No presente estudo, observou-se crescimento das cepas no meio de cultura com adição de 0,5 a 3% de NaCl, principalmente para a *E. faecim* (CP₁), similaridade observada também para as bactérias probióticas *E. faecim*, *Lactococcus lactis* e *Weissella oryzae* (Dias *et al.*, 2019; Mortezaei *et al.*, 2020).

A resistência bacteriana aos diferentes valores de pH é importante para a seleção de bactérias com potencial probiótico, pois a acidez estomacal do hospedeiro pode reduzir em até 100% a densidade das bactérias (Girijakumari *et al.*, 2018) inviabilizando sua colonização no intestino (Sousa *et al.*, 2019). Neste estudo, observou-se crescimento de todas as cepas, tanto em pH ácido (4) como no alcalino (9), com melhores resultados de crescimento na faixa de pH ácido 5 e 6. Diferente do observado por Dias *et al.* (2019) e Girijakumari *et al.* (2018) para *P. scalare* e *Maylandia lombardoi*, que tiveram redução de 100% no crescimento de cepas selecionadas em pH ácido (5 e 2, respectivamente).

O antagonismo perante as cepas probióticas, é um dos efeitos benéficos mais importantes para cultivo de peixes, uma vez que a liberação de substâncias inibitórias pode afetar o crescimento de bactérias patogênicas, minimizando os efeitos danosos ao animal (Dias *et al.*, 2018; Yamashita *et al.*, 2020). A bactéria *E. faecium* teve halo inibição maior que 9 mm frente as quatro bactérias patogênicas testadas, principalmente contra *A. jandaei*. Este efeito antagônico já foi relatado contra *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *A. veronii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (Dias *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2020), sendo relacionada com a liberação de compostos ácidos lácticos, peróxidos de hidrogênio e produção de bacteriocinas (Ng *et al.*, 2020).

CONCLUSÃO

Portanto, a cepa *E. faecium* é primeiro relato de bactérias autóctone de *N. beckfordi* com características probióticas, com adequado crescimento em situações adversas e atividade inibitória contra bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.A.; DIAS, J.A.R.; SOUSA, N.D.C. *et al.* Growth of Amazon ornamental fish *Nannostomus beckfordi* larvae (Steindachner, 1876) submitted to different stocking densities and feeding management in captivity conditions. *Aquac. Res.*, v.50, p.2276-2280, 2019.
- 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 Antimicrob. Proteins*, v.11, p.957-965, 2019.
- 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.
- BRANDVOLD, K.R.; WEAVER, J.M.; WHIDBEY, C.; WRIGHT, A.T. A continuous fluorescence assay for simple quantification of bile salt hydrolase activity in the gut microbiome. *Sci. Reprod.*, v.9, p.1359, 2019.
- DIAS, J.A.R.; ABE, H.A.; SOUSA, N.C. *et al.* *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). *Aquac. Int.*, v.27, p.463-474, 2019.
- 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.
- FOOD and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy: FAO, 2017. p.38-39. (FAO Aquaculture Newsletter, Abril, nº 56).
- GIRIJAKUMARI, N.R.; ETHIRAJA, K.; MARIMUTHU, P.N. *In vitro* and *in vivo* evaluation of probiotic properties of *Enterobacter cloacae* in Kenyi cichlid, *Maylandia lombardoi*. *Aquac. Int.*, v.26, p.959-980, 2018.
- JATOBÁ, A.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, L.M. *et al.* Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.70, p.327-332, 2018.
- 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 goldfish (*Carassius auratus*) by dietary supplementation with *Exiguobacterium acetylicum* S01. *Fish Shellfish Immunol.*, v.84, p.458-469, 2019.

- KHAN, M.I.R.; CHOUDHURY, T.G.; KAMILYA, D. *et al.* Characterization of *Bacillus* spp. isolated from intestine of *Labeo rohita* - Towards identifying novel probiotics for aquaculture. *Aquac. Res.*, v.52, p.822-830, 2021.
- MAO, Q.; SUN, X.; SUN, J. *et al.* A candidate probiotic strain of *Enterococcus faecium* from the intestine of the crucian carp *Carassius auratus*. *AMB Expr.*, v.10, p.40, 2020.
- MARENGONI, N.G.; ALBUQUERQUE, D.M.; MOTA, F.L.S. *et al.* Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob à inclusão de probiótico em água mesohalina. *Arch. Zootec.*, v.59, p.403-414, 2010.
- MOHAMMADI, A.M.; SALATI, A.P.; SAFARI, O.; KEYVANSHOKOOH, S. Dietary supplementation effects of *Pediococcus acidilactici* as probiotic on growth performance, digestive enzyme activities and immunity response in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquacult. Nutr.*, v.25, p.854-861, 2019.
- MONIRUZZAMAN, M.; MUKHERJEE, J.; JACQUIN, L. *et al.* Physiological and behavioural responses to acid and osmotic stress and effects of *Mucuna* extract in Guppies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.163, p.37-46, 2018.
- MORTEZAEI, F.; ROYAN, M.; NAVIRIAN, H.A. *et al.* *In vitro* assessment of potential probiotic characteristics of indigenous *Lactococcus lactis* and *Weissella oryzae* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J. Appl. Microbiol.*, v.129, p.1004-1019, 2020.
- MOURIÑO, J.L.P.; VALE PEREIRA, G.; VIEIRA, F.N. *et al.* Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): a haematological approach. *Aquac. Reprod.*, v.3, p.166-171, 2016.
- NG, Z.J.; ZARIN, M.A.; LEE, C.K. *et al.* Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* DSM 20477 with ability to secrete antimicrobial substance for the inhibition of oral pathogen *Streptococcus mutans* UKMCC 1019. *Arch. Oral Biol.*, v.110, p.104617, 2020.
- PAIXÃO, P.E.G.; COUTO, M.V.S.; SOUSA, N.C. *et al.* Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion Ocellaris*. *Aquaculture*, v.526, p.735395, 2020a.
- PAIXÃO, P.E.G.; COUTO, M.V.S.; SOUSA, N.C. *et al.* *In vitro* selection of autochthonous lactic acid bacterium from clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquac. Res.*, v.51, p.848-851, 2020b.

- SHAMEENA, S.S.; KUMAR, K.; KUMAR, S. *et al.* Virulence characteristics of *Aeromonas veronii* biovars isolated from infected freshwater goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture*, v.518, p.734819, 2020.
- SOUSA, N.C.; COUTO, M.V.S.; ABE, H.A. *et al.* Effects of an *Enterococcus faecium*-based probiotic on growth performance and health of Pirarucu, *Arapaima gigas*. *Aquac. Res.*, v.50, p.3720-3728, 2019.
- SOUSA, N.C.; SILVA, J.A.; MONTEIRO, E.L. *et al.* Enriched Artemia Nauplii with Commercial Probiotic in the Larvicul-ture of Angelfish *Pterophyllum scalare* Lichtenstein (1823). *J. Fish. Sci.*, v.2, p.17-21, 2020.
- SYLVAIN, F.É.; CHEAIB, B.; LLEWELLYN, M. *et al.* pH drop impacts differentially skin and gut microbiota of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Sci. Reprod.*, v.6, p.1-10, 2016.
- VIEIRA, F.D.N.; JATOBÁ, 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.
- WEITZMAN, M.; WEITZMAN, S.H. Family lebiasinidae (pencil fishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C. J. (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 2003. p.241-250.
- YAMASHITA, M.M.; FERRAREZI, J.V.; VALE PEREIRA, G. *et al.* Autochthonous vs allochthonous probiotic strains to *Rhamdia quelen*. *Microb. Pathog.*, v.139, p.103897, 2020.
- ZHANG, X.; BIERSCHENK, D.; TOP, J. *et al.* Functional genomic analysis of bile salt resistance in *Enterococcus faecium*. *BMC Genom.*, v.14, p.299, 2013.
- WALCZAK, N.; PUK, K.; GUZ, L. Bacterial flora associated with diseased freshwater ornamental fish. *J. Vet. Res.*, v. 61, n. 4, p. 445-449, 2017.
- ANUAR, N. S.; OMAR, N. S.; NOORDIYANA, M. N. *et al.* Effect of commercial probiotics on the survival and growth performance of goldfish *Carassius auratus*. *Aquac. Aquar. Conserv. Legis*, v. 10, n. 6, p. 1663-1670, 2017.
- PAIXÃO, P.E.G.; COUTO, M.V.S.; SOUSA, N.C. *et al.* *In vitro* selection of autochthonous lactic acid bacterium from (clownfish *Amphiprion ocellaris*). *Aquac. Res.*, v.00, p.1-4, 2019.

ROMANELI, R. D. S.; BOARATTI, A. Z.; RODRIGUES, A. T.; QUEIROZ, D. M. D. A. *et al.* Efficacy of benzocaine, eugenol, and menthol as anesthetics for freshwater angelfish. *J. Aquati. Anim. Health*, v.30, n.3, p. 210-216, 2018.