



Universidade Federal do Oeste do Pará
Programa de Pós-Graduação em Biociências

**PROSPEÇÃO E USO DE PROBIÓTICOS AUTÓCTONE ISOLADOS DO INTESTINO DE
Colossoma Macropomum NO DESEMPENHO ZOTÉCNICO E NA PROFILAXIA DA
AEROMONOSE NA LARVICULTURA DE TAMBAQUI**

Thayná Moura dos Santos
Biotecnologista
Aluna de Pós-Graduação em Biociências

Santarém, Pará.
2023



Universidade Federal do Oeste do Pará
Programa de Pós-Graduação em Biociências

**PROSPECÇÃO E USO DE PROBIÓTICOS AUTÓCTONE ISOLADOS DO INTESTINO DE
Colossoma Macropomum NO DESEMPENHO ZOTÉCNICO E NA PROFILAXIA DA
AEROMONOSE NA LARVICULTURA DE TAMBAQUI**

Thayná Moura dos Santos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Biociências no Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Michelle Midori Sena Figimura

Santarém, Pará.
2023



Universidade Federal do Oeste do Pará
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ATA Nº 1

Aos 21 dias do mês de julho do ano de dois mil vinte e três, às 14h, no auditório do NTB, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado da aluna THAYNÁ MOURA DOS SANTOS. A banca examinadora foi composta pelos professores: Dra. SILVIA ELENA PLAUL, UNLP, Universidad Nacional de La Plata, examinador externo, Dra., GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNANDES, UFOPA, examinador interna, GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO, UFOPA, orientador. Deu-se início a abertura dos trabalhos, por parte do professor Gustavo, orientador, que de imediato solicitou a(o) candidato (a) que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada PROSPECÇÃO E USO DE PROBIÓTICOS AUTÓCTONE ISOLADOS DO INTESTINO DE Colossoma Macropomum NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E NA PROFILAXIA DA AEROMONOSE NA LARVICULTURA DE TAMBAQUI, marcando um tempo de 30 minutos para a apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Gustavo, presidente, passou a palavra ao examinador externo, SILVIA, para argüir o (a) candidato (a), e, em seguida, a examinador interno, GRACIENE; após o que fez suas considerações sobre o trabalho em julgamento; tendo sido aprovado a candidata, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo de 30 dias; contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa.

Dra. SILVIA ELENA PLAUL

Examinadora Externa à Instituição

Dr. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA

Examinador Externo à Instituição
Documento assinado digitalmente



GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNANDES, UFOPA
Data: 04/08/2023 18:13:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. GRACIENE

DES, UFOPA

Examinadora Interna



Documento assinado digitalmente
GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO
Data: 09/08/2023 17:40:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO, UFOPA

Presidente



Documento assinado digitalmente
THAYNÁ MOURA DOS SANTOS
Data: 18/08/2023 08:47:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

THAYNÁ MOURA DOS SANTOS

Mestranda



Universidade Federal do Oeste do Pará
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

FOLHA DE CORREÇÕES

ATA Nº 1

Autor: THAYNÁ MOURA DOS SANTOS

Título: PROSPECÇÃO E USO DE PROBIÓTICOS AUTÓCTONE ISOLADOS DO INTESTINO DE *Colossoma Macropomum* NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E NA PROFILAXIA DA AEROMONOSE NA LARVICULTURA DE TAMBAQUI

Banca examinadora:

Prof. SILVIA ELENA PLAUL

Examinadora Externa à
Instituição

Prof. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA
Instituição

Examinador Externo à

Prof. GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA
FERNANDES

Examinadora Interna

Prof. GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO

Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNAN
Data: 04/08/2023 18:14:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO
Data: 09/08/2023 17:41:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Os itens abaixo deverão ser modificados, conforme sugestão da banca

1. [] INTRODUÇÃO
2. [] REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3. [] METODOLOGIA
4. [] RESULTADOS OBTIDOS
5. [] CONCLUSÕES

COMENTÁRIOS GERAIS:

El trabajo realizado por la estudiante THAYNÁ MOURA DOS SANTOS para su maestría fue muy interesante, ya que evaluar la viabilidad y la eficacia de algunos compuestos para su uso como probióticos, en este trabajo aislados del intestino de adultos de *Colossoma macropomum* para utilizarlos en las larvas de la misma especie. Este tipo de emprendimientos cobra particular valor por trabajar con especies importantes en acuicultura, no generar impacto ambiental y ser aplicable para el control sanitario de los peces con fines de consumo, comercialización o repoblamiento.

Declaro, para fins de homologação, que as modificações, sugeridas pela banca examinadora, acima mencionada, foram cumpridas integralmente.

Av. Vera Paz, s/nº, Salé, CEP 68135-110 – Santarém – PA – Brasil Telefax: •



Universidade Federal do Oeste do Pará
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Prof. GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO

Orientador(a)

Documento assinado digitalmente



GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO

Data: 09/08/2023 17:38:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- S237p Santos, Thayná Moura dos
 Prospecção e uso de probióticos autóctone isolados no intestino de *Colossoma macropomum* no desempenho zootécnico e na profilaxia da aeromonose na larvicultura de tambaqui. / Thayná Moura dos Santos. – Santarém, 2023.
 87 p. : il.
 Inclui bibliografias.
- Orientador: Gustavo da Silva Claudiano.
 Coorientadora: Michelle Midori Sena Figimura.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Floresta, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Bactérias lácticas. 2. Produção animal. 3. Endêmico. 4. Peixe nativo. 5. Larva de peixe. I. Claudiano, Gustavo da Silva, *orient.* II. Figimura, Michelle Midori Sena, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 639.31

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

Dedico,

Aos meus amados pais, e melhores amigos, Diná e Izaías, os quais nunca mediram esforços para que pudesse conquistar meus maiores sonhos e projetos. A eles que sempre seguraram nas minhas mãos e estiveram ao meu lado nos dias bons e não tão bons. Aqueles que me ensinaram respeito, cuidado, perseverança, fé, bondade e humildade. Aos maiores exemplos que poderia ter. Tudo sempre será para vocês e por vocês. Com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por todo amor, carinho e cuidado que sempre teve comigo; pelas lágrimas que enxugou, pela coragem e perseverança que colocou no meu coração; pelas pessoas maravilhosas que permitiu que cruzassem o meu caminho, tudo cooperando para que chegasse até aqui. “Eu sozinho nunca andei, jamais me abandonaste. Minha herança és Tu, minha força e proteção. Em Ti confiarei Tu vais a frente. És meu libertador. Sozinho nunca andarei. Cada hora, cada instante, sempre estavas ali. És fiel, sempre fiel a mim. Nas vitórias e fracassos, Tu és leal a mim. És fiel. Sempre fiel a mim”.

Sou grata aos meus pais, os mais maravilhosos do mundo, os quais mesmo sem entender muito bem, ou nada, do que faço, SEMPRE estão apoiando e incentivando. Vocês são incríveis e serei eternamente grata por tudo o que fizeram e fazem. Ao meu irmão, Diorlando, e cunhada, Talyta pelo cuidado e incentivo de sempre. À minha irmã, Nira e toda sua família, que mesmo de longe sempre se mantém presente, incentivando e ajudando de todas as formas que pode. E não menos importante ao Caio Machado pelas horas de paciência cedidas ouvindo reclamações, choros, e muitas vezes me acompanhando madrugadas a fio para que não ficasse sozinha. Sim, eu tenho uma família incrível.

Jamais poderia deixar de agradecer ao meu querido orientador, o Boss, Gustavo Claudiano, por todo o suporte durante esses anos, pelas palavras de incentivo, puxões de orelha, e aprendizado. O senhor é o melhor e sabe disso. Aos queridos professores Michelle Fugimura e Luciano Jansen. Desconheço outrem com tamanha paciência, boa vontade, simpatia e cuidado ao ensinar. Muito obrigada, queridos pelo acolhimento e todos os ensinamentos.

Meu eterno agradecimento as meninas do grupo de pesquisa Gesaqui, especialmente as integrantes do TSA, Layana, Laine, Andrya, Graziela, Larissa e Vívian. Vocês foram incríveis! Quando não eram meu braço direito, eram as minhas pernas também. Obrigada pelas histórias, risadas, e por todo cuidado na execução de todo o trabalho. Saibam que esse projeto jamais teria chegado onde chegou sem a participação de vocês.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Produção mundial e brasileira de pescado	19
2.2 Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	21
2.3 Problemática: Uso demasiado de antimicrobianos	24
2.4 Probióticos	27
2.5. Probióticos na aquicultura	32
2.6 Utiização de probióticos na larvicultura	36
3. OBJETIVOS	41
3.1 Geral	41
3.2 Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Obtenção e viabilidade de probióticos isolados de tambaquis saudáveis	42
4.1.1 Microrganismos e condição de cultura	42
4.1.2 Triagem: Teste de Gram, Catalase e Atividade Hemolítica	43
4.2 Reação em cadeia da polimerase do fragmento do gene 16S	44
4.3 Capacidade Anti- <i>Aeromonas</i>	44
4.4 Análise da resistência bacteriana	45
4.5 Viabilidade e crescimento em diferentes pH.	46
4.6 Teste de Auto-agregação	46
4.7 Teste de Co-agregação	46
4.8 Hidrofobicidade	47
4.9 Formação de biofilme	47
4.10 Resistência a bile	48
4.11 Teste de patogenicidade <i>in vivo</i>	48
4.12 Análise da eficácia <i>in vivo</i> utilizando como modelo experimental larvas de <i>Colossoma macropomum</i> : desempenho zootécnico e sanidade	49
4.12.1 Larvas e delineamento experimental	49
4.12.2 Preparo do alimento vivo (<i>Artêmia salina</i>) e enriquecimento com probiótico.	49
4.12.3 Preparo da ração	50
4.12.4 Análise Microbiológica	51
4.12.5 Infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i>	51
4.13 Análise estatística.....	52

5. RESULTADOS	53
5.1 Isolamento, classificação morfológica, tintorial e potencial patogênico/virulência.	53
5.2 PCR eletroforese em gel	54
5.3 Capacidade Anti- <i>Aeromonas</i>	54
5.4 Análise da resistência bacteriana.	56
5.5 Viabilidade e crescimento após cultivo em diferentes faixas de pH e sais biliares.	57
5.6 Teste de Auto-agregação e Co-agregação	59
5.7 Hidrofobicidade	61
5.8 Formação de biofilme	62
5.9 Teste de patogenicidade	62
5.10 Teste <i>in vivo</i> utilizando como modelo experimental larvas de <i>Colossoma macropomum</i> - Desempenho zootécnico e resistência a <i>A. hydrophila</i>	65
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Lista de Figuras

Figura 1 - Crescimento da produção de peixes de cultivo no Brasil entre os anos de 2010 a 2022.....	20
Figura 2 - Juvenil de tambaqui (<i>C. macropomum</i>).....	21
Figura 3 - Larva de tambaqui (<i>C. macropomum</i>).....	23
Figura 4 - Naúplio de <i>Artêmia salina</i>	39
Figura 5 - Representação esquemática correspondente a utilizada no ensaio de Atividade Hemolítica.....	43
Figura 6. Representação esquemática correspondente a utilizada no ensaio de Atividade Antagonista.....	45
Figura 7 - (A) Coleta do aparelho gastrointestinal de tambaqui. (B) Semeio direto de fragmento do intestino em ágar TSA. (C) Isolamento de cepa bacteriana. (D) Diluição seriada em ágar MRS com adição do corante Azul de Anilina.....	53
Figura 8 - Amplificação de fragmento de DNA das cepas isoladas, utilizando o primer Lac 1 e 2 em gel de agarose a 2%.....	54
Figura 9 - Análise quantitativa: tamanho em mm do halo de inibição formado pelas cepas isoladas de tambaqui, demonstrando capacidade anti- <i>Aeromonas</i>	55
Figura 10 - Inibição de crescimento de <i>A. hydrophila</i> por cepas bacterianas isoladas do intestino de tambaquis selvagens. (A) Controle. (B) I3. (C) I10. (D) F4. (E) M13. (F) M14.	55
Figura 11 - Análise da resistência bacteriana dos isolados. (A) Resistência ao fármaco Eritromicina. (B) Susceptibilidade ao antimicrobiano Oxitetraciclina.....	56

Figura 12 - Crescimento das cepas bacterianas isoladas de <i>Colossoma macropomum</i> durante 12 horas de cultivo em diferentes faixas de pH.....	58
Figura 13 - Contagem inicial e final do crescimento microbiano após incubação por 1 hora e 30 minutos em meio de cultura contendo 10% de sais biliares.....	59
Figura 14 - Gráfico demonstrando potencial de auto-agregação de cepas com potencial probiótico isoladas do intestino de tambaqui, no tempo teste de 5 horas.....	60
Figura 15 - Gráfico demonstrando potencial de co-agregação de cepas com potencial probiótico isoladas do intestino de tambaqui, no tempo teste de 5 horas.....	61
Figura 16 - Absorbância em 492 nm das cepas autóctones de Tambaqui para calculo do índice de formação de biofilme.....	62
Figura 17 - Delineamento experimental dos tratamentos no Laboratório de Comportamento Animal, na UFOPA. Delineamento inteiramente causalizado: (A) I3. (B) Grupo controle. (C) F4. (D) M14. (E) 10. (F) M13.....	63
Figura 18 - Análise morfológica de tambaqui juvenil após 14 dias de aplicação de suspensão bacteriana na cavidade celomática. A, B e C dentro da normalidade e ausência de alterações indicativas de patogenicidade.....	64
Figura 19 -Peso médio final e parâmetros de qualidade da água durante os 14 dias de teste de patogenicidade, utilizando suspensão de cepas com potencial probiótico em tambaquis juvenis.....	64
Figura 20 - Gráficos das médias dos parâmetros de qualidade da água durante os 15 dias de suplementação com cepas potenciais probióticos no alimento vivo <i>A. salina</i> e ração comercial.....	65
Figura 21 - Porcentagem das médias de sobrevivência de larvas de tambaqui após 15 dias de alimentação com alimento vivo, <i>A. salina</i> , e ração comercial suplementação com cepas potenciais probióticos.....	66
Figura 22 - Desenvolvimento das larvas do Tratamento M13 durante os 15 dias de	

suplementação em comparação ao tratamento controle. (A) Larva do Tratamento CTL com 15 dias de experimento demonstrando os padrões morfométricos analisados: Comprimento Total, Comprimento Padrão, Diâmetro do Olho e Altura da Cabeça. (B) Larva do Tratamento M13 com 5 dias de suplementação. (C) Larva do Tratamento M13 com 10 dias de suplementação. (D) Larva do tratamento M13 com 15 dias de suplementação.....67

Figura 23 – Morfometria de larvas de tambaqui, nos intervalos de 5, 10 e 15 dias, durante a suplementação com cepas de probióticos autóctone isolados do intestino de *Colossoma macropomum*. *** $p < 0.001$68

Figura 24 – Proteção após suplementação com cepas de probióticos autóctone isolados do intestino de *Colossoma macropomum* contra *Aeromonas hydrophila* em larvas de tambaqui por inoculação no sistema de cultivo. (A) Porcentagem de sobrevivência com teste de log rank entre os tratamentos *** $p < 0.001$; (B) Porcentagem da taxa de mortalidade (n = XX). C = controle; I3, I10, F4, M13, M14.....69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sensibilidade microbiana de cepas isoladas de Tabaqui a exposição a antimicrobianos comerciais. (-) Susceptível ; (+) Resistente. *Oxitetraciclina; *Streptomycin.....56

Tabela 2: Porcentagem e classificação de hidrofobicidade da superfície celular de bactérias isoladas do intestino de tabaqui.....61

Lista de Abreviaturas

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations
MRS - Man Rogosa & Sharpe
TSA - Trypticase Soy Agar
I3 - Intestino cepa 3
I10 - Intestino cepa 10
F4 - Fezes cepa 3
M13 - Mix intestino+fezes cepa 13
M14 - Mix intestino+fezes cepa 14
BAL - bactérias do ácido láctico
ARG - genes de resistência a antimicrobianos
ARB - bactérias resistentes aos antibióticos
TGI - trato gastrointestinal
RAS - sistema de recirculação de água
IBEF - Instituto de Biodiversidade e Florestas
ICTA - Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas
DL - dose letal
OD - Densidade ótica
UE - Unidade experimental
DIC - delineamento inteiramente casualizado
CTL - Controle
PB - proteína bruta
ED - energia digestível
UFC - unidade formadora de colônia

PROSPECÇÃO E USO DE PROBIÓTICOS AUTÓCTONE ISOLADOS DO INTESTINO DE *Colossoma Macropomum* NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E NA PROFILAXIA DA AEROMONOSE NA LARVICULTURA DE TAMBAQUI

RESUMO - O projeto objetivou investigar a viabilidade e a eficácia da suplementação com linhagens de bactérias lácticas isoladas da microbiota intestinal de tambaqui saudável, sobre as respostas fisiopatológica e zootécnica em larvas da mesma espécie desafiada *Aeromonas hydrophila*. Para tanto, foram adquiridos, de pescadores locais, 10 tambaquis, oriundos do Rio Amazonas, em Santarém-Pa. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico e retirado o aparelho gastrointestinal para semeadura em placa de Petri, contendo os meios TSA e MRS acrescido do corante Azul de Anilina. A cultura ocorreu a partir do semeio direto do conteúdo estomacal, intestinal e do mix (Intestino + fezes). Foram isoladas 115 cepas bacterianas, que passaram por análises de caracterização para investigar a viabilidade e potencial probiótico *in vitro*. Inicialmente foi realizado dos testes de Catalase e coloração de Gram, com a obtenção de 66 dos isolados positivos para as bactérias lácticas. Posteriormente, foi avaliada a atividade hemolítica dos bacilos positivos com catalase negativa, na qual 5 não apresentaram hemólise, sendo estes selecionados para as demais análises (I3, I10, F4, M13, M14). Para caracterização probiótica das bactérias foi verificado a viabilidade e crescimento de bactérias lácticas em diferentes pH (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) por 12 horas, bem como testes de resistência a bile, atividade antagonista, auto e coagregação, formação de biofilme, antibiograma, hidrofobicidade e liofilização. Para identificação molecular das espécies trabalhadas, foi realizada a PCR utilizando três primers: Lac 1 e 2, para *Lactobacillus* sp., Bac e 16S para *Bacillus* sp. e seus produtos foram separados em eletroforese em gel. A análises *in vitro*, realizou-se inicialmente pelo teste de patogenicidade em 30 tambaquis juvenis, divididos em 6 grupos, foi inoculado 0,5 mL dos isolados na cavidade celomática, onde verificou-se que não houve mortalidade e/ou alterações clínicas comportamentais ou teciduais em todos os animais. Na larvicultura foi verificado melhor no desempenho zootécnica nas cepas I3 e M13 em relação ao controle; sem alteração do desenvolvimento morfofisiológico. A sepse induzida nas larvas verificou-se melhora na sobrevivência e na imunidade inata das larvas suplementadas com M13 e M14. Os resultados preliminares obtidos nos testes vêm mostrando que os isolados, pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, apresentam características de potenciais probióticos para larvas de tambaqui. A prospecção de suas potencialidades tecnológicas e funcionais é de extrema importância para a produção aquícola sustentável.

Palavras-chave: bactérias lácticas, produção animal, endêmico, peixe nativo, larva de

PROSPECTION AND USE OF AUTOCHTHONE PROBIOTICS ISOLATED FROM THE INTESTINE OF *Colossoma Macropomum* IN ZOOTECHNICAL PERFORMANCE AND PROPHYLAXIS OF AEROMONOSIS IN TAMBAQUI LARVICULTURE

ABSTRACT - This study aimed to investigate the feasibility and effectiveness of supplementation with strains of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy tambaqui, on the pathophysiological and zootechnical responses in larvae of the same species of challenged *Aeromonas hydrophila*. Ten tambaquis were purchased from local fishermen from the Amazon River in Santarém-Pa. The animals were euthanized by deepening the anesthetic plane and the gastrointestinal tract was removed for seeding in a Petri dish containing TSA and MRS media plus Aniline Blue dye. The culture was obtained from the direct sowing of stomach and intestinal contents and the mix (intestine + feces). A total of 115 bacterial strains were isolated and characterized to investigate their in vitro viability and probiotic potential. Initially, Catalase tests and Gram staining were performed, and 66 of the isolates were positive for lactic acid bacteria. Subsequently, the hemolytic activity of positive bacilli with negative catalase was evaluated, in which 5 did not present hemolysis, and these were selected for the other analyses (I3, I10, F4, M13, and M14). For the probiotic characterization of the bacteria, the viability and growth of lactic acid bacteria were verified at different pH values (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, and 9.0) for 12 h, as well as bile resistance, antagonist activity, auto- and co-aggregation, biofilm formation, antibiogram, hydrophobicity, and lyophilization tests. For molecular identification of the worked species, PCR was performed using three primers: Lac 1 and 2 for *Lactobacillus* sp., Bac, and 16S for *Bacillus* sp., and their products were separated by gel electrophoresis. The in vitro analysis was initially carried out by the pathogenicity test in 30 juvenile tambaquis, divided into 6 groups, 0.5 mL of the isolates was inoculated into the coelomic cavity, where it was verified that there was no mortality and/or clinical behavioral alterations or tissues in all animals. In larviculture, better zootechnical performance was verified in strains I3 and M13 in relation to the control, without alteration of morphophysiological development. Sepsis induced in the larvae improved the survival and innate immunity of larvae supplemented with M13 and M14. The preliminary results obtained in the tests showed that the isolates belonging to the genus *Lactobacillus* present characteristics of potential probiotics for tambaqui larvae. Prospecting their technological and functional potential is extremely important for sustainable aquaculture production.

Key words: lactic acid bacteria, animal production, endemic, native fish, fish larvae.

1. INTRODUÇÃO

A indústria aquícola é responsável por produzir uma das fontes de proteína mais importantes para a saúde humana, emergindo como um modelo promissor de segurança alimentar e nutricional (SHEN et al., 2020; ZANG et al., 2022). Esse crescimento está relacionado a investimentos, de pequenos produtores, a novas técnicas produção, fazendo desse âmbito com grande potencial de expansão na indústria global de produção de alimentos (FERREIRA, 2018; GARLOCK et al., 2020).

Neste contexto, o mercado brasileiro de peixes se posiciona de forma complexa e diversa, haja vista o seu tamanho territorial, a diversidade socioeconômica e a grande variedade de espécies cultivadas (FILHO et al., 2020). No ano de 2022, as exportações da piscicultura brasileira apresentaram um crescimento de 15%, em comparação com o ano anterior. Parte desse aumento está relacionada e a produção de peixes cultivados, a qual aumentou 416.000 toneladas, em 2010, para 860.350 toneladas, em 2022, cuja produção de peixes nativos alcançou um volume de 267.060 toneladas, representando 31,4% da produção do país (FAO, 2022).

Dentro do grupo denominado de redondos, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a segunda maior espécie cultivada no Brasil, representando 24% da produção aquícola nacional (LIMA et al., 2021). Esse peixe teleosteo é nativo dos rios brasileiros e, tem ganhado espaço na produção nacional devido a sua qualidade, alto valor nutricional e aspectos zootécnicos interessantes ao cultivo, uma vez que é considerado um peixe de grande porte, podendo alcançar 100 cm de comprimento e 30 kg de peso (ABP, 2018; GRACEZ et al. 2021; MORAIS et al., 2017).

Por conseguinte, devido ao aumento intensivo da piscicultura o manejo sanitário das espécies é uma ferramenta importante para o desenvolvimento sustentável da indústria, no qual o monitoramento dos fatores ambientais e a manutenção dos parâmetros de qualidade da água são necessários para um cultivo livre de doenças (BANERJEE et al. 2017). Nessa conjuntura, as altas densidades de estocagem e o excesso de ração provocam modificações no pH, oxigênio dissolvido, carga orgânica e dióxido de carbono da água. Esses fatores ocasionam uma nutrição inadequada, redução do crescimento, redução da capacidade reprodutiva e supressão do sistema imunológico,

favorecendo o aparecimento de patógenos bacterianos, como a *Aeromonas hydrophila* (GHOMRASSI et al., 2016; TACHIBANA et al., 2020).

Para contornar esse quadro, uma das abordagens utilizadas corriqueiramente na aquicultura para o controle de patógenos têm sido o uso de antimicrobianos, devido sua rápida ação e disponibilidade. Todavia, o emprego incorreto destas substâncias desencadeia uma pressão seletiva de bactérias multirresistentes, induz a disbiose da microbiota, afetando a nutrição, fisiologia e imunidade animal e, o acúmulo de resíduos de antibióticos no ambiente e tecidos comestíveis de animais aquáticos, problema a saúde pública (BANERJEE et al., 2017; XUEUA et al., 2020).

Uma alternativa para evitar disbiose na microbiota e mais situações adversas, além de facilitar a produção intensiva, garantindo saúde, redução da utilização de antimicrobianos e melhora no bem-estar em cativeiro, é a utilização de probióticos como forma de substituir a demanda de antibióticos (PAIXÃO et al., 2020). Além do controle de doenças, estes também são responsáveis pela produção de enzimas extracelulares, auxiliando a digestão; promoção de crescimento, manutenção da qualidade da água, modulação imunológica, aumentar a tolerância ao estresse, (BENERJEE et al., 2017; SHEN et al., 2020; TACHIBANA et al., 2020). Além disso, são eficazes em promover a atividade fagocítica e aumentar os níveis de lisosimas nos peixes (TACHIBANA et al., 2020).

Os probióticos, são microrganismos vivos, que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro melhorando a homeostase intestinal (XUEUA et al., 2020). No intestino, a microbiota intestinal desempenha um importante papel de modulação do sistema imunológico, atuando na maturação do tecido linfóide associado ao intestino; como barreira contra diversos microrganismos patogênicos, tornando o microecossistema intestinal um indicativo do estado de saúde do animal (CAVALCANTE et al., 2020; ZHANG et al., 2022).

Na piscicultura, os probióticos são divididos em endógenos e exógenos ao hospedeiro. Pesquisas têm sugerido vantagens dos probióticos endógenos na sobrevivência e no desempenho de colonização no ambiente intestinal (ZHANG et al., 2022). É válido ressaltar, que a microbiota intestinal autóctone já desempenha papel fundamental na fisiologia do trato gastrointestinal (TGI) , modulando a resistência a colonização e interferindo no metabolismo de substratos orgânicos (TALWAR et al., 2018; WANG et al., 2016).

No que tange a utilização de probióticos autóctones comerciais, um estudo realizado por Costa et al. (2021), visando avaliar os efeitos de um probiótico para camarões e peixes na alimentação tambaqui, explorando o desempenho zootécnico, imunidade inata, parâmetros hematológicos e como biocontrole na qualidade da água, demonstrou que a associação das espécies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de segura não proporcionou benefícios complementares no desempenho zootécnico, imunidade inata e qualidade da água, após 60 dias de suplementação na água e ração. Além disso, não foi observada diferença significativa quanto a quantidade de microrganismos aderidos a superfície da mucosa intestinal, o que sugere a ausência de colonização e a ineficácia do produto testado, fator este que justificaria a ausência de benefícios aos animais testados.

À vista disso, os microrganismos, com potencial probiótico, são triados *in vitro* para avaliar seu potencial, por meio de uma caracterização fenotípica, bioquímica e molecular (VALE- PREREIRA et al., 2019). Posteriormente as análises iniciais, as cepas selecionadas são conduzidas à testes in vivo, etapa de extrema importância para a definição da via de administração, concentração do microrganismo, além da comprovação dos efeitos após a suplementação (SARJITO et al., 2019).

Sabe-se que o TGI larval é estéril, sendo colonizado por microrganismos presentes no ambiente no momento da eclosão, havendo a consolidação no decorrer das fases de desenvolvimento. Além disso, existem múltiplas possíveis fontes para o primeiro inóculo nesta fase, processo o qual é dependente da microbiota dos ovos, da água de cultivo das larvas e da alimentação quando inserida (WANG et al., 2018).

A fase de larvicultura é considerada uma das mais criteriosas da piscicultura, devido a fragilidade dos animais. Nessa etapa, é comum observar taxas elevadas de mortalidade em diferentes sistemas de produção, especialmente nos sistemas intensivos e superintensivos. Além disso, existem diversos fatores que contribuem para a letalidade nessa fase de manejo, sendo o estresse um dos principais responsáveis por alterações nos parâmetros de qualidade da água, além do potencial surgimento de infecções por patógenos oportunistas, resultando em perdas na produção e impactos econômicos (VIEIRA, 2022).

Devido às suas dimensões reduzidas e comportamento, as larvas de peixes, possuem necessidade nutritiva específica, necessitando ter à sua disposição presas vivas, com movimentos compatíveis aos seus mecanismos de captura e predação, além

de dimensões adequadas as da boca, permitindo a sua fácil captura e predação (FERREIRA, 2009). A artemia (*Artemia sp*) é considerada um organismo alimentar muito utilizado na larvicultura industrial de peixes e crustáceos, devido a características como seu pequeno tamanho, baixa taxa de natação, reprodução rápida e capacidade de cultivo em alta densidade (HAI et al., 2010). Estas, são reconhecidas como uma excelente fonte de alimento vivo natural, podendo ser utilizada como um veículo eficaz para a entrega de uma variedade de materiais, como nutrientes, agentes antimicrobianos, vacinas e probióticos através da bioencapsulação (RUDTANATIP et al., 2019).

Desse modo, o presente trabalho objetivou isolar e analisar a prospecção de cepas de bactérias lácticas espécie-específicos em *Colossoma macropomum* e verificar o efeito na produção e na sanidade da larvicultura, como um incremento do cultivo da espécie nativa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção mundial e brasileira de pescado

A piscicultura tem contribuição essencial nos setores de pesca e aquicultura para a segurança alimentar e nutrição global. Partindo desse pressuposto, em 2022, foi relatado uma produção aquícola histórica de 214 milhões de toneladas, arrecadando cerca de US\$424 bilhões. Ainda, mundialmente os alimentos aquáticos tem fornecido cerca de 17% da proteína animal, chegando a 50% em diversos países dos continentes africano e asiático; empregando 58,5 milhões de pessoas em produção primária, dessas 21% composta de mulheres. Além disso, em 2020, representou uma das *commodities* alimentares mais negociadas no mundo, com aproximadamente 225 estados e territórios relatando algum tipo de atividade comercial proveniente de produtos da pesca e aquicultura (FAO, 2022). Dessa forma, o pescado tem papel fundamental na segurança alimentar e nutricional, não somente como fonte de proteína, mas como fornecedor de uma gama extensa de ácidos graxos e micronutrientes disponíveis (FAO/Sofia, 2022).

O Brasil é um país que apresenta condições favoráveis para se tornar um grande produtor de pescado. Com uma vasta extensão de Zona Econômica Exclusiva (ZEE) e de costa marítima de 8.500 km, o país tem grande potencial para substituir importações, ingressar no mercado global e impulsionar o mercado doméstico. Além disso, o Brasil possui 12% da água doce disponível no planeta, o que representa uma enorme vantagem competitiva para o setor. Com um grande volume de água em reservatórios e de água subterrânea, as condições climáticas favoráveis e a alta disponibilidade de mão de obra, o país pode se consolidar como um importante produtor de pescado (XIMENES, 2021).

De acordo com a FAO, a produção brasileira de peixes cultivados aumentou de 416.000 toneladas em 2010 para 758.000 toneladas em 2019, o que representa um aumento de cerca de 82% em 10 anos, como demonstrado na Figura 1.

A Região Sul do Brasil é atualmente o principal polo de cultivo de peixes no país, com 275.700 toneladas produzidas em 2022, o que representa cerca de um terço (32%) do volume nacional. Além disso, houve um aumento de 2,4% em relação ao ano anterior,

quando foram produzidas 269.300 toneladas. Em segundo lugar em produção está o Nordeste, com 170.065 toneladas em 2022, o que equivale a quase 20% da produção nacional de peixes. Houve um crescimento de 4,8% em relação a 2021 (162.250 toneladas), sendo a região que vem apresentando maior aumento. Em terceiro lugar, tanto em produção quanto em crescimento, está a região Sudeste, com 159.380 toneladas e um avanço de 4,2% em relação a 2021. A Região Norte ocupa o quarto lugar em volume de produção, com 145.310 toneladas, praticamente estável, com apenas um aumento de 0,3%. Já o Centro-Oeste registrou uma queda de 1,6% na produção de peixes, passando de 111.750 toneladas em 2021 para 109.900 toneladas em 2022 (PEIXE BR, 2023).

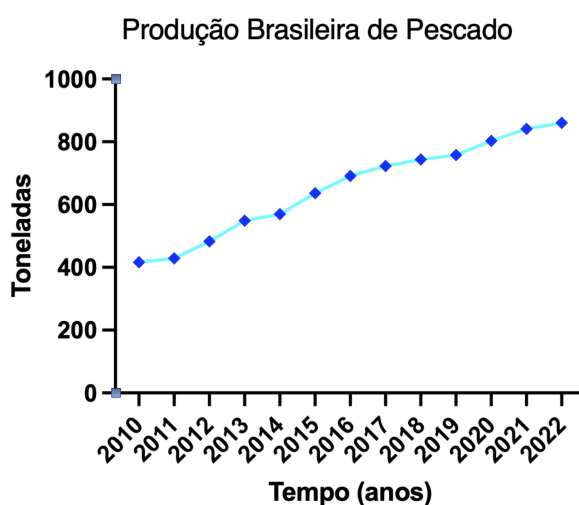


Figura 1 - Crescimento da produção de peixes de cultivo no Brasil entre os anos de 2010 a 2022 segundo o relatório FAO/Sofia.

A produção de peixes nativos no representou, em 2022, volume de 267.060 toneladas, um aumento de 1,8% em relação às 262.370 toneladas registradas em 2021. Esse aumento se deve, em parte, à inclusão desses peixes em mais projetos que buscam ampliar as opções da piscicultura brasileira. A participação dos peixes nativos na produção total do país foi de 31,04%. A maior parte da criação de espécies nativas está na Região Norte, com a produção de 143.500 toneladas em 2022, com desempenho praticamente estável em relação a 2021. Dentre os estados Rondônia lidera a produção com 57.200 toneladas, seguido por Maranhão (39.100 t), Mato Grosso (38.000 t), Pará (24.200 t) e Amazonas (21.300 t). A Região Nordeste registrou um crescimento de 5,4% na relação ano contra ano, somando 56.580 toneladas, enquanto a Região Sudeste teve uma redução de 0,3%, totalizando 49.100 toneladas (PEIXE BR, 2023).

No ano de 2022, as exportações da piscicultura brasileira apresentaram um crescimento de 15%, gerando um faturamento total de US\$ 23,8 milhões. Entre as

espécies mais exportadas, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) ocupou a segunda posição, alcançando um valor de US\$ 268 mil (PEIXE BR, 2023). No estado do Pará, a criação desse peixe é a principal atividade da aquicultura, praticada em diversas estruturas, como açudes particulares, viveiros escavados, tanques, tanques-rede, gaiolas flutuantes e canais de igarapé (MPA, 2013a). Dentre os municípios com maiores produções estão Paragominas, Marabá, Conceição do Araguaia, Tucuruí e Uruará (BRABO et al., 2017; PEIXE BR, 2023). Apesar disso, o cultivo no Estado continua sem apresentar resultados favoráveis compatíveis com sua potencialidade, uma vez que ainda são escassos programas de sanidade aquícola que proporcionem segurança a produção e principalmente ao consumidor, seguindo comprando peixes de outros estados para atender à demanda de consumo local (PEIXE BR, 2023)

2.2 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Descrito por George Cuvier, em 1816, o tambaqui, pertencente à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Serrasalminae, é natural dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes. Trata-se de um caricídeo redondo, de corpo alto, alongado e, quando na fase adulta, comprimido lateralmente. Essa espécie é considerada de grande porte, podendo alcançar 100 cm de comprimento e 30 kg de peso. Estudos indicam que a expectativa de vida do *C. macropomum* no ambiente natural é de cerca de 13 a 14 anos (MORAIS, O`SULLIVAN, 2017).



Figura 2 - Juvenil de tambaqui (*C. macropomum*). Arquivo Pessoal.

Nos peixes adultos, a coloração varia com a cor da água, deixando mais escuros

os que habitam águas pretas e mais claros os indivíduos de água barrenta (MORAIS, O`SULLIVAN, 2017). Os juvenis, de até 10 cm, exibem uma mancha arredondada escura na região mediana do corpo, na altura da nadadeira dorsal, que desaparece completamente após atingir um determinado comprimento. É possível observar diferenças morfológicas no padrão de crescimento entre machos e fêmeas de tambaqui, principalmente em relação ao peso, indicando a presença de dimorfismo sexual na fase adulta. As fêmeas, em cativeiro, tendem a ser maiores e mais pesadas após atingir a maturidade reprodutiva (MELLO et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016).

Esses animais possui dentes molariformes robustos e bem implantados na mandíbula, o que permite que ele se alimente tanto de pequenos crustáceos quando alimentos mais firmes. Além disso, possuem tem rastros branquiais longos e numerosos, o que lhe permite filtrar pequenos organismos que flutuam na água. (MORAIS, O`SULLIVAN, 2017). Este, em seu ambiente natural, possui uma dieta onívora, com preferência por zooplâncton na fase jovem e exclusivamente frugívoro na fase adulta., quando alimentam-se principalmente de frutas e sementes das florestas inundadas próximas aos rios e lagos, além de aproveitar a maior disponibilidade de pequenos insetos, artrópodes, moluscos, folhas e caules macios. Dessa forma, esses peixes apresentam uma dieta variável de acordo com o regime das chuvas, tendo adaptações morfofisiológicas que o permitem explorar uma ampla gama de itens alimentares (RODRIGUES, 2014).

O tambaqui é um peixe diurno que pode ser criado em regiões com clima quente e boa luminosidade em todo o país (MENDONÇA et al., 2012). Na natureza, prefere águas próximas à margem, ricas em nutrientes e com condições físico-químicas estáveis em toda a coluna de água. Tolerar variação de temperatura entre 25 e 34 C, com pH entre 7 e 8 e concentração de oxigênio dissolvido superior a 4 mg/L (IZEL et al., 2014). Essa espécie é considerada resistente tolerando baixos níveis de oxigênio dissolvido (entre 3,0 e 1,0 mg/L), apresentando adaptações à hipóxia, como lábios espessos e hiperemiados, ela é capaz de sobreviver por um período limitado em áreas com baixos teores de oxigênio dissolvido na água (MORAIS, O`SULLIVAN, 2017).

Na natureza, as fêmeas então sexualmente maduras entre 4 e 5 anos de idade, com, aproximadamente, 58 cm de comprimento. É uma espécie que realiza migração reprodutiva e não fornece cuidados parentais, cujas larvas são transportadas pela corrente por quatro a 15 dias, cobrindo de 400 m a 1.300 km, à deriva para lagos de planície de inundação, onde os jovens passam a fase juvenil (HILSDORF et al, 2021). A alimentação larval exógena inicia ao atingirem entre 5 e 7 mm de comprimento, quando

passam a consumir zooplâncton, principalmente cladóceros, rotíferos, copépodes e larvas de insetos, e com o passar do tempo invertebrados maiores, como larvas de quironomídeos (MORAIS et al, 2017).

No ambiente de cultivo, desenvolve-se melhor em águas com alcalinidade e dureza superior a 30 mg/L e temperaturas entre 27 e 30 oC (IZEL et al. 2014). A faixa de pH considerada adequada para a espécie em cultivo é entre 4,0 e 6,5, sendo relativamente tolerante a água ácida, apresentando estratégias adaptativas que envolvem ajustes hematológicos, regulação iônica e produção de muco (ARIDE et al., 2007).

A criação de tambaqui é geralmente dividida em três fases: (i) larvicultura, que dura de 30 a 45 dias e envolve a criação dos peixes desde a eclosão até que atinjam um peso médio individual de 0,5 a 1g; (ii) produção de juvenis, que dura cerca de 60 dias e leva os peixes a atingirem um peso médio individual de 40 a 50 g; e (iii) engorda, cuja duração varia dependendo do peso desejado para abate (DAIRIKI E SILVA, 2011; LIMA et al., 2013).

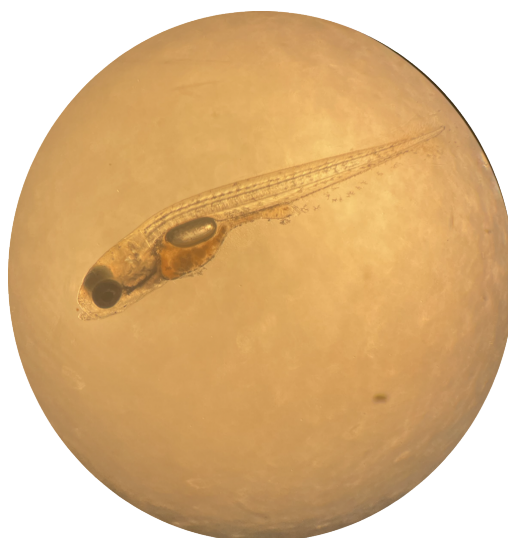


Figura 3 - Larva de tambaqui (*C. macropomum*). Arquivo Pessoal.

O desenvolvimento larval de peixes teleósteos inicia-se após a eclosão dos ovos e finaliza com a reabsorção do saco vitelínico. Durante esse período, diversos eventos ocorrem de forma sincronizada, tais como a expansão da bexiga natatória, pigmentação ocular, desenvolvimento das barbatanas e flexão da notocorda. As larvas, abrem a boca cerca de 36 horas após a eclosão, dando início a alimentação exógena (HILSDORF et al, 2021).

Este, é um dos períodos mais desafiadores da produção de peixes, o qual o sucesso é determinado por uma combinação de fatores como nutrição, imunidade, qualidade da água, densidade de estocagem e temperatura (LUZ et al, 2020). Durante os

estágios iniciais, os animais são mais vulneráveis à acidificação da água e aumento da temperatura, o que pode ocasionar comprometimento das estruturas esqueléticas (LOPES et al 2018). Além disso, o sistema de iluminação usado pode afetar a capacidade das larvas de tambaqui de capturar presas, as quais devem ser alimentadas com ração viva (zooplâncton ou *Artemia salina*) (HILSDORF et al 2021). A *Artemia salina*, microcrustáceo rico em proteínas, energia e aminoácidos livres e são facilmente digeridos, são resistentes à variação no ambiente, transporte e armazenamento, o que contribui para o seu uso como alimento vivo. O fornecimento de alimentos vivos nos primeiros dias de vida é essencial para o crescimento e desenvolvimento do trato digestivo, até que possam ser desmamadas em ração artificial (MELO et al., 2023).

Ademais, a utilização de uma densidade de estocagem apropriada é vantajosa do ponto de vista comercial, uma vez que permite a maximização do uso de tanques, água e recursos econômicos. A densidade de estocagem pode influenciar o crescimento, a sobrevivência e o comportamento dos peixes em fase larval, além de afetar a ocorrência de canibalismo durante a larvicultura (LUZ et al., 2020). Nessa espécie, é comumente realizada em viveiros, mas recentemente pesquisas descreveram a possibilidade de larvicultura intensiva em um sistema de aquicultura de recirculação (RAS) com uma densidade de até 50 larvas L⁻¹ durante os primeiros 30 dias de alimentação, sem redução no crescimento e sobrevivência em relação a densidades mais baixas. Assim, densidades mais altas devem ser avaliadas (SANTOS et al., 2022).

Em cativeiro, peixes adultos são capazes de digerir tanto proteína animal quanto vegetal, e facilmente se adapta à alimentação com ração artificial, aceitando, também, ração e grãos (NUNES et al., 2006). A ração farelada (com 55% de proteína bruta - PB) em adição à água rica em plâncton é utilizada como fonte de alimento para as larvas, melhorando o desempenho produtivo e a sobrevivência (PEDREIRA et al., 2015). Quando privado de alimento, é capaz de ter um crescimento compensatório com maior deposição de proteína corporal (ITUASSÚ et al., 2004).

Em sistemas semi-intensivos, é possível criar cerca de 2500 peixes/ha, enquanto em cultivo intensivo com uso de aeradores, essa densidade pode chegar a 7000 peixes/ha (IZEL et al., 2014). O tambaqui tem bom desempenho em sistemas intensivos e pode atingir um peso final de 2,7 a 3,3 kg após 12 meses em viveiros (MELO et al., 2001; IZEL et al., 2013; LIMA et al., 2013b; IZEL et al., 2014). Para calcular a quantidade de ração necessária, é importante fazer biometrias em amostras da população a cada 15 ou 30 dias, para verificar a biomassa do plantel (MELO et al., 2001; IZEL e MELO, 2004; IZEL et al., 2014).

2.3. Problemática: uso demasiado de antimicrobianos

Em 2018, o consumo global de antibióticos veterinários foi estimado em 76.704 toneladas, e estima-se que o consumo global de antibióticos veterinários cresça em 11,5% até 2030. Diante disso, criatórios utilizam antibióticos de forma extensiva tornaram-se pontos críticos para a resistência aos antibióticos, de forma que vários estudos relataram genes de resistência a antimicrobianos (ARG) e bactérias resistentes aos antibióticos (ARB) abundantes em ambientes agrícolas, como águas residuais, solo e ar (ROTHROCK et al., 2021).

Como agravante, as estações de tratamento de águas residuais, que coletam águas de várias fontes, como municípios, hospitais e matadouros, pode tornar-se uma fonte rica de ARB e ARG, uma vez que genes não são facilmente removidos pelos métodos convencionais de tratamento. Além disso, a contaminação pode se espalhar para o ambiente hídrico, solo, bem como para os trabalhadores e residentes vizinhos através da forma de aerossóis. A inalação, o contato dérmico e a ingestão desses poluentes podem levar à transmissão de ARB e ARG para humanos, causando potenciais riscos à saúde (DING et al., 2023).

A alta demanda por pescado nos últimos anos, levou os produtores a expandir sua produção em áreas de cultivo já existentes. No entanto, a prática de adensamento pode ter impactos negativos na saúde dos peixes, pois essa intensificação expõe os animais a mudanças na qualidade da água e a práticas intensivas de manejo, o que causa estresse e desequilíbrio na tríade patógeno-hospedeiro-ambiente. Por conta disso, uma grande porcentagem de perda de produção na piscicultura é ocasionada por doenças, chegando a até 50%. Fatores antropogênicos, densidade populacional elevada e qualidade ruim da água geram estresse agudo e crônico em peixes e crustáceos, afetando suas funções metabólicas e imunológicas e tornando-os mais suscetíveis a infecções (KOTZENT, 2017).

As bactérias são grandes responsáveis por causar doenças na criação de peixes, e algumas delas, como *Aeromonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Vibrio sp.* e *Streptococcus sp.*, podem causar grandes perdas econômicas. A bactéria *Aeromonas hydrophila*, um dos principais patógenos oportunistas de peixes de água doce, principalmente o tambaqui, ocasiona quadros de septicemia hemorrágica. A sua patogênese é complexa e multifatorial, o que torna o seu controle difícil. Além disso, apresenta resistência a diversos

antibióticos, anti-sépticos e desinfetantes, e a diversidade de cepas dificulta o desenvolvimento de vacinas (VISWANATAN et al., 2015).

Essas bacterioses, comuns em sistemas de cultivo, são controladas utilizando antibióticos, como prevenção e tratamento, durante o processo de colheita ou manuseio, podendo ser adicionados na ração ou na água de cultivo (HOSSAIN et al. 2019). Embora o uso de antibióticos seja necessário para o desenvolvimento da criação aquicultura, essa prática pode apresentar um risco significativo de desenvolvimento de resistência a medicamentos em patógenos, bem como na microbiota inócua nativa do ambiente aquático do hospedeiro, além da presença de resíduos de antimicrobianos (DEEKSHIT et al, 2022). Por isso, o uso indiscriminado de antimicrobianos como uma tentativa de controle das doenças, coloca em risco toda a cadeia produtiva, comprometendo a saúde dos peixes e o meio ambiente, deixando resíduos nas carcaças, tornando-as impróprias para exportação para os Estados Unidos e Europa (KOTZENT, 2017).

A transferência horizontal de genes tem desempenhado um papel significativo na disseminação rápida da resistência antimicrobiana, permitindo a aquisição de genes de resistência antimicrobiana por elementos genéticos móveis, como transposons, plasmídeos e integrões, em populações bacterianas (HOSSAIN et al., 2019). A resistência antimicrobiana (AGR) pode resultar na ineficácia de certos antibióticos, levando à necessidade de utilizar a mesma substância ou um antibiótico diferente em doses mais elevadas. Alguns grupos de antibióticos, como a Rifampicina, Aztreonam e Telitromicina, são particularmente afetados por esse fenômeno. DEEKSHIT et al., 2022). Portanto, o acúmulo de elementos genéticos móveis em um ambiente também representa um reservatório adaptativo e robusto de ARGs que podem ser acessados e adicionados por diferentes linhagens bacterianas (BEHLING et al, 2023).

Alguns ARG e ARB são amplamente compartilhados entre humanos, animais e meio ambiente, como o gene resistente à colistina. O uso e resíduos de antibióticos, metais pesados e outros fatores ambientais (pH, temperatura e teor de oxigênio) podem permitir a transferência de ARG entre bactérias e disseminação para diferentes nichos ecológicos, além de aumentar a poluição ambiental e afetar a saúde dos trabalhadores e dos habitantes vizinhos (DING et al., 2023).

Durante o processo de produção de pescados, a resistência dessas bactérias aos antibióticos pode ter impactos negativos na saúde humana, resultando em infecções, uma vez os manipuladores do pescado, estando com o sistema imunológico comprometido, podem ser infectados por diversas bactérias, incluindo *Aeromonas hydrophilia*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio vulnificus*, *Streptococcus iniae* e *Mycobacterium*

marinum, além de doenças transmitidas por alimentos, frequentemente causadas por *Clostridium* spp. e *Listeria monocytogenes*. Além de causar infecções, essas bactérias também podem carregar genes de resistência antimicrobiana e transmiti-los a outros patógenos humanos, contribuindo para o aumento da resistência em infecções humanas (OKON et al, 2022).

O uso excessivo de antibióticos, aumenta o número superbactérias, tornando os antibióticos cada vez mais ineficazes, resultando em infecções mais difíceis de tratar. Desde 2019, estima-se que infecções ocasionadas por patógenos resistentes a antibióticos tenham causado diretamente 1,27 milhão de mortes, tornando-se um problema crítico em termos de saúde pública e segurança ambiental (XU et al, 2023). Dessa forma reduzir o uso de antibióticos é uma das principais maneiras de diminuir a presença de bactérias resistentes no ambiente, animais, cadeias alimentares e instalações de saúde, além de minimizar as ameaças à saúde pública (DING et al, 2023).

Os riscos para o meio ambiente e para os consumidores associados ao uso desses compostos levaram a recente implementação de regulamentos mais rigorosos sobre o uso profilático de antibióticos e a presença de resíduos de antibióticos em produtos de aquicultura. Isso se reflete nas proibições de seu uso na indústria da aquicultura em todo o mundo (LIEKE et al., 2020).

Devido a esses e outros problemas associados à utilização de antimicrobianos, é necessário investigar alternativas que permitam reduzir o uso desses fármacos na aquicultura sem afetar a produtividade ou a qualidade final do pescado. Neste contexto, a utilização de probióticos pode ser uma alternativa importante para prevenção de doenças em peixes (KOTZENT, 2017).

2.4 Probióticos

Para a produção de peixes de forma sustentável, é importante buscar alternativas sustentáveis para controlar as infecções bacterianas, e algumas opções têm sido exploradas. Nos peixes, o epitélio intestinal é a principal barreira de absorção de nutrientes, contando com a ajuda de uma grande quantidade de microrganismos, formada por conjunto de bactérias, archaea, eucariotos e vírus (SUNDH E SUNDELL, 2015). Essa microbiota residente tem uma relação simbiótica com o hospedeiro e desempenha papéis fundamentais na proteção contra patógenos, além de funções nutricionais, endócrinas, neurais e fisiológicas. Quando ocorre o desequilíbrio nas comunidades comensais, que formam a microbiota intestinal, o hospedeiro sofre consequências fisiológicas, o que pode

levar a uma redução do crescimento e maiores taxas de mortalidade (VARGAS-ALBORES et al, 2014). O uso de probióticos como aditivo na alimentação regular, tem mostrado resultados positivos na proteção do intestino contra microrganismos patogênicos e redução da inflamação. Esses compostos têm melhorado o crescimento, imunidade e saúde intestinal das espécies cultivadas (GOH et al., 2022).

O termo probiótico tem origem nas palavras gregas "pro" e "bios", que juntas significam "para a vida". A definição inicial de probióticos foi proposta por Lilly e Stillwell (1965), que os descreveram como "substâncias secretadas por um microrganismo que estimula o crescimento de outro". Posteriormente, Fuller (1989) definiu probióticos como "produtos constituídos por microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal". Merrifield et al. (2010) propuseram uma definição mais ampla, considerando probióticos como qualquer célula microbiana viva que beneficie o hospedeiro quando fornecida por meio da dieta ou da água de cultivo, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal.

Os probióticos são microrganismos vivos que oferecem benefícios para a saúde do hospedeiro (EL-SAADONY et al., 2021) e têm um papel crucial na garantia da sustentabilidade da aquicultura, reduzindo os efeitos negativos do uso de antibióticos e outros antimicrobianos. Estes ajudam a restaurar a microbiota intestinal, promovendo a saúde e o bem-estar desempenhando um papel crucial no crescimento e estabelecimento da microbiota intestinal. Além disso, produzem peptídeos antimicrobianos, metabólitos, fatores de crescimento e moduladores imunológicos, que ajudam a proteger a função imunológica e mantêm a homeostase quando incorporados à dieta atuando nas funções digestivas, respiratórias e imunológicas, reduzindo o risco de doenças infecciosas (SRINIVASH et al, 2023).

Dessa forma, os probióticos têm sido considerados como um dos aditivos alimentares mais promissores para melhorar a produção aquática (CHOWDHURY E ROY, 2020). Nesse cenário, são reconhecidos os impactos positivos diretos, tais como a estimulação do sistema imunológico, aumento da resistência a doenças, diminuição da resposta ao estresse, aprimoramento da morfologia do trato gastrointestinal e incremento no desempenho de crescimento e na utilização dos alimentos. Além disso, observa-se a melhora na qualidade da carne e da carcaça, bem como a redução de malformações (KOTZENT, 2017).

A respeito da interação com o trato gastrointestinal, esses microrganismos podem a permeabilidade através de diversos mecanismos, alguns desses incluem o estímulo da produção de muco, a produção de peptídeos antimicrobianos como defensinas e

catelicidinas, e outras moléculas antimicrobianas como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e bacteriocinas ou microcinas. Estes, também, podem ajudar a proteger a função de barreira intestinal competindo com patógenos por sítios de ligação nas células epiteliais e na camada mucosa sobrejacente (SOUZA, 2019).

Para tanto, existem três possíveis mecanismos de ação associados aos probióticos através de um espectro de atividade que pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos. O primeiro deles é relacionado a capacidade de reduzir o número de células viáveis por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e por sítios de adesão. O segundo envolve a modificação do metabolismo microbiano, resultando no aumento ou diminuição da atividade enzimática. Por fim, o terceiro consiste no estímulo da imunidade do hospedeiro, promovendo o aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos (SOUZA, 2019).

A utilização de probióticos tem sido vista como uma solução promissora e sustentável para o controle de doenças em peixes, pois pode substituir o uso excessivo de produtos químicos e antimicrobianos, uma das grandes preocupações da indústria de aquícola. O uso indiscriminado de antimicrobianos pode causar riscos à cadeia produtiva, deixar resíduos no pescado, afetar a saúde de peixes e outros animais não alvo, além de comprometer o meio ambiente e favorecer o aparecimento de cepas resistentes a esses medicamentos (AKHTER et al., 2015)

A maioria dos probióticos utilizados na aquicultura são provenientes de fontes terrestres ou de ambientes diferentes do organismo hospedeiro aquático. No entanto, evidências sugerem que os probióticos autóctones, ou seja, aqueles naturalmente associados ao hospedeiro, apresentam um desempenho superior em comparação aos probióticos isolados de outras fontes. Uma possível explicação para isso é que os probióticos autóctones estão melhor adaptados ao seu habitat natural, ou seja, o intestino, em comparação aos probióticos alóctones.

Portanto, espera-se que os probióticos autóctones sejam capazes de colonizar prontamente o trato gastrointestinal do hospedeiro e apresentem um desempenho mais eficaz. Além disso, os microrganismos tendem a exibir as mais altas atividades fisiológicas em seu ambiente natural. A taxa de sobrevivência dos probióticos também é provavelmente maior quando aplicados em seu ambiente natural. Isso sugere que uma grande proporção da microbiota intestinal coevoluiu com o hospedeiro e, conseqüentemente, revela algum grau de especificidade de espécie. De fato, as interações entre organismos multicelulares e microrganismos podem promover mutações

benéficas para as bactérias (WERTZ et al, 2021).

Além disso, pesquisas têm sugerido vantagens dos probióticos endógenos na sobrevivência e no desempenho de colonização no ambiente intestinal (ZHANG et al., 2022). É válido ressaltar, que a microbiota intestinal autóctone desempenha papel fundamental na fisiologia do trato gastrointestinal, modulando a resistência a colonização e interferindo no metabolismo de substratos orgânicos (TALWAR et al., 2018; WANG et al., 2016). Porém, o isolamento e a industrialização desse tipo de cepa tem se tornado um empecilho devido suas particularidades fisiológicas (ZHANG et al., 2022).

Os probióticos são uma opção promissora e sustentável para o controle de doenças em peixes, porém, a eficácia dos produtos disponíveis no mercado é frequentemente questionada devido à sua origem em isolados probióticos de outras espécies, como suínos e aves. Embora o uso de microrganismos autóctones ou não do hospedeiro possa ser realizado na aquicultura, a utilização de microrganismos autóctones é vantajosa, já que esses microrganismos estão adaptados ao ambiente, salinidade e temperatura, o que pode aumentar ainda mais seus benefícios para o hospedeiro (ZORRIEHZAHRA et al., 2016).

O isolamento de candidatos probióticos em peixes é realizado por meio de técnicas dependentes de culturas, utilizando meios de crescimento seletivos e não seletivos. Na prática, é necessário utilizar várias vias e condições de cultura diferentes, como gradientes de nutrientes e pH, para aumentar a diversidade de isolados. Nos peixes, as bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas são os principais alvos da triagem, devido à sua predominância no intestino. Uma vez que um candidato probiótico é selecionado, o protocolo de cultivo pode ser adaptado para produção biotecnológica em um biorreator (WERTZ et al., 2021).

Para que um microrganismo possa ser considerado um potencial probiótico para uso na alimentação de animais, é necessário selecioná-lo com base em suas características e em sua capacidade de passar por alguns testes específicos. Para tanto é fundamental que as bactérias probióticas sejam capazes de superar as diversas barreiras presentes no trato gastrointestinal, como o ácido estomacal, composto de ácido clorídrico, cloreto de potássio e cloreto de sódio, sobrevivendo em pH baixos (1,5-3,0) por um período de 2 a 3 horas, tempo médio de passagem pelo estômago; tolerância à bile, uma vez que isso facilita sua passagem pelo duodeno em direção ao local de ação no trato gastrointestinal (SRINIVASH et al, 2023).

Além disso o microrganismo deve ser capaz de colonizar o trato gastrointestinal do animal hospedeiro. A aderência ao trato intestinal é crucial para sua viabilidade e eficácia,

cujo uma possível forma de adesão e colonização se dá através da ligação aos microrganismos que se ligam à camada de muco que protege as células epiteliais do hospedeiro no trato gastrointestinal. Essa adesão entre a membrana celular bacteriana e as várias superfícies que interagem no hospedeiro é um processo complexo, sendo esta uma interação intrincada de várias forças eletrostáticas e químicas, onde as cepas que aderem bem aos hidrocarbonetos são consideradas hidrofóbicas, enquanto as que aderem mal são consideradas hidrofílicas, tornando o fator hidrofobicidade, o qual é mediado por componentes da membrana, crucial (SRINIVASH et al, 2023).

Esses microrganismos, também, devem possuir atividade antagonista a algumas cepas patogênicas de interesse inibindo seu crescimento devido à atividade bactericida das bacteriocinas que são sensíveis à protease. Além disso, as cepas de bactérias do ácido lático com potencial probiótico conseguem suprimir o crescimento de microrganismos patogênicos, reduzindo o pH do lúmen intestinal por meio da secreção de compostos antimicrobianos, como amônia, bacteriocinas, diacetil, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, como ácido acético e láctico. Ainda, para garantir a segurança das cepas probióticas, é essencial avaliar sua suscetibilidade aos antibióticos e evitar o uso de cepas resistentes, sendo comum susceptibilidade a fármacos como Clindamicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Eritromicina, enquanto resistência é em relação aos antibióticos glicopeptídeos, como Gentamicina, Estreptomicina e outros de interesse a saúde pública e animal (SRINIVASH et al, 2023).

Além disso, é importante que o microrganismo não seja hemolítico, uma vez que a hemolisina é um fator de virulência comum entre os patógenos e pode causar anemia e edema no hospedeiro, tornando o ferro disponível para seu metabolismo. Ademais, é de interesse que essas cepas possuam potencial de autoagregação, a qual efere-se a agregação de bactérias entre células da mesma cepa. Essa capacidade de aderir a cavidade oral e ao trato gastrointestinal é fundamental para proporcionar efeitos benéficos, sendo um fator vital uma vez que formam biofilmes que protegem o hospedeiro da colonização por organismos patogênicos; além disso podem produzir respostas biológicas benéficas, como influenciar o sistema imunológico e aumentar a competição com patógenos intestinais. Outrossim, a propriedade de co-agregação, acoplamento entre bactérias probióticas e patogênicas, é, também, um importante critério de seleção, uma vez que neste processo é reduzido crescimento dos patogênico, com posterior eliminação através da produção de compostos antimicrobianos que atuam diretamente nas células bacterianas (SRINIVASH et al, 2023).

Neste contexto, as principais cepas probióticas estudadas são bactérias ácido-

láticas, gram-positivas, geralmente catalase-negativas, que crescem em microaerofilia. Dessa forma, os probióticos incluem espécies ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*; espécies não ácido- láticas, tais como, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*; e das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (VARAVALLO, 2011).

No que concerne ao gênero *Lactobacillus*, foi primeiramente isolado por Moro em 1900 a partir das fezes de lactentes que foram amamentados com leite materno. Estes, são caracterizados como gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos e apresentam formato bacilar ou cocobacilar, podendo ser anaeróbios ou aerotolerantes. As condições ideais para a multiplicação desses microrganismos são temperaturas entre 35-40 °C. Atualmente, as mais utilizadas os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* (SANTOS et al., 2011).

2.5 Probióticos na aquicultura

Um dos requisitos essenciais para o sucesso de uma criação animal aquática é o crescimento saudável dos animais. Com esse objetivo, têm sido realizados diversos estudos para avaliar os efeitos positivos de diferentes microrganismos como potenciais probióticos. A utilização desses microrganismos na aquicultura é uma abordagem ecológica que visa melhorar a saúde e o crescimento dos animais aquáticos. Através dessa técnica, é possível facilitar a digestão dos alimentos, aumentar a resistência dos animais a patógenos e melhorar sua capacidade de lidar com condições ambientais e nutricionais adversas (SUMON et al., 2022).

Por exemplo, Sugita et al. (2007) isolaram duas cepas de *L. lactis* do intestino de *Silurus asotus*, os quais foram capazes de inibir o crescimento de *A. hydrophila* por meio da produção de peróxido de hidrogênio. Da mesma forma, Nandi et al. (2016) isolaram duas cepas de *Bacillus* sp. do TGI de quatro espécies de peixes de água doce, as quais apresentaram atividade antagonista contra *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sóbria* e *A. fluorescens*, além de produzirem enzimas digestivas, não serem hemolíticas e serem resistentes à bile.

Recentemente, estudos têm demonstrado o efeito da imunomodulação de peixes, principalmente no TGI, após a suplementação probiótica. Esses testes vêm demonstrando que além da eficácia da manutenção da integridade e defesa intestinal, probióticos

autoctones como *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, proporcionaram o aumento do ganho de peso e a taxa de crescimento específico, melhoraram a conversão alimentar e promoveram maior índice de sobrevivência (CAVALCANTE et al., 2020; PAIXÃO et al., 2020). Outras análises demonstram que a adição dessas cepas a alimentação proporcionou maior peso final, ganho de peso diário, atividade da mieloperoxidase, maior atividade fagocítica quando comparados os tratamentos e o grupo controle, e maior resistência ao estresse oxidativo (TACHIBANA et al., 2020; XUEA et al., 2020). No entanto, ainda são escassas pesquisas relacionadas as mudanças que os probióticos ocasionariam na microbiota intestinal, bem como entender como elas afetariam o desempenho do crescimento e as taxas de sobrevivência (ZHANG et al., 2022).

Ademais, estudos realizados no período de 2003 a 2020 relataram, em 51,8% dos trabalhos, que a utilização de probióticos melhorou a resistência contra bacterioses, ocasionadas, principalmente, por *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio ponticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio anguillarum*, *Aliivibrio fischeri*, *Edwardsiella ictaluri*, *Yersinia ruckeri*, e *Lactococcus garvieae*, comprovando a capacidade da inibição de patógenos no TGI. Nessas análises foi demonstrado a capacidade de cepas probióticas em produzir substâncias efeito bacteriostático ou bactericida, tais como bacteriocinas, sideróforos, proteases, lisozimas e peróxido de hidrogênio; modificações no pH intestinal pela produção de ácidos orgânicos e ácidos graxos voláteis (RINGØ et al. 2010; HOSEINIFAR et al. 2017; DE et al. 2014; MOHAPATRA et al. 2014).

Esses estudos também demonstraram, em 50,9% das análises, melhor desempenho zootécnico, como melhores taxas de crescimento, ganho de peso e eficiência alimentar, após a suplementação de probióticos. Esses resultados foram motivados pelo maior consumo do alimento, uma vez que os aditivos proporcionaram melhora no apetite do hospedeiro, além da maior digestibilidade da ração, por meio da quebra de nutrientes inicialmente indigestíveis e produção de vitaminas. Além disso, também foi relatado, em 29,5%, melhora da resposta imune através da contagem superior de células imunológicas, como leucócitos, monócitos e linfócitos. Esses estudos ainda revelaram alterações morfológicas no intestino, em particular na densidade e comprimento das vilosidades, adiconado de maior número de células calciformes, em 8% dos estudos. (LIU et al. 2020; TARKHANI et al. 2020).

Outrossim, ainda demostraram relatos da redução das taxas axas de cortisol nos tecidos, de glicose e lactado no plasma, diminuindo o estresse induzido (NIMRAT et al.

2012; ZORRIEHZAHRA *et al.* 2016; VARELA *et al.* 2010). Além disso, algumas espécies probióticas mostraram eficiência na biotransformação da matéria orgânica em CO₂, minimizaram o acúmulo de carbono orgânico dissolvido durante a fase de crescimento, removeram resíduos de nitrogênio, e proporcionaram maior equilíbrio na produção de fitoplâncton em águas contendo probióticos (KUEBUTORNYE, ABARIKE e LU, 2019; BALCÁZAR *et al.* 2008).

Concomitantemente, Thankappan *et al.* (2015) isolaram *Bacillus* spp. do trato gastrointestinal de *Labeo rohita* e realizaram uma série de testes *in vitro* e *in vivo*, como atividade antimicrobiana, tolerância à baixo pH e sal biliar, ensaio de hidrofobicidade, ensaio de autoagregação, tolerância ao suco gástrico, susceptibilidade à antibióticos, atividade proteolítica e amilolítica, catalase e teste hemolítico. Os resultados mostraram que os isolados probióticos eram seguros e eficazes. Assim como Mouriño *et al.* (2016) isolaram *Weissella cibaria* do intestino de híbridos de *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans* e observaram um aumento significativo na contagem de glóbulos vermelhos em peixes alimentados com esta bactéria em comparação com os não alimentados. Isso sugere o potencial dessa espécie bacteriana como probiótico para o cultivo de surubim. Outros gêneros como *Staphylococcus*, *Pediococcus* e *Enterococcus* também têm mostrado promessa para a utilização como probióticos em peixes.

Outrossim, Mesquita *et al.* (2021) e Telli *et al.* (2014) corroboram com estudos mostrando os probióticos como uma solução eficaz para reduzir os efeitos das espécies reativas de oxigênio que podem ser produzidas em organismos de aquicultura, além de estimular o seu crescimento. Estudos, como o de Kuebutornye *et al.* (2019), demonstraram que a adição de probióticos à alimentação de animais de aquicultura, como o *B. subtilis*, pode melhorar a taxa de utilização de alimentos e aumentar a taxa de crescimento dos animais. Além disso, ao adicionar probióticos diretamente na água da cultura, foi possível melhorar a qualidade da água e dos sedimentos, uma vez que foi alterado a composição bacteriana, protegendo a saúde dos peixes.

Para analisar os mecanismos subjacentes das interações entre o hospedeiro e o microbioma, pesquisadores utilizaram a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) como modelo experimental, com o objetivo de avaliar o impacto de duas bactérias probióticas, *Bacillus velezensis* e *Lactobacillus sakei*. Estes, conduziram Uma série de experimentos, incluindo análises de histologia intestinal, avaliação da fisiologia sérica, análise do transcriptoma e perfis combinados do microbioma intestinal e metabólitos, e obtiveram resultados que demonstraram que ambos os probióticos tiveram um efeito positivo no crescimento da truta arco-íris, melhora da imunidade, da atividade enzimática sérica, na

composição do microbioma intestinal e na resistência ao patógeno *Aeromonas salmonicida*. Além disso, observaram uma remodelação da estrutura microbiana intestinal, com um aumento na abundância relativa de bactérias potencialmente benéficas, como *Roninococcus*, *Lachnospiraceae* ucg-004, *Leptotrichia*, *Bacillus coagulans*, *Porphyromonadaceae*, *Anaerococcus* e *Photobacterium* (ZHAO et al, 2023).

Investigando cepas autoctones do intestino de carpas saudáveis, foi isolado uma nova cepa de *Enterobacter asburiae*, denominada E7. Esta, demonstrou uma ampla atividade antibacteriana contra várias espécies de *Aeromonas*, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. media*, *A. jandaei*, *A. enteropelogenes*, *A. schubertii* e *A. salmonicida*. Além disso, constatou-se que a cepa E7 não apresentava patogenicidade para o hospedeiro e era suscetível à maioria dos antibióticos comumente utilizados (ZHANG et al., 2023). A partir do mesmo princípio a cepa *Phaeobacter piscinae* S26 demonstrou eficácia no combate a espécies patogênicas de *Tenacibaculum*, como *T. maritimum*, *T. soleae* e algumas cepas de *T. discolor*, suprimindo o crescimento e causar a morte dessas espécies patogênicas (TESDORPF et al., 2022).

Ainda, ao realizar um estudo para investigar os efeitos dos antibióticos na mortalidade após um desafio com patógenos de peixes da espécie *Poecilia sphenops*, conhecido como molly preto, foi avaliado se a administração de probióticos poderia reverter quaisquer perdas de resistência à doença induzidas pelos antibióticos, observou-se que o tratamento com antibióticos resultou em um aumento significativo na taxa de mortalidade dos peixes. No entanto, constatou-se que duas espécies bacterianas probióticas, *Phaeobacter inhibens* S4Sm e *Bacillus pumilus* RI06-95Sm, foram capazes de colonizar os microbiomas dos animais e reverteram os impactos negativos causados pelos antimicrobianos (SCHMIDT et al., 2017).

Semelhantemente, utilizando *Aeromonas veronii* com taxa de virulência de 73,3%, isolada de carpas koi doentes, em ensaios in vitro, foi comprovada a suscetibilidade desse patógeno a uma mistura probiótica comercial contendo espécies de *Bacillus*, resultando em uma zona de inibição observada a uma concentração de 10^8 UFC / mL, verificando a preservação da morfologia intestinal e uma contagem adequada de células calciformes, podendo ser uma estratégia eficaz para controlar a perda significativa de produção causada pela infecção em pisciculturas ornamentais (THANH et al, 2021).

Nos últimos anos, a microencapsulação tem sido utilizada para manter a viabilidade dos probióticos, controlar a liberação e fornecer uma dose adequada em um local específico dentro do corpo do animal. Esse método também pode ser usado para preservar nutrientes, minimizar o vazamento e controlar a liberação de nutrientes nas

áreas-alvo, o que pode ajudar a minimizar os impactos ambientais de probióticos e matérias orgânicas na aquicultura (DEZFOOLI et al., 2018).

Utilizando desse princípio, Mohammadian e colaboradores (2021), estudaram os efeitos protetores do *Lactobacillus delbrueckii* microencapsulado na Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus Mykiss*) exposta ao chumbo, e concluíram que a suplementação dietética poderia melhorar os parâmetros de crescimento, reverter os efeitos negativos do chumbo nas enzimas hepáticas, prevenir as disfunções induzidas pelo chumbo das enzimas digestivas, modular os parâmetros bioquímicos séricos e potencializar o sistema de defesa antioxidante em alevinos de truta.

Da mesma forma, Amir et al. (2019), avaliaram a aplicação comercial do probiótico encapsulado dietético *Geotrichum candidum* QAUGC01, verificando o efeito no crescimento e nos índices imunológicos de rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) no sistema de cultura semi-intensiva, demonstraram que houve melhoria da sobrevivência, taxa de crescimento, atividades de enzimas intestinais, hematologia, respostas imunes e expressão gênica HSP 70 de *L. rohita* recomendando seu uso como uma maneira viável e ecológica de complementar a ração convencional.

2.6 Utilização de probióticos na larvicultura

Os microrganismos estão amplamente distribuídos no meio aquático e colonizam os organismos de forma inevitável ao longo de suas vidas, desde a fase imatura do ovo até a fase adulta. A composição taxonômica da microbiota ambiental varia consideravelmente, sendo influenciada por condições climáticas, sazonais e fatores ambientais, como salinidade e temperatura. Organismos aquáticos, incluindo peixes, estão constantemente expostos a invasões microbianas e, para manter a funcionalidade intestinal adequada, o hospedeiro ativamente seleciona microrganismos simbióticos e comensais. No entanto, fatores químicos e fisiológicos variáveis, como pH, salinidade e temperatura, podem influenciar dinamicamente a composição da microbiota. Dependendo da duração de sua presença, os microrganismos podem ser considerados transitórios ou persistentes (WERTZ et al, 2021).

Diversos estudos, que investigaram a comunidade bacteriana intestinal em peixes, concordam que o trato gastrointestinal (GTI) desses animais abriga aproximadamente 10⁸ células bacterianas por grama. Estas, representam cerca de 500 espécies, predominantemente compostas por microrganismos anaeróbicos ou facultativos. Nas

espécies de peixes estudadas, os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* compreendem a proporção dominante da microbiota intestinal. Entre os peixes, os herbívoros apresentam a maior diversidade de microbioma, uma vez que dependem de bactérias como *Clostridium*, *Leptotrichia* ou *Citrobacter* para auxiliar na digestão da celulose presente em produtos vegetais. Devido à compartimentação e microestruturação do GTI, múltiplos habitats com diferentes concentrações de pH e oxigênio são estabelecidos, o que proporciona a existência de múltiplos nichos ecológicos (WERTZ et al, 2021).

A microbiota presente no TGI desempenha um papel fundamental em diversos processos corporais, cujo muitos estudos indicam uma conexão bidirecional entre a microbiota intestinal e o cérebro, mediada por uma variedade de vias, como metabolismo, função imunológica, nervo vago, neurotransmissores e metabólitos microbianos. (FERREIRA, 2015). Ainda, pesquisas apontam que a colonização microbiana no início da vida é o momento mais importante para moldar o desenvolvimento intestinal e imunológico e sugerem que uma maior diversidade microbiana no intestino está associado a uma maior saúde intestinal (VIEIRA, 2022).

Na piscicultura criação de juvenis de alta qualidade de algumas espécies aquáticas é um desafio, uma vez que as larvas de peixes são particularmente vulneráveis devido ao seu sistema imunológico imaturo e alta suscetibilidade a doenças, resultando em uma alta mortalidade durante esta fase, tornando bactérias oportunistas comuns no cultivo potenciais patógenos quando o sistema imunológico do hospedeiro é enfraquecido pelo estresse ambiental, mesmo com nutrição e qualidade físico-química da água adequada (DENG et al, 2022).

Desde a década de 1940, os modelos gnotobióticos, que consistem em animais criados em ambiente controlado e com flora associada totalmente conhecida, têm sido utilizados na pesquisa de animais de aquicultura. De fato, a aplicação desse método tem contribuído para a compreensão de que a microbiota intestinal está envolvida em processos como a captação de nutrientes, a proliferação de células epiteliais intestinais, o desenvolvimento neurocomportamental e a regulação imunológica em peixes (PHELPS et al., 2017).

Estudos relatam a colonização do GTI por microrganismos logo após a eclosão, na fase de larvas quando estas abrem a boca, incorporando micróbios do córion, da água e da ração, o qual permanece habitado por uma população diversificada de organismos ao longo da vida do hospedeiro, mantendo-se relativamente estável, a menos que fatores exógenos, como o uso de antibióticos, contaminação ambiental, características genéticas

e imunológicas do hospedeiro, interferiram no equilíbrio da microbiota (EGERTON et al., 2018).

A colonização precoce de uma microbiota benéfica no intestino pode ajudar no desenvolvimento da imunidade inata, além de facilitar a maturação do trato digestivo e da digestão de nutrientes, bem como prevenir a invasão de patógenos, o que influencia o crescimento e a saúde das larvas de peixes. Portanto, é crucial estabelecer seletivamente uma microbiota benéfica no intestino para garantir uma produção estável de larvas de peixes saudáveis. (DENG et al, 2022).

Estudos recentes têm apontado que a microbiota intestinal das larvas de peixes é mais influenciada pelo ambiente circundante do que nos peixes adultos, indicando a grande importância do ambiente de criação inicial (XIAO et al., 2021). Por exemplo, larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques de recirculação de água (RAS) e tanques de suspensão ativa apresentaram uma composição distinta da microbiota intestinal (GIATSI et al., 2014). Além disso, foi relatada uma semelhança entre as comunidades bacterianas no intestino da tilápia e na água de criação de cerca de 4% a 8%, enquanto também foi observada uma forte correlação nas composições da comunidade bacteriana (DENG et al, 2022)

Além disso, foi comprovado que o uso de probióticos em incubatórios de peixes pode melhorar os parâmetros imunológicos e a sobrevivência das larvas de peixes, podendo ajudar na sobrevivência a patógenos microbianos (SEPPOLA et al., 2009). Dado que a vacinação não é possível devido ao tamanho menor, a administração oral de imunoestimulantes pode ser uma estratégia promissora para combater infecções patogênicas e vários estudos já relatam efeitos positivos dos probióticos em peixes, incluindo o aumento do peso, sobrevivência e atividade dos parâmetros imunológicos (PUVANENDRAN et al., 2021).

O sistema digestivo das larvas e alevinos é pouco desenvolvido e imaturo e imaturo, resultando em uma capacidade reduzida de digestão de alimentos e eficiência na absorção de nutrientes, o que pode retardar seu crescimento. No entanto, a utilização de probióticos pode auxiliar nesse processo, uma vez que estes liberam enzimas digestivas exógenas e estimulam a ativação de enzimas proteolíticas inativas (zimogênios intestinais), promovendo uma melhora na digestão. Isso resulta em um aumento na disponibilidade de proteínas por meio da proteólise, além da liberação de aminoácidos e vitaminas (ISHTHIAQ et al., 2021).

Deste modo, visando garantir a entrega efetiva e liberação controlada das cepas probióticas, é realizada a encapsulação destas em presas vivas (ISHTHIAQ et al., 2021).

A bioencapsulação é uma técnica utilizada para aprimorar o status nutricional e/ou benéfico de organismos alimentares vivos, através da alimentação ou incorporação de diversos tipos de nutrientes. Estes têm sido empregados como vetores para fornecer compostos de valor nutricional diversificado aos estágios larvais de animais aquáticos (RUDTANATIP, et al, 2019).

A bioencapsulação é uma técnica utilizada para aprimorar o status nutricional e/ou benéfico de organismos alimentares vivos, através da alimentação ou incorporação de diversos tipos de nutrientes, fornecendo compostos de valor nutricional diversificado aos estágios larvais de animais aquáticos (RUDTANATIP et al, 2019). Devido ao seu tamanho reduzido, valor nutricional adequado e facilidade de digestão, os rotíferos (*Brachionus spp.*) e artemia (*Artemia sp.*) são amplamente utilizados como alimentos para as larvas de peixes, uma vez podem ser empregados como veículos bioencapsulados para fornecer probióticos aos peixes (ISHTHIAQ et al, 2021).

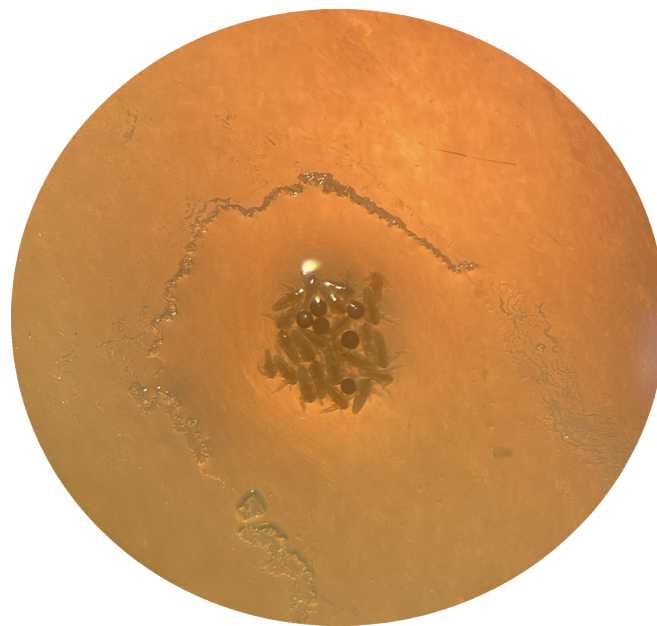


Figura 4 - Náuplio de *Artêmia salina*. Arquivo pessoal

As artemias são cultivadas a partir de cistos, adquiridos comercialmente. Estes, são incubados em condições ideais para a eclosão, incluindo temperatura entre 25 e 30°C; iluminação de 2000 lux durante todo o processo; arejamento contínuo e forte para evitar a deposição dos cistos no fundo; salinidade de 20 a 35; ph 8 ou superior e densidade de 2 gramas por litro (FERREIRA, 2009). Após, aproximadamente, 24 horas, os organismos eclodidos, conhecidos como náuplios, com cerca de 430 micrômetros, mais eficiente no fornecimento de nutrientes para as larvas de peixes pelas suas maiores reservas endógenas de energia. Após a abertura da boca e consumo do vitelo, esses organismos

absorvem as bactérias por absorção ou filtração de partículas em suas vias digestivas e exoesqueletos (DIAS et al, 2011; ISHTHIAQ et al, 2021).

Há mais de 10 anos, pesquisas vem fornecendo evidências quanto a bioencapsulação probiótica em alimento vivo, como a exemplo da suplementação de *Artemia nauplii* com *B. subtilis*, a qual para protegeu as larvas de robalo contra a infecção por *V. anguillarum*, fornecendo um método alternativo ecológico e livre de antibióticos para a profilaxia de larvas de peixes marinhos contra vibriose (TOURAKI et al, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado que a bioencapsulação de *Bifidobacterium animalic* e *Lactobacillus johnsonni* no alimento vivo resultou em um aumento significativo no crescimento de larvas de *Chirostoma jordani* (peixe charal) nos primeiros 30 dias. Além disso, a alimentação de larvas de dourada com *Planococcus* sp. bioencapsulado demonstrou significância na sobrevivência, comprimento, peso, crescimento específico, teor de proteína e valor nutricional lipídico das larvas. Observou-se também um aumento na atividade de proteases, no número e comprimento das vilosidades intestinais e no número de células caliciformes, sugerindo uma melhora na digestão e absorção dos nutrientes. Em outra análise, a utilização de artemia enriquecida com *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação do peixe molly (*Poecilia latipinna*) resultou em melhorias no crescimento, sobrevivência, atividade de lisozima e resposta imunológica das larvas (ISHTHIAQ et al., 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Prospectar a efetividade da adição de cepas de bactérias lácticas obtidas a partir da microbiota intestinal de tambaquis saudáveis, a partir das suas repercussões fisiopatológicas e zootécnicas em larvas da mesma espécie, quando expostas ao desafio da bactéria *Aeromonas hydrophila*

3.2. Específicos

- Isolar e identificar linhagens de bactérias lácticas presentes na microbiota intestinal de tambaquis saudáveis;
- Avaliar a viabilidade das linhagens isoladas testes in vitro;
- Investigar os efeitos da suplementação com as linhagens de bactérias lácticas sobre a resposta fisiopatológica das larvas de tambaqui desafiadas com *Aeromonas hydrophila*;
- Analisar o impacto da suplementação com as linhagens de bactérias lácticas na performance zootécnica das larvas de tambaqui;
- Comparar os resultados obtidos com um grupo controle não suplementado, visando estabelecer diferenças significativas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi executado na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), em conjunto aos Institutos de Biodiversidade e Floresta (IBEF) e Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA). Para as coletas de material biológico foram adotados

Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso Animal, UFOPA, nº 0620180030).

4.1 Obtenção e viabilidade de probióticos isolados de tambaquis saudáveis

Para obtenção das cepas bacterianas, foram adquiridos de pescadores locais, 14 tambaquis saudáveis (*C. macropomum*), oriundos do rio Amazonas, em Santarém – Pará (2°26'35.02"S e 54°42'29.99"W). Os peixes foram levados ao Laboratório de Sanidade Animal (LARSANA) e eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico, utilizando solução de benzocaína (10 g/mL, álcool 98°). Os intestinos foram excisados assepticamente e enxaguados com solução salina, a 0,9%, estéril, e posteriormente o tecido foi inoculado em Placa de Petri de 90 mm, contendo os meios de nutritivos TSA (Trypticase Soy Agar) (Difco®) e MRS (de Man Rogosa & Sharpe) (Kasvi®) acrescido do corante Azul de Anilina a 1%.

Dessa forma, o semeio direto foi realizado utilizando fragmentos do estômago, intestino e fezes, bem como um mix, realizado pela maceração do intestino + fezes e 100 µL do cultivo do intestino em caldo MRS por 6 horas. As placas foram acondicionadas em ambiente de anaerobiose a 37°C por 24 horas. Ao final desse período, foi realizado os isolamentos das cepas bacterianas, as quais foram direcionadas à testes de caracterização *in vitro*.

4.1.1 Microrganismos e condição de cultura

As bactérias lácticas isoladas foram mantidas em meio MRS acrescido de glicerol 25%, a -20°C, e as colônias suspeitas identificadas por suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas (ZANINI et al., 2012). A reativação das culturas foi realizada em cultivo em caldo MRS e incubação por 18 horas a 37°C.

4.1.2 Triagem: teste de Gram, aatalase e atividade hemolítica

Para o teste de catalase, cada colônia foi depositada em uma lâmina de vidro, e sob elas foi adicionado 10 µL de Peróxido de Hidrogênio. Dessa forma as que reagiram formando bolhas de gás, correspondendo a conversão do peróxido de hidrogênio em

água e oxigênio, foram consideradas catalase positivas. Para tanto, foi utilizado como controle positivo cepas *Aeromonas hydrophila* e como controle negativo *Lactobacillus* sp., microrganismos sabidamente positivos e negativos, respectivamente. As colônias com resultado negativo para produção de catalase foram submetidas à coloração de Gram. Para este teste, foi, inicialmente, preparado um esfregaço de cada colônia em lâmina para microscopia. Em seguida procedeu-se a coloração de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante do Kit. Após secagem, as lâminas foram analisadas no microscópio óptico em aumento de 40.000x e 100.000x.

A seleção de bactérias com baixo/nulo potencial patogênico e de virulência, foi realizada através o teste de hemólise. Esse teste assegura que as cepas selecionadas com potencial probiótico não causarão danos à saúde do peixe. Para a realização do teste, os bacilos Gram positivo e Catalase negativo, foram difundidos meio TSA (Himedia) e enriquecido com 5% de sangue equino, conforme o esquema apresentado na Figura 5. Posteriormente as placas foram incubadas, em anaerobiose, em estufa a 37°C/24h. Após crescimento, o ágar foi analisado quanto à formação de zonas hemolíticas, e classificados da seguinte forma: β -hemólise (zonas transparentes ao redor das colônias), α -hemólise (zonas cinzas-esverdeadas ao redor das colônias) ou γ -hemólises (ausência de zonas ao redor das colônias). Somente os isolados γ -hemólise foram selecionados.

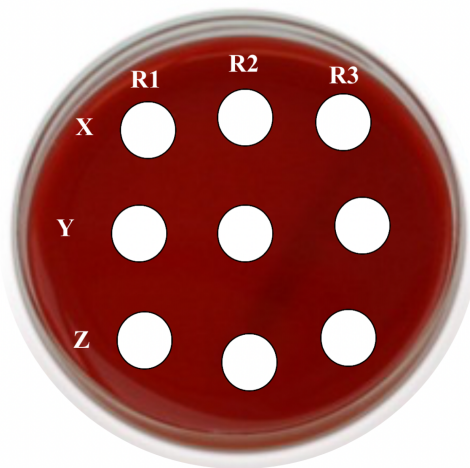


Figura 5 - Representação esquemática correspondente a utilizada no ensaio de Atividade Hemolítica. Arquivo pessoal.

4.2 Reação em cadeia da polimerase do fragmento do gene 16S

A amplificação do fragmento do gene 16S foi realizada utilizando o *primer* Lac1 (F5'- AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3') e Lac2 (R5'-GATTYCACCGCTACACATG-3') específico para o gênero *Lactobacillus* sp. e os *primers* Bac

('F5'-TCACCAAGGCRACGATGCG-3') e 16S (5'-TCACCAAGGCRACGATGCG-3') (R5'-CGTATTCACCGCGGCATG-3') específicos para *Bacillus* sp. e para gêneros filogeneticamente próximos.

Neste protocolo, foram testados dois kits de PCR: DramTaq Green (1) e Xtra Platus (2). Na reação do primeiro kit foi utilizado 1 µM do primer F, 1 µM do primer R, 25 µL da solução do kit, 1 µg da colônia bacteriana e completado para 50 µL com água ultrapura. O kit 2 teve a reação composta por 5 µL de Tampão 10x Xtra Platus, 5 µL da mistura de sNTP's, 1 µM do primer F, 1 µM do primer R, 1 µg de da colônia bacteriana, 0,25 µL de XtraPlatus DNA Polimerase e completado para 50 µL com água ultrapura. A reação ocorreu em um termociclador (Proflex PCR Sistem) com um volume de 50 µL.

O programa de amplificação utilizado para o primer Lac1e2 foi composto por um passo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto, finalizando com a extensão a 72°C por 30 minutos. Para o programa do primer 16S foi realizado um passo inicial de desnaturação por 3 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, por fim um passo de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram separados em uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% em 0,5x TBE (45 mM Tris, 45 mM de ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8,0). Após o preparo do gel e, juntamente às alíquotas de 5 µL dos produtos da PCR, foram adicionados 1 mL de tampão de corrida. Foi utilizado um peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Ao final da corrida, retirou-se o gel, cuidadosamente, e visualizou-se as bandas no aparelho de luz UV (Loccus) e fotografou-se o gel.

4.3 Capacidade Anti-Aeromonas

A capacidade anti-*Aeromonas* das cepas selecionadas foi determinada pelo ensaio de antagonismo diferido de Harris et al. (1989) e adaptado por Campagnollo et al. (2018). Para tanto, cada linhagem bacteriana foi cultivada nas condições descritas acima (1.1), posteriormente tiveram a concentração ajustada OD A600 = 0,15; semeados 100 µL, por espalhamento, em ágar MRS; e incubadas, em anaerobiose, a 37°C/24h.

Em conseguinte, da mesma forma, foi realizado o cultivo e padronização de uma cultura de *A. hydrophila*, em ágar TSA. Para cada uma das cepas bacterianas isoladas, foi preparada uma placa contendo a bactéria teste, e sob ela foi colocado um disco

(cepa+meio), como demonstrado na Figura 6. Após a incubação das placas a 37°C/24h, as zonas de inibição de *A. hydrophila* foram inspecionadas qualitativamente por ausência ou presença.

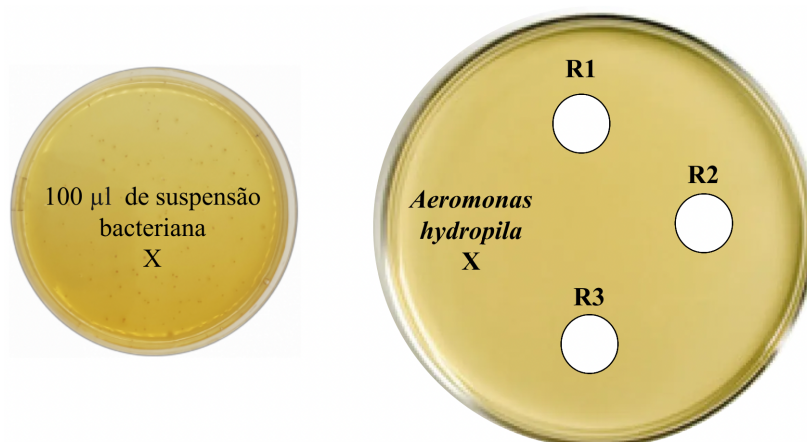


Figura 6. Representação esquemática correspondente a utilizada no ensaio de atividade antagonista. Arquivo pessoal

4.4 Análise da resistência bacteriana

A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006), utilizando o teste de difusão em disco. Dessa forma, foram utilizados discos comerciais dos antibióticos: Estreptomicina (10 µg), Oxitetraciclina (10 µg), Penicilina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Clorafenicol (30 µg) e Eritomicina (15 µg) para verificar resistência bacteriana. Para tanto, após o cultivo, as culturas foram padronizadas a OD A600 = 0,15; semeadas 100 µL, por espalhamento, em ágar MRS. Foi preparada uma placa de cada isolado para cada antimicrobiano testado, e sob ela foi colocado 3 discos, mais o controle. Após a incubação das placas a 37°C/24h, as zonas de inibição de crescimento foram inspecionadas qualitativamente por ausência ou presença.

4.5 Viabilidade e crescimento em diferentes pH.

As cepas foram cultivadas em caldo MRS (37°C/18horas); posteriormente lavadas e a concentração ajustada a densidade ótica (OD) A600 = 0,7, em espectrofotômetro. Para a análise, foram inoculadas em caldo MRS com o pH ajustado para: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0;9,0, acertados com HCl ou NaOH. O crescimento das culturas foi

acompanhado durante 12 horas medindo-se a absorbância em 600nm, em leitor de microplaca. As curvas de crescimento foram comparadas ao desempenho em MRS pH 6. A viabilidade também foi testada pela inoculação em ágar MRS e observação da formação de colônias.

4.6 Teste de autoagregação

As colônias bacterianas foram cultivadas a 37°C/24h, em tubos Falcon de 15 mL, contendo caldo MRS. Posteriormente ao processo de lavagem (com salina (NaCl) 0,9%), foram padronizados na densidade ótica (OD) A600 = 0,3. As suspensões foram agitadas e incubadas a 37°C por 5 horas. A absorbância da solução foi aferida utilizando-se um espectrofotômetro a 600nm pela retirada de 1mL da porção superior da suspensão a cada hora.

A porcentagem de autoagregação foi medida pela fórmula:

$$\%A = (A_i - A_f / A_i) \times 100$$

Onde A_i corresponde a absorbância inicial e A_f corresponde a absorbância final. Sendo classificados seguindo a escala: baixo = $\%A < 33\%$; moderado = $33\% < \%A < 66\%$; elevado = $\%A > 66\%$ (BOUCHARD et. al, 2015).

4.7 Teste de coagregação

Os isolados e uma cultura de *A. hydrophila* foram cultivados em tubos contendo seus respectivos meios de cultura e incubados a 37°C/24h. Posteriormente ao processo de lavagem, foram padronizados na densidade ótica A600 = 0,3. Logo após, foi preparada uma solução contendo, na mesma proporção (1:1), suspensão bacteriana dos isolados e da linhagem patogênica. Em seguida, os tubos foram agitados e incubados a 37°C por 5 horas, e após esse período foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

Adicionalmente, tubos controle contendo somente bactérias ácido lácticas e somente bactérias patogênicas, também foram examinados. A porcentagem de coagregação foi avaliada pela fórmula:

$$\% = [(A_x + A_y) / 2 - (A_{xy})] / [(A_x + A_y) / 2] \times 100$$

Onde Ax corresponde a Absorbância do tubo controle somente com os isolados, Ay a absorbância da bactéria patogênica e Axy a absorbância obtida após a mistura dos isolados e bactéria indicadora.

4.8 Hidrofobicidade

Os isolados foram cultivados em tubos Falcon de 15 mL contendo caldo MRS e incubadas a 37°C/24h. Após a lavagem com salina 0,9% foram padronizados OD A600 = 0,7. Em seguida, as suspensões bacterianas foram misturadas ao solvente Tolueno na proporção de 1:1. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e os tubos incubados a 37°C durante 2 horas. Depois desse período, a absorbância da fase aquosa foi mensurada em espectrofotômetro a 600nm.

A porcentagem de hidrofobicidade foi calculada conforme a fórmula:

$$\% \text{ hidrofobicidade} = ((A_i - A_f) / A_i) \times 100$$

Onde Ai refere-se a absorbância inicial e Af a absorbância da fase líquida após duas horas. Sendo classificados seguindo a escala: baixo= % < 33%; moderado= 33% < % < 66%; elevado= % > 66% (BOUCHARD et. al, 2015).

4.9 Formação de biofilme

Após a incubação inicial, realizou-se um novo cultivo em caldo MRS + 1% de glicose. A cultura foi diluída, no mesmo meio, na proporção de 1:100 e incubada a 37°C/24h, em placa de poliestireno de 96 poços. Após o período de incubação, a placa foi lavada com salina (NaCl) 0,9% e fixadas em estufa a 65°C por 1 hora. Posteriormente, foi adicionado a cada poço cristal violeta 1% por 30 min a temperatura ambiente, seguido de duas lavagens com salina (NaCl) 0,9%. Os poços foram então repleenidos e então procedeu-se a leitura da absorbância a 492nm utilizando um leitor de microplacas. A formação de biofilme por *Streptococcus pyogenes* ATCC75194 foi usado como padrão para calcular o índice de formação de biofilme, dado pela fórmula:

$$IFB = x/y$$

Onde x OD de bactérias ácido lácticas e y OD controle. A classificação foi realizada da seguinte forma: não produtor = IFB ≤ 0; Fraco = 0 < IFB < 1; Moderado = 1 < IFB < 2; Produtor = 2 < IFB < 3; Forte = IFB > 4

4.10 Resistência a bile

Foi utilizado sais biliares comercial de 150 mg (Pluri Pharma) a 10%, para avaliar a capacidade da cepa em tolerar a bile, e assim, chegar íntegra ao intestino do animal, onde objetiva-se a colonização. Neste teste, cada bactéria cultivada e posteriormente ao processo de lavagem, foram padronizados na densidade ótica A600 = 0,15, sendo então diluída em PBS, para obtenção da concentração de 1×10^7 UFC/ml, requerida para o teste. Uma alíquota de 500 μ L de cada inóculo será centrifugada e resuspendida em 10% de bile, e incubadas a 37°C por 1,5h. Depois da incubação, as amostras foram diluídas serialmente em PBS estéril, e as colônias viáveis foram contadas após plaqueamento de cada diluição seriada em duplicata no ágar MRS. No caso de certificação da sobrevivência, o isolado foi classificado como tolerante à bile.

4.11 Teste de patogenicidade *in vivo*

Para avaliação da biossegurança dos isolados foram utilizados 30 tambaquis (93,4 \pm 7,8 g), adquiridos, juntamente ao Laboratório Múltiplo para Produção de Organismos Aquáticos (LAMPOA / UFOPA), acondicionados em 6 aquários (60 L / n=5), abastecidas com água de poço artesiano, vazão de 1 L/min., aeração artificial e alimentados com ração comercial (*ad libitum*, 28% de PB e 4000 kcal de EB kg⁻¹). Durante o período de aclimatação (6 dias), foi realizado a análise dos parâmetros qualidade da água diariamente (Oxigênio Dissolvido, Condutividade, Temperatura, pH, Amônia e Nitrito).

Os peixes foram divididos em dois grupos, um dos grupos inoculado 0,5 mL de suspensão as cepas bacterianas, cultivadas em caldo MRS a 37°C por 24 horas e posteriormente o ajuste da concentração para OD A600 = 0,15 via intracelomática; e o outro injetado com 0,5 mL de solução salina (0,65%) - controle. A determinação foi feita pela observação da sobrevivência e alterações clínicas / comportamentais dos animais foram verificados diariamente durante o período experimental. Foi estabelecido o prazo máximo de observação de quinze (15) dias.

Ao final do período experimental, foi realizada a necrópsia de 2 peixes / tratamento para análises macroscópica de alterações internas e coleta sangue por punção caudal para hemocultura. Os órgãos foram examinados a fim de investigar a presença de hemorragia e quaisquer alterações inflamatórias e/ou infecciosas. A hemocultura foi

realizada em todos os tempos tratamentos. Após a coleta do sangue total, 50 µL de sangue foram semeados, sem diluição, pelo método de espalhamento em placas de Petri, contendo meio TSA. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 horas, a 30 °C em atmosfera de aerofilia. A seguir, as placas foram levadas ao contador de colônia para sua verificação da presença ou ausência de crescimento microbiano.

4.12 Análise da eficácia *in vivo* utilizando como modelo experimental larvas de *Colossoma macropomum*: desempenho zootécnico e sanidade

Esta análise foi conduzida nos Laboratório de Sanidade Animal, Laboratório Múltiplo Para a Produção de Organismos Aquáticos e Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará.

4.12.1 Larvas e delineamento experimental

Foram adquiridas 20.000 larvas de *C. macropomum*, 3 dias após a eclosão, provenientes de um criatório local. As larvas foram acondicionadas em uma caixa de 500 litros e posteriormente divididos em 24 unidades experimentais (UE), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos Controle, CTL; I3, I10, F4, M13, M14.

Para tanto, cada UE recebeu 500 larvas, na densidade de 50 indivíduos para cada litro de água, totalizando 12.000 exemplares. As larvas foram aclimatadas durante sete (7) dias, no qual foi ofertado como alimento vivo 15.000 náuplios de artemia (30 nauplios/larva) durante 6 vezes ao dia (06:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00, 02:00).

4.12.2 Preparo do alimento vivo (*Artêmia salina*) e enriquecimento com probiótico

Os cistos de Artêmia foram incubados diariamente em água salinizada (30%), com temperatura de 28°C, com iluminação constante, durante 24 horas. Após a incubação, os cistos foram descartados e os náuplios foram contados pela amostragem de 100 µL da solução total. Após o tempo de incubação, os náuplios de artêmia foram levados a um erlenmeyer (250mL) onde receberam as cepas probióticas na concentração de $(1.0 \times 10^8$

UFC/mL), durante o período de 40 minutos para o efetivo enriquecimento antes de administrar as alimentações.

4.12.3 Preparo da ração

Foi utilizada ração farelada comercial[®] de 35% PB e 3200kcal.kg⁻¹ de energia digestível (ED), recomendada de acordo com a fase de vida dos animais. Dessa forma, para a suplementação preparou-se um mix utilizando 2g de ração para cada 2µl de suspensão bacteriana (1.0×10^8 UFC/mL) adicionada diretamente ao farelo, e posterior homogeneização em vortex. Em seguida, a ração foi armazenada em estufa a 37 °C por 48 horas para secagem e crescimento bacteriano durante o período experimental de 15 dias

Ao final da aclimatação, foi iniciado o período experimental. Nessa etapa, as cepas probióticas foram administradas por enriquecimento do alimento vivo, 6 vezes ao dia (06:00, 10:00, 14:00, 18:00, 22:00, 02:00), recebendo, cada aquário, 90.000 náuplios por dia.

Após 5 dias utilizando somente alimento vivo, para completar o ciclo diário de alimentação, foi ofertado ração comercial, em pó, suplementada com as cepas probióticas, *ad libitum* (06:00, 14:00, 22:00). Subseqüentemente, após o período de 5 dias, o alimento vivo foi gradativamente substituído por ração farelada, alterando um dos horários da alimentação com artemia.

A cada 5 dias, uma amostragem das larvas de cada UE foi feita, para realização de biometria, parâmetros microbiológicos e imunológicos (16 unidades por UE). Durante o período experimental, o controle de qualidade de água foi realizado duas vezes ao dia (08:00 e 16:00h) com a utilização de equipamento multiparâmetro, aferindo-se a temperatura (°C), concentração de oxigênio dissolvido (mg/L), pH e condutividade elétrica (µS/cm) da água de cada unidade experimental. Além disso, amostras de água foram coletadas três vezes por semana para a determinação da concentração de amônia total (mg/L), nitrito (mg/L). A higienização do sistema experimental foi realizada diariamente através da remoção de sólidos por sifonamento do fundo do aquário, realizado antes do último período de alimentação, e troca parcial de de 50% do volume total de cada unidade experimental. No controle do fotoperíodo a intensidade luminosa foi reduzida para inibir o canibalismo, sendo adotado o regime de penumbra durante o dia e ausência de luz durante a noite.

Ao final do período experimental, todas as larvas de tambaqui foram contadas e realizada a biometria de 10 larvas de cada unidade experimental para avaliação da Sobrevivência (%) = (Número final de larvas/Número inicial de larvas) *100; e parâmetros de crescimento: Comprimento Total, Comprimento Padrão, Diâmetro do Olho e Altura da Cabeça.

4.12.4 Análise Microbiológica

Para verificar a presença das cepas I3, I10, F4, M13 e M14, foi realizado o plaqueamento da artemia e ração suplementada antes da alimentação das larvas. O mesmo foi realizado para o alimento do controle usando salina 0,9%. Além disso, para quantificar o crescimento das cepas microbianas, foi retirado 4 larvas de cada UE (n=16 por tratamento). Dessa forma, cada amostra foi macerada em almofariz e diluída serialmente (1/10) em solução salina estéril e posteriormente semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura MRS e acondicionadas em estufa, a 37 °C por 48 horas. Os resultados foram classificados como ausência e presença de crescimento microbiano.

4.12.5 Infecção por *Aeromonas hydrophila*

Ao final dos 15 dias de suplementação com as cepas com potencial probiótico, as larvas seguiram para o desafio bacteriano com cepas do patógeno *Aeromonas hydrophila*. A sepse foi induzida utilizando a concentração de 0,25 em leitura da densidade óptica (DO) na absorvância de 625 nm (DO625), correspondente a 50% da dose letal. A cepa de *A. hydrophilla* foi reativada em TSA a 37 °C/24 h. Após o crescimento, as colônias foram diluídas em TSB estéril e incubadas sob agitação a 100 rpm/28 °C/24 h, até atingir a concentração de 0,25. A concentração bacteriana deste pré-inóculo foi confirmada pelo plaqueamento (em duplicata) das diluições seriadas do inóculo em PBS estéril (1:9) e determinada em 10⁹ UFC/mL. Alíquotas de 25 mL da solução do pré- inóculo foram colocadas em 40 tubos falcons estéreis de 50 mL. O conteúdo de cada tubo foi diluído em 475 mL de água da U.E. correspondente (500 mL de volume de imersão, em potes de desafio de 1 L, com aeração constante). A imersão das larvas foi realizada através de um banho curto de 2 horas. Os mesmos procedimentos foram realizados no grupo controle, mas com imersão das larvas em solução salina estéril. Após o período de imersão, as larvas foram transferidas com 100 mL da solução correspondente usada no banho para novas U.E.

Por conseguinte, as larvas foram transferidas para UE de 1 litro, utilizando 50% do seu volume. Em cada aquário foram colocadas 25 larvas, sendo o experimento constituído de um delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos, com 3 repetições: (a) Grupo controle não infectado, (b) Grupo controle infectado, (c) I3 infectado, (d) I3 não infectado, (e) I10 infectado, (f) I10 não infectado, (g) F4 infectado, (h) F4 não infectado, (i) M13 infectado, (j) M13 não infectado, (k) M14 infectado e (l) M14 não infectado. À vista disso, para a notificação dos dados de mortalidade, as larvas foram monitoradas por 5 dias, e para confirmar a infecção foi realizado o plaqueamento de 2 larvas de cada UE em TSA.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram submetidos às análises de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e feito o teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov; Anderson-Darling; Shapiro-Wilk e Watson). Estabelecida a normalidade dos dados foi realizada comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou teste Dunn's (5%). O programa estatístico experimental utilizado foi “software R”. Os dados de sobrevivência foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 9 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA)..

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento, classificação morfológica, tintorial e potencial patogênico/virulência.

Foram isoladas um total de 115 cepas bacterianas por meio da semeadura direta do trato gastrointestinal e seu conteúdo. Dessas cepas, 66 foram identificadas como bacilos Gram positivos e apresentaram resultado negativo no teste de Catalase. Quando observadas em placa de cultivo, as colônias bacterianas apresentavam características distintivas: esbranquiçadas, com uma aparência brilhante, forma arredondada e bordas bem definidas, o que facilitava a sua identificação visual.

Para garantir a ausência ou baixo potencial patogênico das cepas isoladas, foi realizado o teste de atividade hemolítica. Este, constatou-se que cinco cepas apresentaram uma classificação γ -hemolítica, indicando a ausência de capacidade de lise

dos glóbulos vermelhos. Essas cepas foram identificadas como I3, I10 (isoladas do tecido intestinal), F4 (isolada do conteúdo fecal), M13 e M14 (isoladas da mistura de tecido intestinal e fezes).

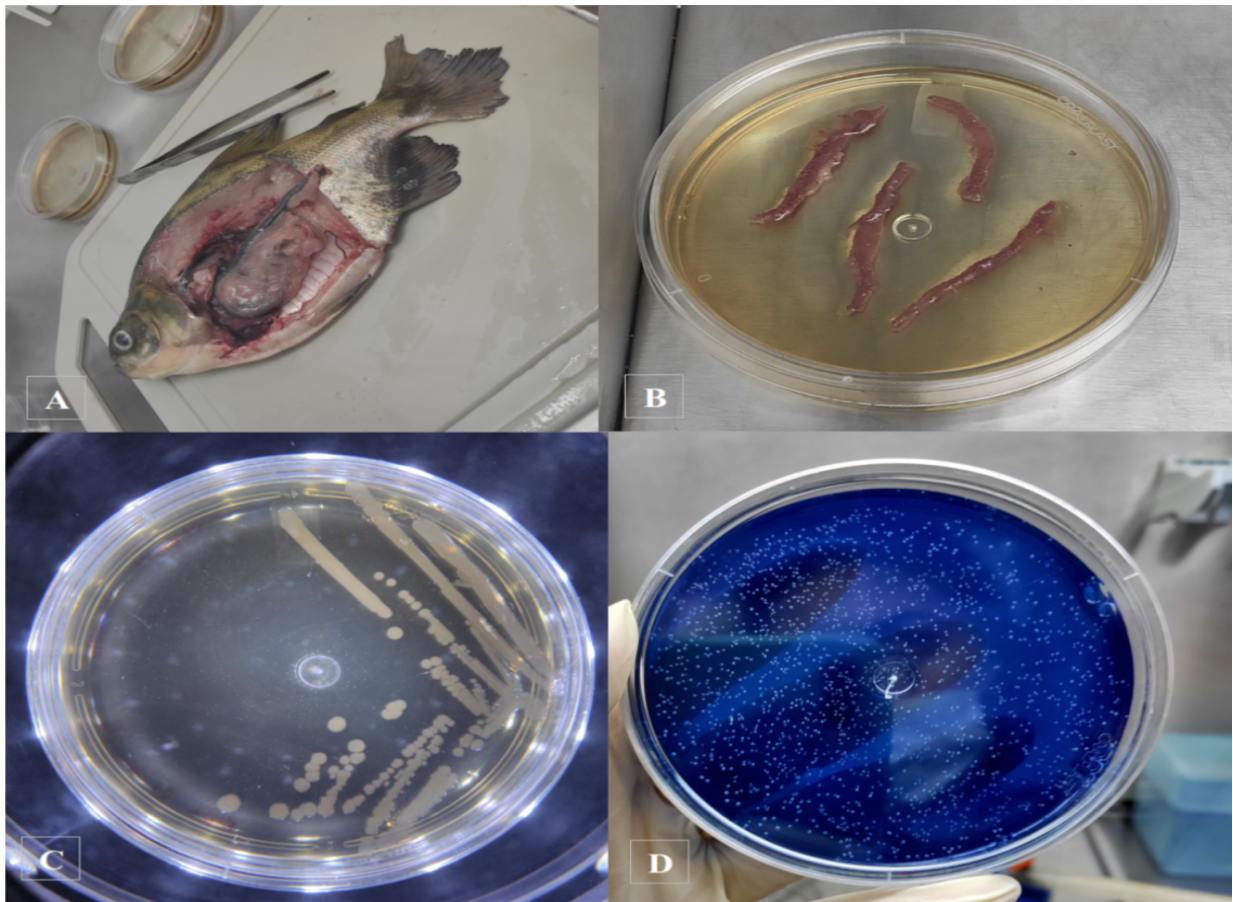


Figura 7 - (A) Coleta do aparelho gastrointestinal de tambaqui. (B) Semeio direto de fragmento do intestino em ágar TSA. (C) Isolamento de cepa bacteriana. (D) Diluição seriada em ágar MRS com adição do corante Azul de Anilina. Arquivo pessoal.

5.2 PCR eletroforese em gel

Com o uso desses primers direcionados para os gêneros *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp. e gêneros filogeneticamente relacionados, foi possível identificar e classificar as cepas bacterianas dentro do grupo de *Lactobacillus*, uma vez que houve a presença de bandas amplificadas para os primers Lac 1 e 2, conforme ilustrado na Figura 8.

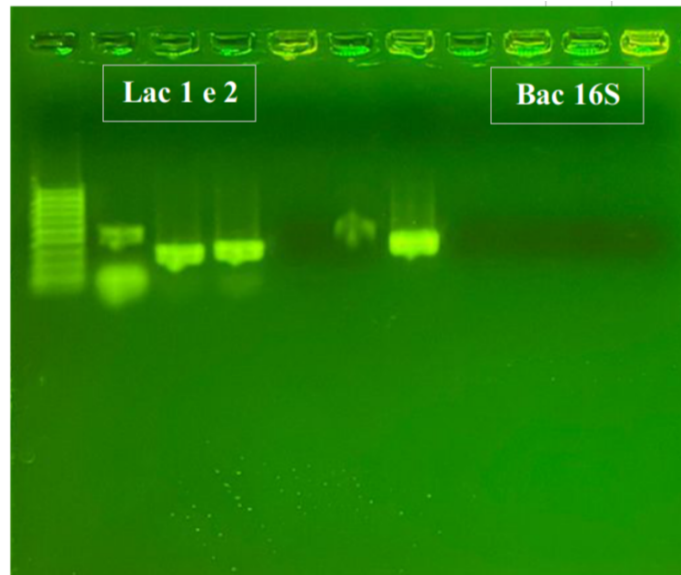


Figura 8 - Amplificação de fragmento de DNA das cepas isoladas, utilizando o primer Lac 1 e 2 em gel de agarose a 2%

5.3 Capacidade Anti-*Aeromonas*

Após 24 horas de incubação, as cinco cepas isoladas demonstraram a capacidade de inibir o crescimento de *A. hydrophila* quando adicionados na concentração de 10^8 UFC/ml. A análise qualitativa e quantitativa dos resultados foi realizada com base na medição do tamanho do halo de inibição formado ao redor das culturas bacterianas. Essa análise, representada graficamente na Figura 9, apresenta a média do tamanho dos halos de inibição em milímetros.

Através dessa técnica, foi poscepas teste culturas bacterianas isoladas em relação a cepa *A. hydrophilla*, demonstrando o potencial dessas culturas em produzir substâncias com propriedades inibitórias, uma vez que as cepas I10 e M14 produziram halo de inibição de $17,33 \pm 3,05$ e $19,33 \pm 1,15$ respectivamente.

Atividade Antagonista

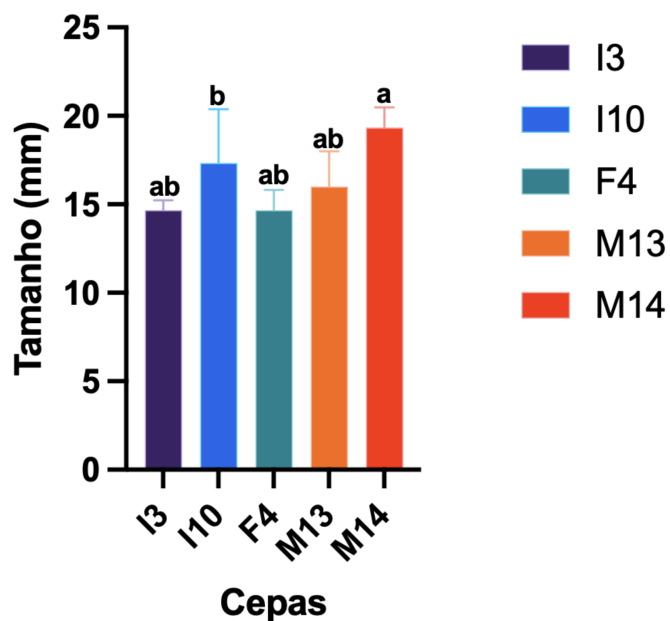


Figura 9 - Análise quantitativa: tamanho em mm do halo de inibição formado pelas cepas isoladas de tabaqui, demonstrando capacidade anti-*Aeromonas*.

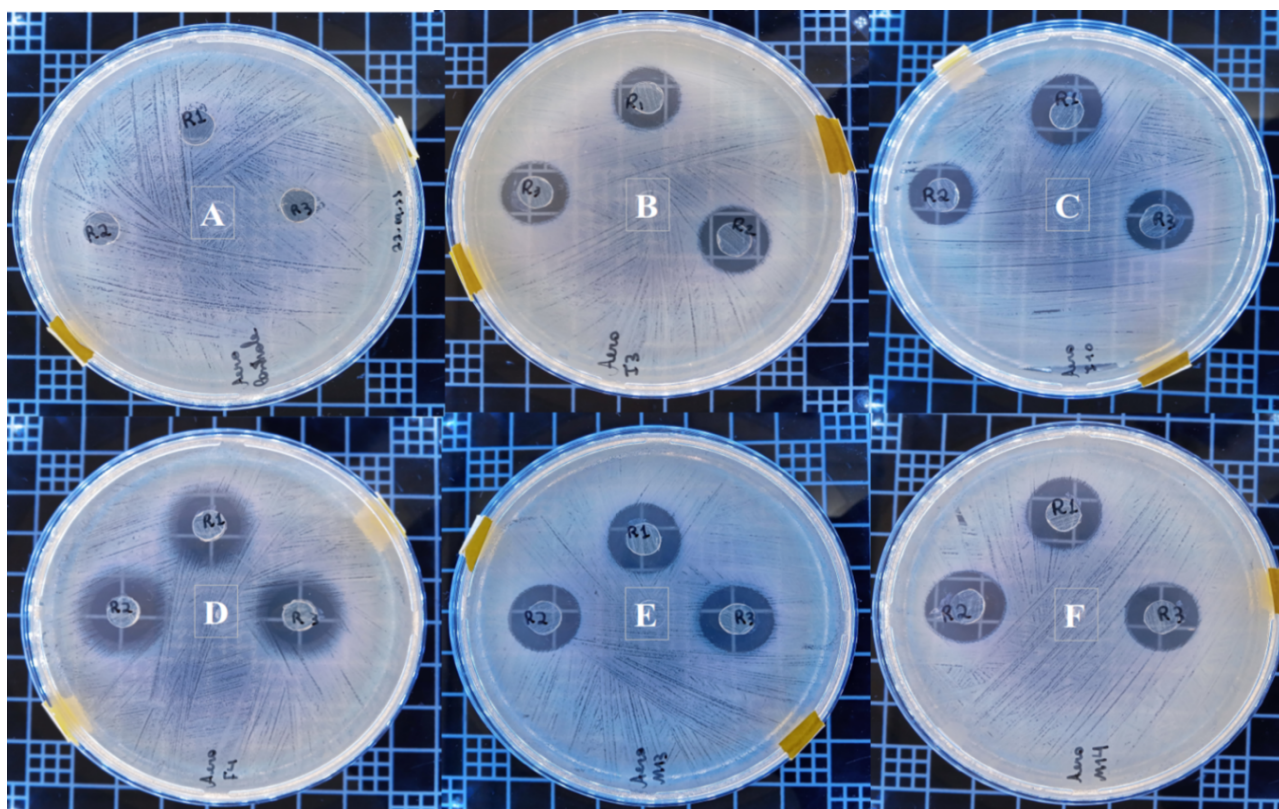


Figura 10 - Inibição de crescimento de *A. hydrophila* por cepas bacterianas isoladas do intestino de tabaquis selvagens. (A) Controle. (B) I3. (C) I10. (D) F4. (E) M13. (F) M14. Arquivo pessoal.

5.4 Análise da resistência bacteriana

No teste qualitativo realizado e apresentado na Tabela 1, foram avaliadas as respostas das cepas com potencial probiótico em relação a antimicrobianos comerciais amplamente utilizados na aquicultura. A suscetibilidade das cepas aos antimicrobianos foi determinada por meio da formação de halos de inibição de crescimento microbiano ao redor das colônias bacterianas.

Observou-se que as 5 cepas apresentaram susceptibilidade aos antimicrobianos Oxitetraciclina, Penicilina, Ampicilina, Clorafenicol e Eritromicina, o que foi evidenciado pela formação de halos de inibição em torno das colônias, indicando que os isolados foram inibidos pelo efeito desses fármacos. No entanto, todas as cepas mostraram resistência ao antibiótico Estreptomicina, cujo mesmo na presença desse antimicrobiano, não foi observada a formação de halos de inibição ao redor das colônias bacterianas em toda a placa de cultivo.

Tabela 1: Sensibilidade microbiana de cepas isoladas de Tambaqui a exposição a antimicrobianos comerciais. (-) Susceptível ; (+) Resistente. *Oxitetraciclina; *Estreptomicina.

Cepa	Antimicrobianos					
	Oxitr.*	Estrepto*	Penicilina	Ampicilina	Clorafenicol	Eritromicina
I3	-	+	-	-	-	-
I10	-	+	-	-	-	-
F4	-	+	-	-	-	-
M13	-	+	-	-	-	-
M14	-	+	-	-	-	-

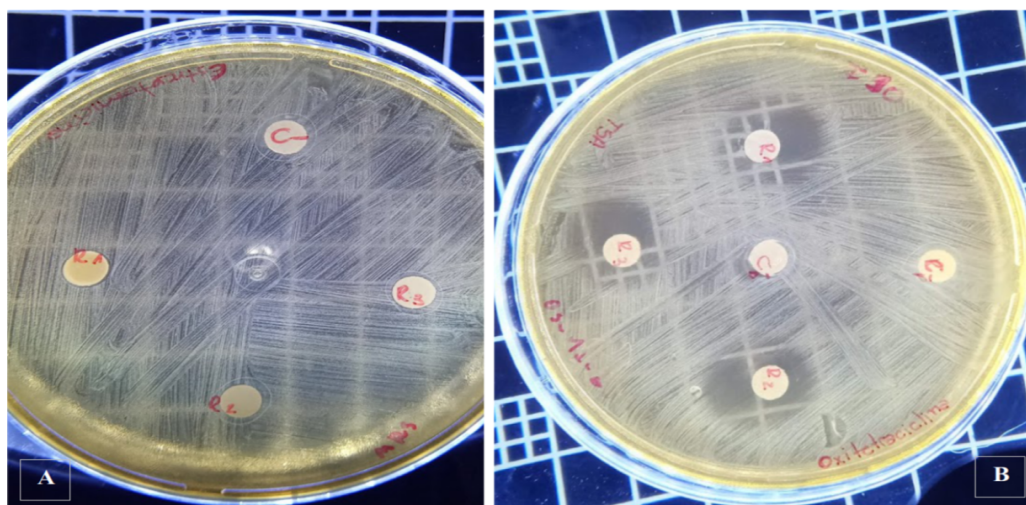


Figura 11 - Análise da resistência bacteriana dos isolados. (A) Resistência ao fármaco Eritromicina. (B) Susceptibilidade ao antimicrobiano Oxitetraciclina.

6.5 Viabilidade e crescimento após cultivo em diferentes faixas de pH e sais biliares.

Uma vez que o pH afeta diretamente o crescimento bacteriano foi analisado em uma ampla faixa de pH, variando de 2,0 a 9,0, objetivando de investigar a capacidade das cepas de crescer em condições ácidas e alcalinas, além de identificar o valor ideal de pH para um crescimento adequado. Com base nos resultados experimentais, foi constatado que os isolados foram capazes de sobreviver em pH extremamente ácido (pH 2 a 3) e pH alcalino (pH 7 a 9), no qual o crescimento máximo (DO= 0,879) foi observado em pH 8,0.

Durante todo o período de exposição às diferentes faixas de pH, as cepas bacterianas demonstraram crescimento e sobrevivência, como observado nas 12 horas de leitura e após o plaqueamento em meio de cultura MRS (Figura 12). Quando expostas a um meio de cultura com pH 2, a cepa M13 apresentou um desempenho superior em relação às outras cepas testadas. Por outro lado, no teste com pH 3, a cepa I3 demonstrou o melhor resultado.

Notavelmente, quando a acidez do meio de cultura foi reduzida, como nos testes com pH 4 e 5, todas as cepas apresentaram um crescimento exponencial durante as 12 horas de observação. Esse crescimento foi especialmente evidente nos meios alcalinos, onde, nas primeiras 5 horas, as cepas registraram um crescimento cerca de 8 vezes maior do que a concentração inicial. Além disso, os resultados evidenciaram um crescimento exponencial das cepas quando expostas a meios de cultura menos ácidos, tanto nos pH 4 e 5, bem como em meios alcalinos.

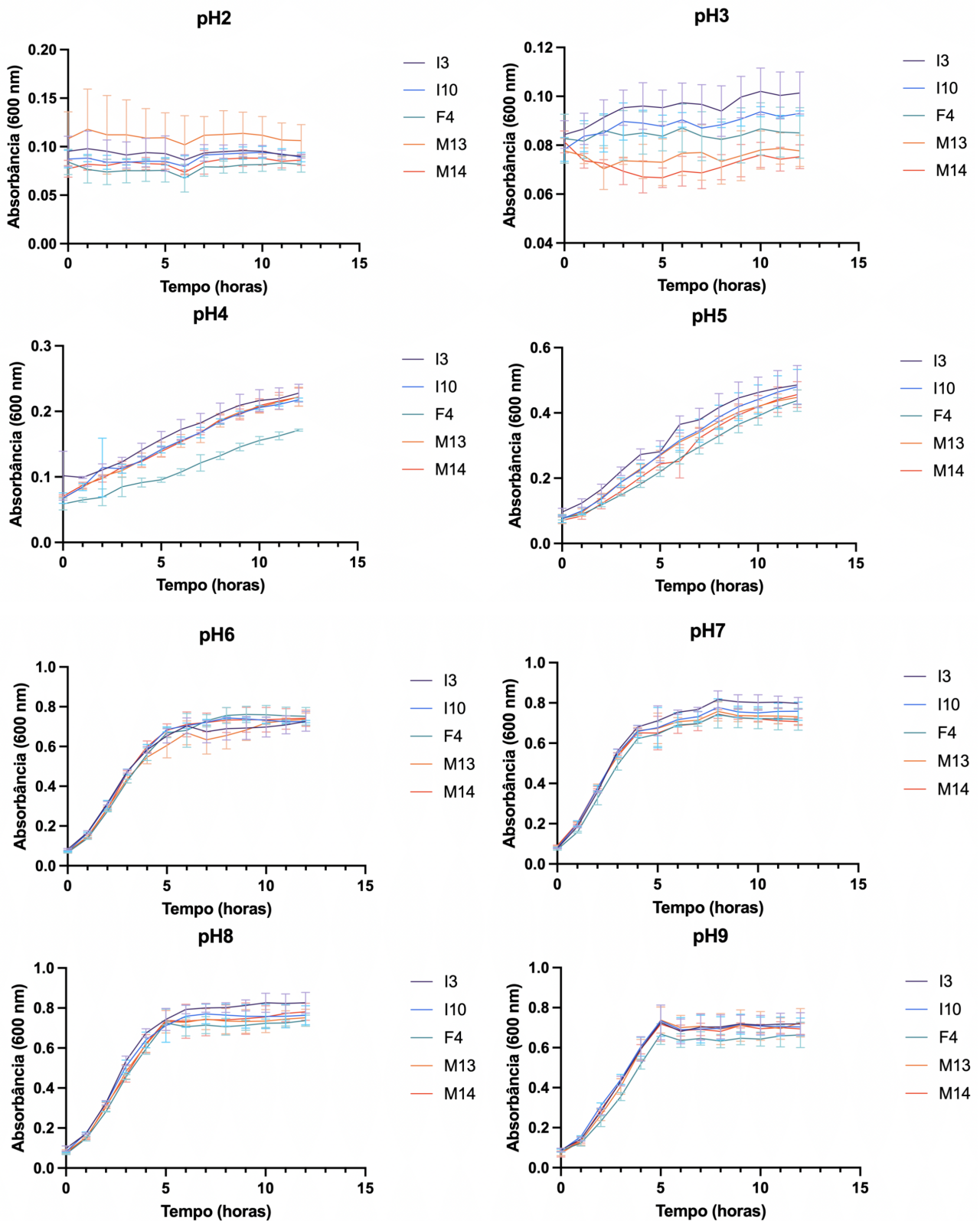


Figura 12 - Crescimento das cepas bacterianas isoladas de *Colossoma macropomum* durante 12 horas de cultivo em diferentes faixas de pH.

Neste estudo, as cepas bacterianas testadas foram submetidas à exposição a sais biliares e sua capacidade de sobrevivência foi avaliada, conforme demonstrado na Figura

X. Foi observado que todas as cepas testadas não foram afetadas pela presença dos sais biliares, uma vez que apresentaram taxa de sobrevivência.

No entanto, a cepa I10 se destacou com a maior taxa de sobrevivência, atingindo 15,9%. Essa taxa de sobrevivência foi significativamente ($P > 0,05$) maior em comparação com as demais cepas testadas. Os isolados M14, F4, M13 e I3, apresentaram taxas de sobrevivência de 5,2%, 3,9%, 2,9% e 1,5%, respectivamente.

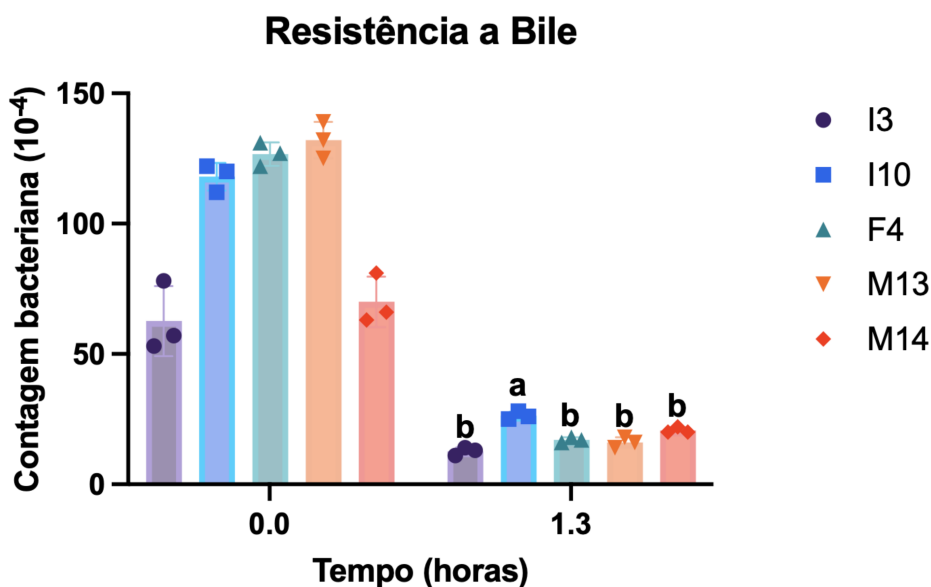


Figura 13 - Contagem inicial e final do crescimento microbiano após incubação por 1 hora e 30 minutos em meio de cultura contendo 10% de sais biliares.

5.6 Teste de autoagregação e coagregação

As análises estatísticas realizadas revelaram que não houve diferença significativa na capacidade de autoagregação entre os isolados I3, F4 e M14 ao longo do período de teste. No entanto, a cepa I10 demonstrou um potencial significativo de autoagregação desde o início do ensaio até a terceira hora, com uma taxa de 15,79%. Por outro lado, o isolado M13 apresentou essa habilidade de forma consistente ao longo de todo o período de teste, com uma taxa de autoagregação de 28,05%.

Os resultados obtidos foram expressos em termos de absorvância, conforme mostrado na Figura 14. Essa medida quantitativa permite avaliar a extensão da autoagregação ao longo das 5 horas de teste. Embora os isolados I3, F4 e M14 não tenham demonstrado diferenças significativas em relação à autoagregação, a cepa I10 e o

isolado M13 se destacaram como apresentando um maior potencial de autoagregação ao longo do período de teste.

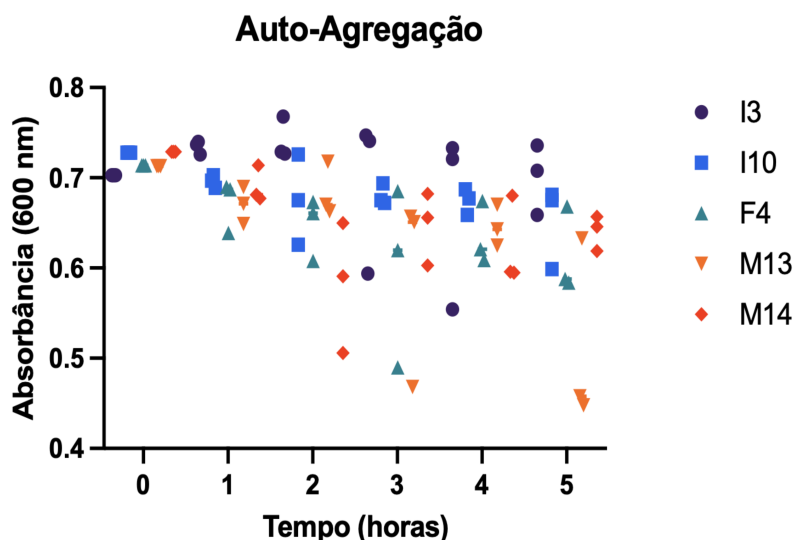


Figura 14 - Gráfico demonstrando potencial de auto-agregação de cepas com potencial probiótico isoladas do intestino de tambaqui, no tempo teste de 5 horas.

Os resultados do teste de coagregação, representados na Figura 15, revelaram percentuais de coagregação variando entre os isolados testados. A cepa I3 apresentou um percentual de coagregação de 33,96%, indicando uma capacidade moderada de ligação com a bactéria patogênica *A. hydrophila*. Por outro lado, as cepas I10 e F4 se destacaram, exibindo a melhor capacidade de coagregação, com um percentual de 50,1% para ambas, indicando uma forte ligação e interação entre essas cepas probióticas e a bactéria patogênica.

As cepas M13 e M14 demonstraram um potencial significativo de coagregação, com percentuais de 42% e 39,8%, respectivamente. Isso indica uma capacidade considerável dessas cepas em se ligarem à bactéria patogênica e formarem agregados.

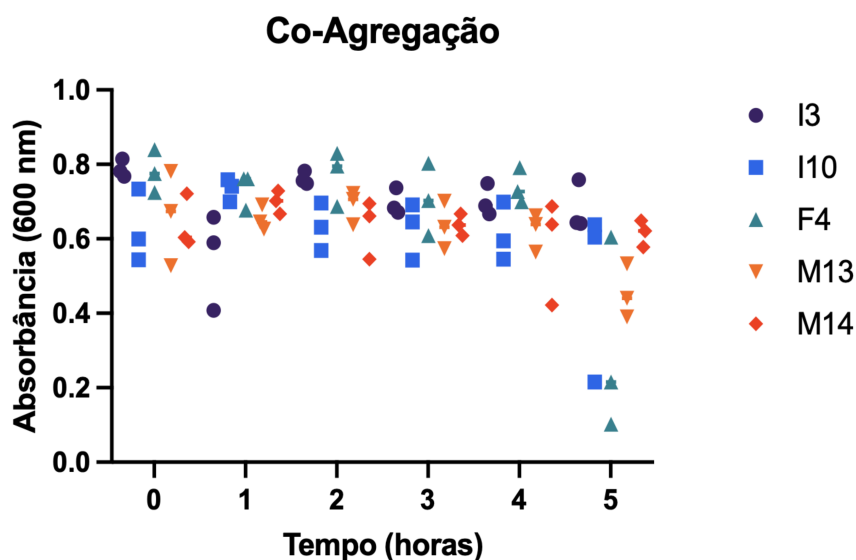


Figura 15 - Gráfico demonstrando potencial de co-agregação de cepas com potencial probiótico isoladas do intestino de tambaqui, no tempo teste de 5 horas.

5.7 Hidrofobicidade

O resultado do teste de hidrofobicidade indicaram diferentes níveis de adesão ao epitélio intestinal para os isolados I10, M13, M14, I3 e F4. Através da quantificação da hidrofobicidade, foi possível observar que os isolados I10, M13 e M14 apresentaram um potencial elevado de hidrofobicidade, enquanto I3 e F4 mostraram um potencial moderado.

Esses resultados sugerem que as cepas probióticas possuem a capacidade de aderir ao epitélio intestinal devido à presença de moléculas, de características hidrofóbicas, que favorecem a interação e adesão dessas cepas ao hospedeiro. A Tabela 2 apresenta a porcentagem de hidrofobicidade e a classificação dos isolados testados.

Tabela 2 - Porcentagem e classificação de hidrofobicidade da superfície celular de bactérias isoladas do intestino de *C. macropomun*.

Cepa	% Hidrofobicidade	Classificação
I3	62,08 ± 6,64 b	Moderado
I10	87,27 ± 4,21 a	Elevado
F4	57,33 ± 12,26 b	Moderado
M13	71,90 ± 14,98 a	Elevado
M14	83,87 ± 13,24 a	Elevado

4.8 Formação de biofilme

O resultado do teste, conforme apresentado na Figura 16, permitiu avaliar a capacidade dos isolados em produzir biofilme. Os resultados demonstraram que o isolado M14 se destacou dos demais, apresentando uma quantidade significativamente maior de biofilme ($p > 0,05$), caracterizando-o como um forte produtor (IFB = $7,14 \pm 0,97$).

Os isolados I3, I10 e F4 foram classificados como produtores de biofilme (IFB = $3,12 \pm 0,09$, IFB = $3,61 \pm 0,28$ e IFB = $3,66 \pm 0,81$, respectivamente). Por outro lado, o isolado M13 foi classificado como produtor moderado (IFB = $2,49 \pm 0,41$).

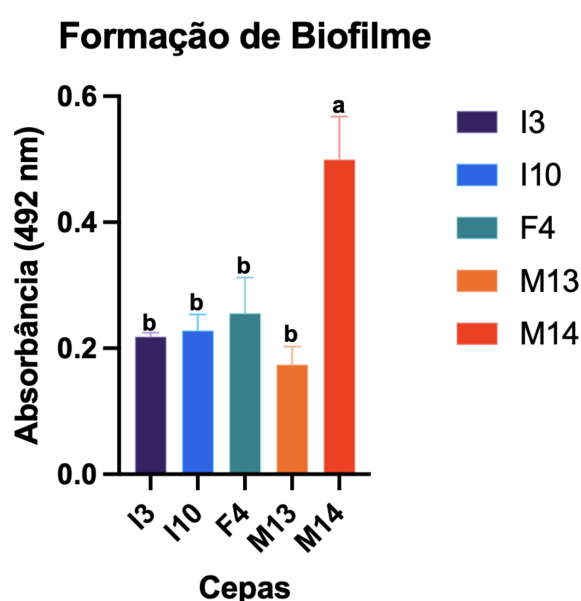


Figura 16 - Absorbância em 492 nm das cepas autóctones de Tambaqui para cálculo do índice de formação de biofilme.

5.9 Teste de patogenicidade

As 5 cepas demonstraram não causar efeitos adversos no desenvolvimento dos peixes. Ao contrário, observou-se um ganho de peso significativo em relação ao grupo controle para as cepas I3 e I10. Durante o período de monitoramento de 15 dias, não foram registradas alterações clínicas, comportamentais ou mortalidade nos peixes inoculados.

A necropsia realizada nos peixes após o período de observação não revelou alterações morfológicas nos órgãos, bem como não foram observados sinais de inflamação, infecção ou outros indícios de patogenicidade, indicando a inocuidade das cepas inoculadas.



Figura 17 - Delineamento experimental dos tratamentos no Laboratório de Comportamento Animal, na UFOPA. Delineamento inteiramente causalizado: (A) I3. (B) Grupo controle. (C) F4. (D) M14. (E) 10. (F) M13. Arquivo pessoal.

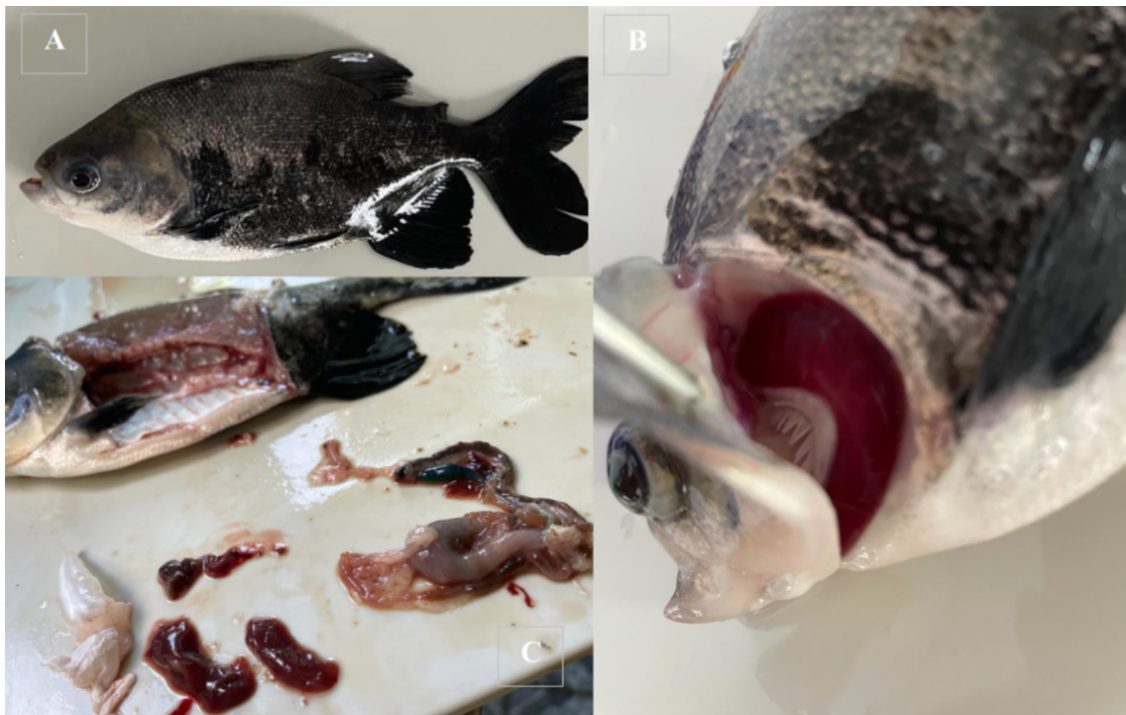


Figura 18 - Análise morfológica de tambaqui juvenil após 14 dias de aplicação de suspensão bacteriana na cavidade celomática. A, B e C dentro da normalidade e ausência de alterações indicativas de patogenicidade. Arquivo pessoal.

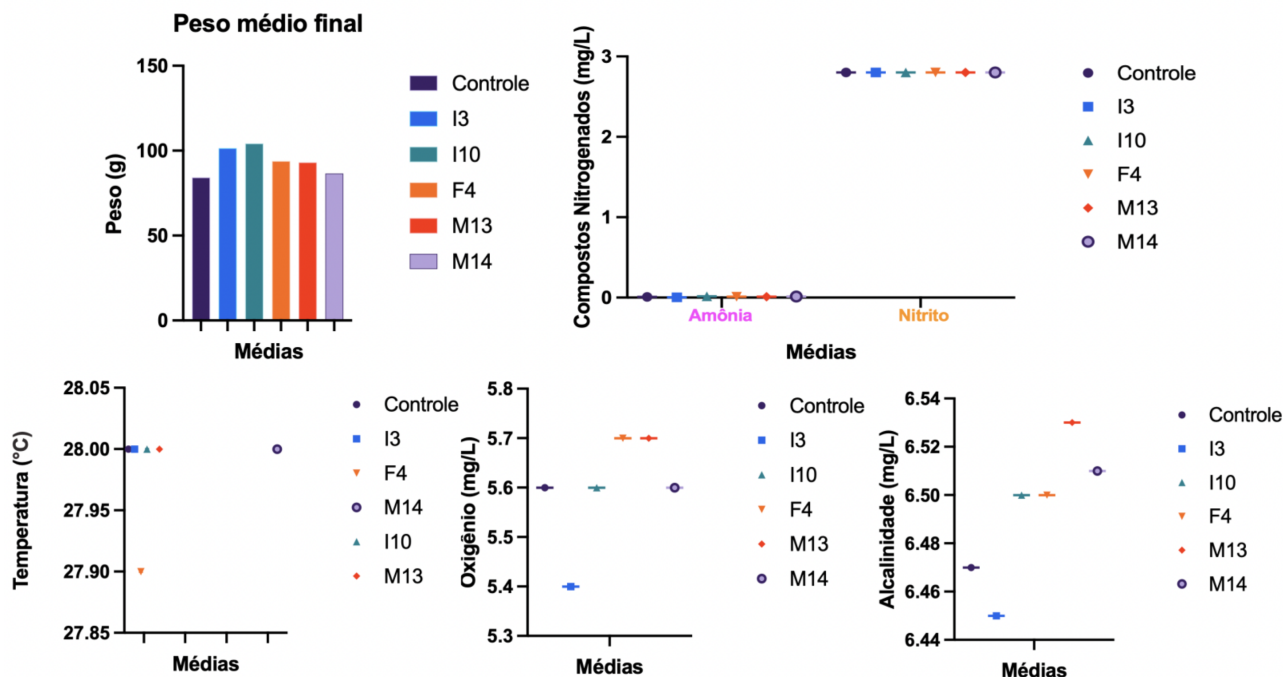


Figura 19 -Peso médio final e parâmetros de qualidade da água durante os 14 dias de teste de patogenicidade, utilizando suspensão de cepas com potencial probiótico em tambaquis juvenis.

5.10 Teste *in vivo* utilizando como modelo experimental larvas de *Colossoma macropomum* - Desempenho zootécnico e resistência a *A. hydrophila*.

Os parâmetros físicos e químicos da água, dispostos na Figura X, como temperatura ($28,14 \pm 1,18$ °C), pH ($7,84 \pm 0,04$), oxigênio dissolvido ($6,33 \pm 0,11$ mg L⁻¹), tanto entre os tratamentos quanto ao longo do experimento, não apresentaram diferenças significativas que pudessem afetar os resultados obtidos. No entanto, a análise de produtos nitrogenados revelou um aumento na concentração de amônia e nitrito no decorrer do experimento.

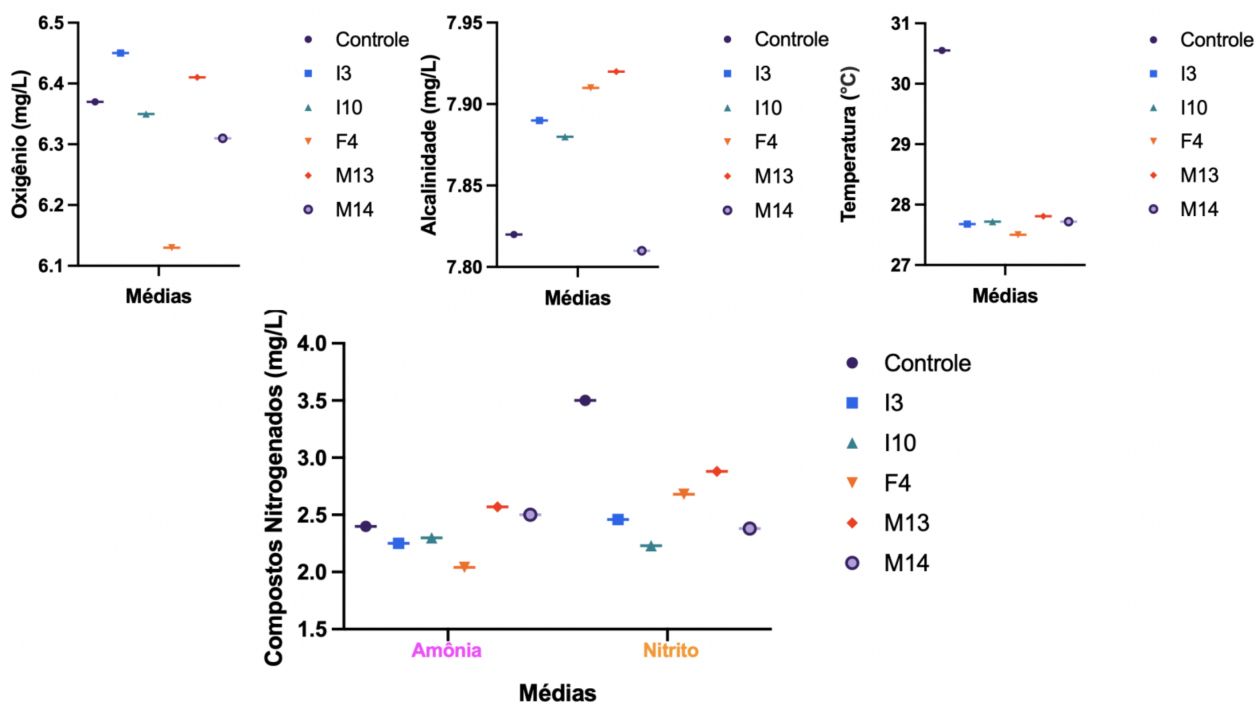


Figura 20 - Gráficos das médias dos parâmetros de qualidade da água durante os 15 dias de suplementação com cepas potenciais probióticos no alimento vivo *A. salina* e ração comercial.

Nas análises microbiológicas realizadas, foram observados resultados consistentes de crescimento, com uma contagem de 10^8 UFC/mL, na diluição 10-4, tanto nas amostras de alimento suplementado (artemia e ração) quanto nas amostras de larvas coletadas ao longo do experimento dos tratamentos I3, I10, F4, M13 e M14. Essa contagem indica a presença das cepas bacterianas nos organismos das larvas de tambaqui, reforçando a capacidade de colonização e interação entre os probióticos e o sistema gastrointestinal desses organismos.

Após os 15 dias de suplementação, as análises revelaram uma taxa de sobrevivência acima de 50% para todos os tratamentos, indicando um efeito positivo dos probióticos na viabilidade das larvas. Esses resultados são especialmente destacados pela cepa M13, que apresentou o maior percentual de sobrevivência, com uma média de $72,23 \pm 26,16$. Essa taxa de sobrevivência elevada sugere que a presença dessa cepa probiótica teve um impacto significativo no aumento da resistência e da saúde das larvas durante o período de suplementação.

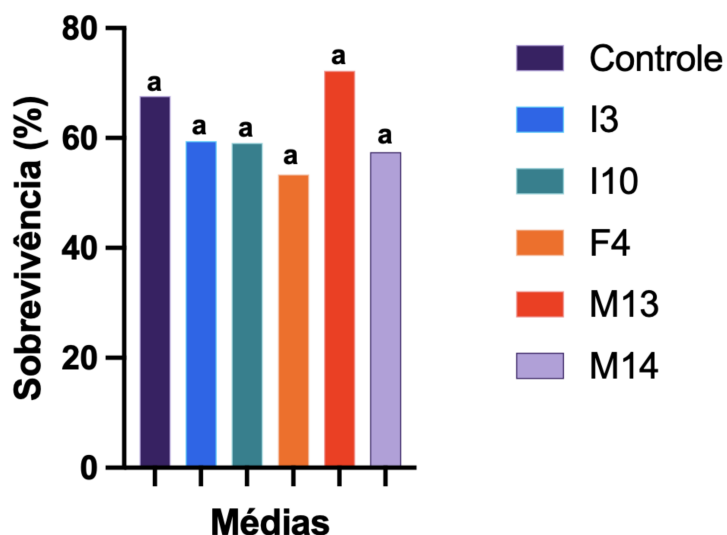


Figura 21 - Porcentagem das médias de sobrevivência de larvas de tambaqui após 15 dias de alimentação com alimento vivo, *A. salina*, e ração comercial suplementação com cepas potenciais probióticos.

Durante o período experimental, foram observados resultados distintos em relação ao desenvolvimento das larvas de acordo com o tratamento alimentar. Na primeira coleta, realizada após 5 dias de suplementação, verificou-se que o fornecimento de artemia suplementada com as cepas bacterianas resultou em uma maior taxa de crescimento ($P > 0,05$) nos parâmetros de Comprimento Total e Altura da Cabeça em comparação ao grupo Controle, que recebeu uma dieta inerte. Mais especificamente, os tratamentos com I3 e M13 demonstraram um Comprimento Padrão significativamente maior do que os demais tratamentos, além de um Diâmetro do Olho mais desenvolvido, sugerindo que essas cepas bacterianas contribuíram de forma substancial para o crescimento e desenvolvimento das larvas nesse período inicial.

Na segunda coleta, realizada após 10 dias de suplementação, os resultados indicaram que o Tratamento M13 apresentou um melhor desenvolvimento em todos os parâmetros avaliados em comparação aos demais grupos. Esse tratamento se destacou especialmente no Comprimento Padrão e no Diâmetro do Olho, demonstrando um crescimento significativamente superior em relação ao grupo Controle. Essa diferença indica que a suplementação com a cepa M13 teve um impacto positivo no desenvolvimento das larvas de tambaqui nessa fase intermediária do experimento, conforme o quadro apresentado na Figura 22.

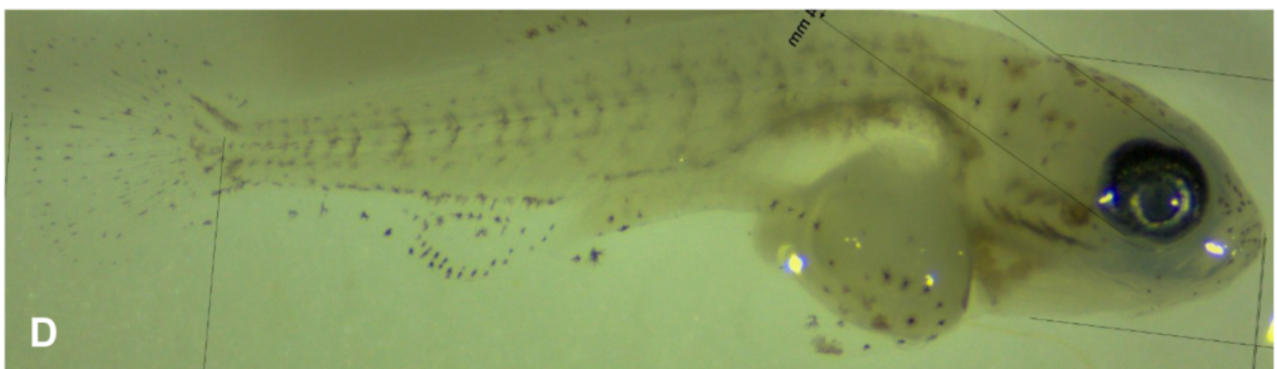
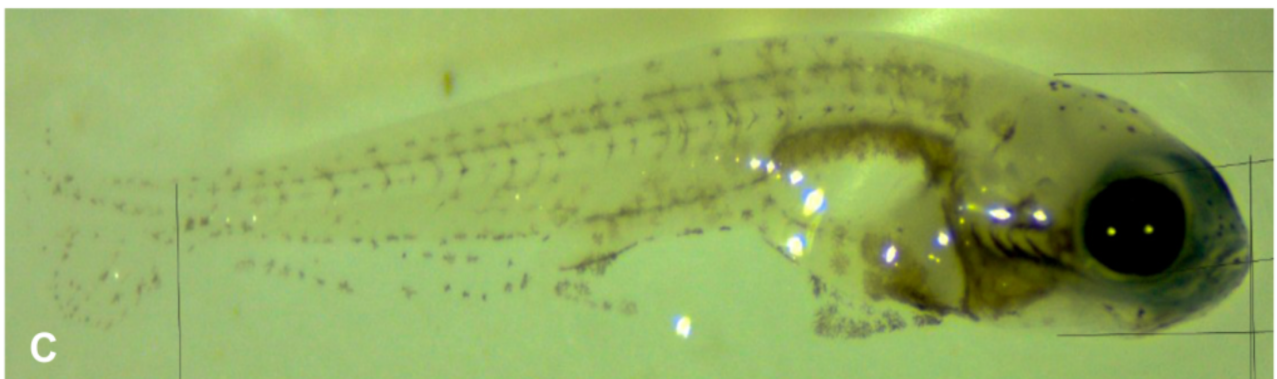
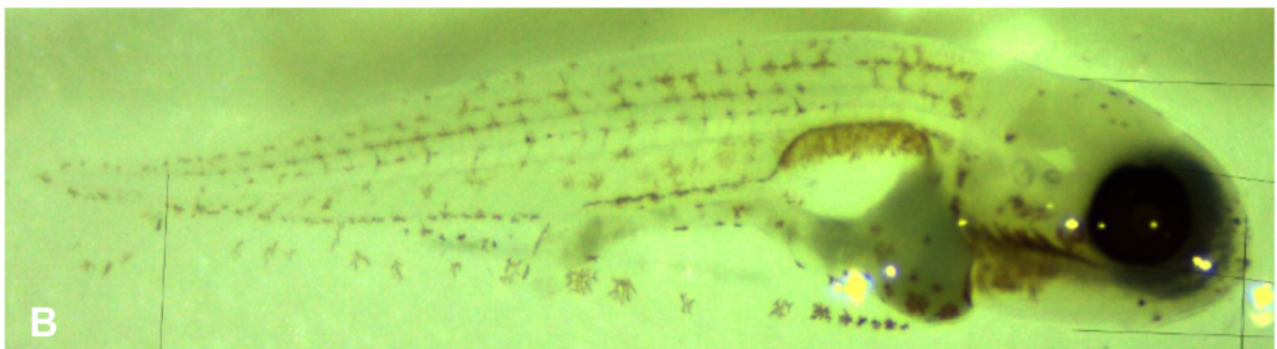
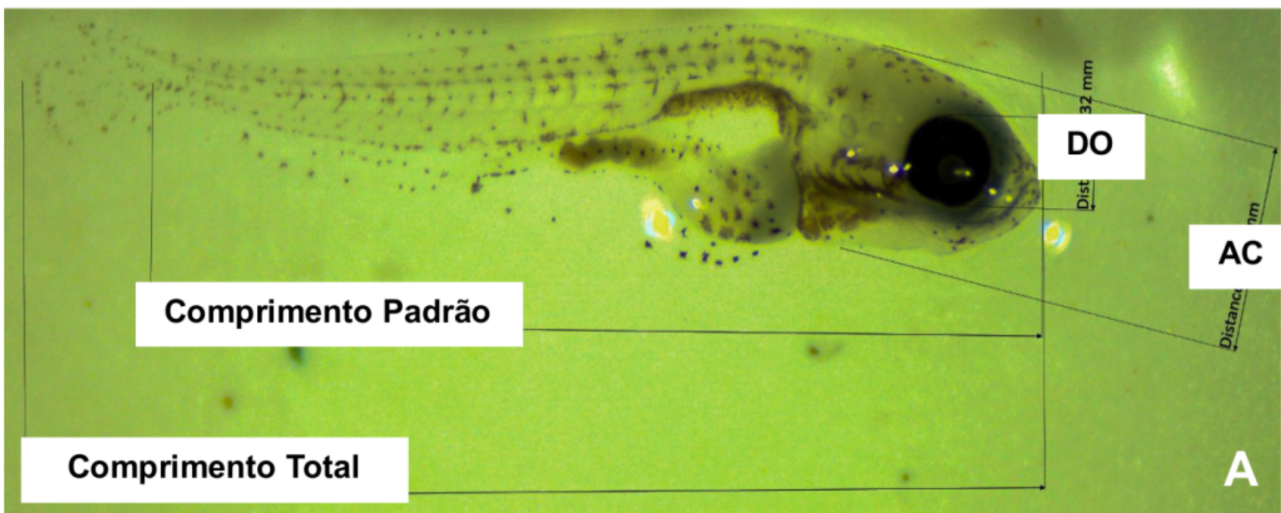


Figura 22 - Desenvolvimento das larvas do Tratamento M13 durante os 15 dias de suplementação em comparação ao tratamento controle. (A) Larva do Tratamento CTL com 15 dias de experimento demonstrando os padrões morfométricos analisados: Comprimento Total, Comprimento Padrão, Diâmetro do Olho e Altura da Cabeça. (B) Larva do Tratamento M13 com 5 dias de suplementação. (C) Larva do Tratamento M13 com 10 dias de suplementação. (D) Larva do tratamento M13 com 15 dias de suplementação.

No entanto, na última coleta realizada ao final dos 15 dias de suplementação, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos parâmetros de desenvolvimento das larvas. Nesse estágio final, as larvas foram alimentadas apenas com ração suplementada, o que pode ter contribuído para a igualdade de desempenho entre os grupos. Vale ressaltar que foi observado um acúmulo excessivo de ração no fundo das unidades experimentais, o que pode ter levado ao aumento da concentração de compostos nitrogenados e possivelmente afetado o desempenho das larvas. Esses dados podem ser observados na Figura 23.

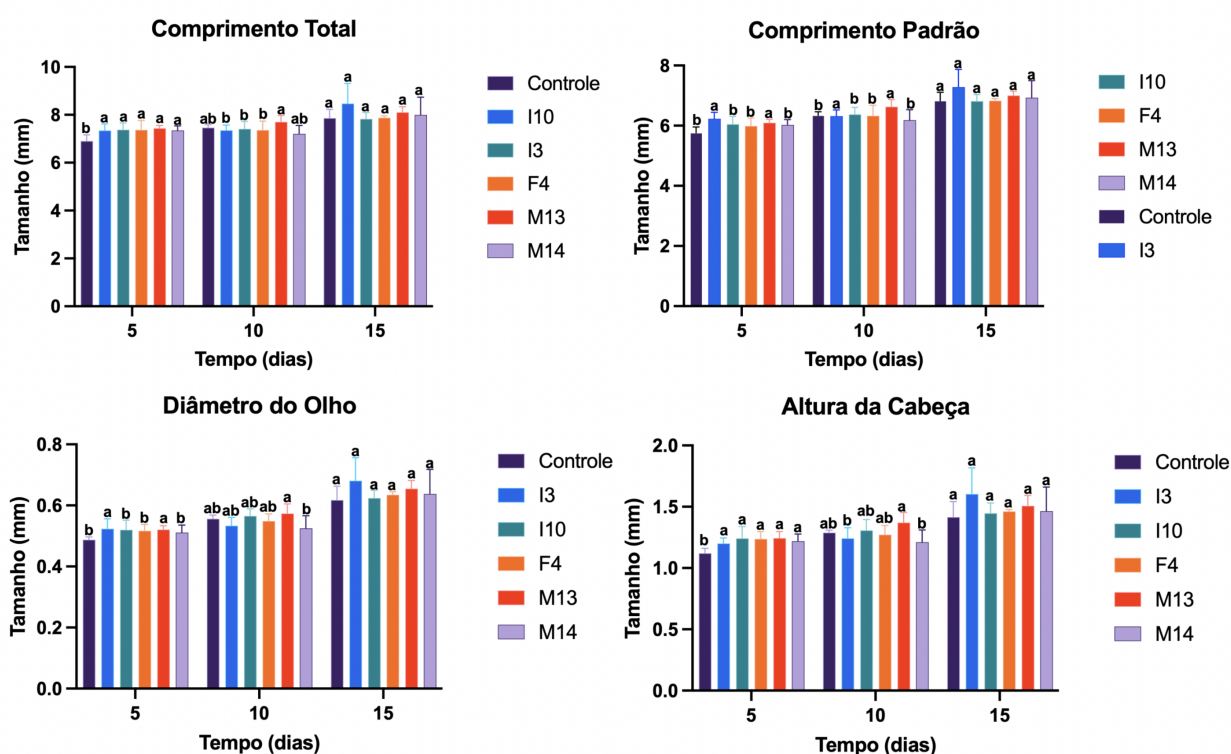


Figura 23 – Morfometria de larvas de tambaqui, nos intervalos de 5, 10 e 15 dias, durante a suplementação com cepas de probióticos autóctone isolados do intestino de *Colossoma macropomum*. *** $p < 0.001$.

Os sinais clínicos da aeromonose foram verificados nas 2 horas após a inoculação via água da *A. hydrophila*. Os sinais clínicos iniciam em média na segunda hora. As manifestações clínicas mais comuns foram letargia e natação errática. As larvas do grupo controle sem desafio não apresentaram sinais clínicos e/ou alterações comportamentais.

A imunoproteção contra a aeromonose foi avaliada em larvas de tambaqui suplementadas com cepas do intestino, fezes e mix (fezes + intestinos). O grupo controle

apresentou mortalidade acumulado de 46.1 % (figure 1B), seguido 53.2, 50.9, 47.6 % nos grupos I3, I10 e F4, respectivamente. As cepas que apresentaram menor taxa de mortalidade foram M13 e M14, com 24.4 e 25.2 %, respectivamente, evidenciado pela diferença significativa (figure 1B) em relação a todos os outros grupos analisados. Além disso, não houve diferença significativa ($p > 0.05$) entre os outros suplementados I3, I10 e F4 com o grupo controle (figura 1A). Na sobrevivência foi verificado melhores resultados nos grupos suplementados com 75.5 e 74.7 %, M13 e M14, respectivamente ($p < 0.0001$; Figura 1A).

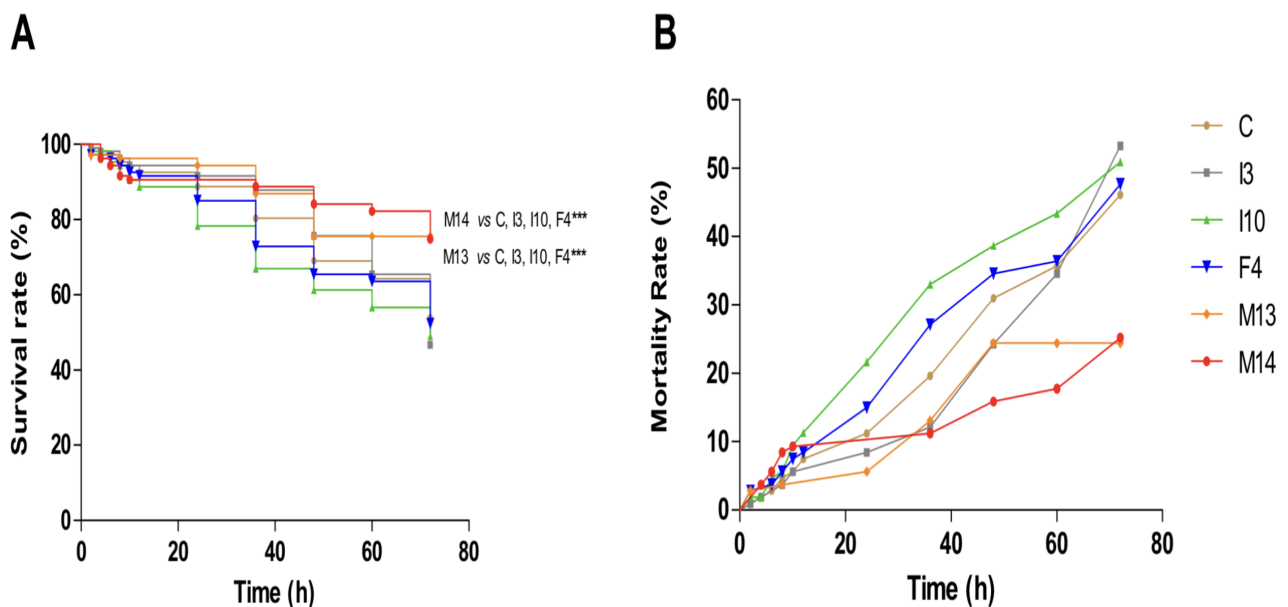


Figura 24 – Proteção após suplementação com cepas de probióticos autóctone isolados do intestino de *Colossoma macropomum* contra *Aeromonas hydrophila* em larvas de tambaqui por inoculação no sistema de cultivo. (A) Porcentagem de sobrevivência com teste de log rank entre os tratamentos *** $p < 0.001$; (B) Porcentagem da taxa de mortalidade ($n = XX$). C = controle; I3, I10, F4, M13, M14.

5. DISCUSSÃO

Ao longo do presente estudo, foi concentrado a busca seletiva de bactérias do ácido láctico (BAL), com habilidades favoráveis de antagonizar patógenos. Muitas dessas cepas têm requisitos de nutricionais que exigem o uso de meios de cultura específicos para seu crescimento. Portanto, o isolamento, a seleção e análises foram desenvolvidos com ágar MRS, que foi relatado como eficaz para o crescimento e desempenho desses microrganismos (ALONSO et al., 2019).

Os resultados indicam que as cepas bacterianas isoladas possuem características morfológicas, bioquímicas e genéticas consistentes com o grupo de *Lactobacillus* sp, o que reforça a sua potencial utilização na aquicultura, visto que cepas desse gênero são comumente usadas como probióticos na piscicultura e também conhecidas por estarem presentes no intestino de peixes saudáveis (TACHIBANA et al., 2020). De acordo com o estudo de Putra et al. (2018), foi observado um elevado número de LAB provenientes de peixes de águas quentes ou tropicais, representando cerca de 72,5% do total de cepas isoladas.

Essas cepas apresentaram propriedades favoráveis, como baixa virulência e atividade hemolítica *in vitro* negativa, de forma de a presença de hemolisina, que tem sido identificada como um fator de virulência produzido por patógenos que frequentemente causam edema e anemia, não esteve presente nas cepas selecionadas. Ainda, para garantir a seguridade das cepas isoladas, também foi realizado o teste de patogenicidade *in vivo* com o intuito de avaliar as modificações que estas ocasionariam estando em contato com a cavidade celomática de peixes juvenis, e assim como no teste *in vitro* não foi verificado a presença de hemorragia, hematomas, ou deformidade nos tecidos e órgãos dos animais. As bactérias hemolíticas têm a capacidade de romper a camada epitelial das células, interferindo no funcionamento adequado do sistema de defesa do hospedeiro e levando ao desenvolvimento de doenças invasivas (MUKHERJEE et al, 2017).

Ainda, a suscetibilidade de uma cepa probiótica aos antibióticos é uma consideração relevante em termos de segurança (TULINI et al., 2013). Portanto a utilização de cepas probióticas sensíveis aos antimicrobianos, como as utilizadas nesse estudo, pode ser uma estratégia promissora, visando à redução do uso e a preservação

da eficácia desses medicamentos. As bactérias isoladas eram provenientes de peixes selvagens que apresentavam uma probabilidade reduzida de exposição a substâncias químicas ou antibióticos. Portanto, era de se esperar que fossem encontrados isolados sensíveis a antibióticos nos seus tratos intestinais de forma natural.

Apesar de apresentarem resistência a Estreptomicina, foram susceptíveis a outros 5 antimicrobianos largamente utilizados na aquicultura, demonstrando que possuem a capacidade de uma longa sobrevivência no trato digestivo dos peixes e não são afetadas pela terapia com antibióticos (AUGUSTINA et al, 2022).

Além disso, a susceptibilidade a fármacos é especialmente importante para evitar a transferência de elementos de resistência genética para a microbiota intestinal, no qual é preferível evitar o uso de cepas probióticas que sejam resistentes a antibióticos. A resistência a antibióticos associada a plasmídeos não é muito frequente entre as LAB, mas pode ocorrer, e as implicações de segurança devem ser consideradas. Cepas que possuem plasmídeos de resistência não devem ser utilizadas como probióticos para humanos ou animais. Em alguns casos, pode ser prudente avaliar a capacidade de uma cepa probiótica proposta de atuar como doadora de genes de resistência a antibióticos por meio de conjugação. O conhecimento sobre a resistência intrinsecamente codificada pelos LAB a antibióticos comuns é necessário para identificar características de resistência adquiridas (SILVA et al, 2016).

Ademais, além assegurar a não patogenicidade dos isolados, também foi necessário a certificação da viabilidade e sobrevivência de bactérias probióticas em ambientes ácidos, similares ao do trânsito intestinal, como um dos parâmetros fundamentais para garantir suas propriedades terapêuticas. Sabe-se que o pH do estômago, normalmente, varia entre 2,5 e 3,5, o que representa uma barreira para a entrada dessas bactérias no trato intestinal. Portanto é desejável rastrear potenciais probióticos quanto à sua capacidade de tolerar condições do trato gastrointestinal (TULINI et al., 2013).

Uma vez que o pH afeta diretamente o crescimento bacteriano foi analisado em uma ampla faixa de pH, variando de 2,0 a 9,0, objetivando de investigar a capacidade das cepas de crescer em condições ácidas e alcalinas, além de identificar o valor ideal de pH para um crescimento adequado. Com base nos resultados experimentais, foi constatado que os isolados foram capazes de sobreviver em pH extremamente ácido (pH 2 a 3) e pH alcalino (pH 7 a 9), no qual o crescimento máximo (DO= 0,879) foi observado em pH 8,0.

Esses resultados indicam que as cepas bacterianas estudadas têm a capacidade de se adaptar e crescer em diferentes faixas de pH, observando um desempenho

diferencial entre as cepas em relação ao pH do meio de cultura, destacando a cepa M13 no pH 2 e a cepa I3 no pH 3.

Ashraf et al., (2016), ao testar a sobrevivência de *L. reuteri*, *Lc. lactis*, *L. rhamnosus* G5435, *L. acidophilus* 2401, *L. acidophilus* 388, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 11842, *S. thermophilus* 1342, *L. casei* 290, *B. lactis* BB12, *L. plantarum* 276 e *S. thermophilus* demonstraram taxa de sobrevivência superior a 50% e mantiveram a viabilidade durante 3h de exposição ao pH 2,0 considerados tolerantes a trânsito gástrico.

In vivo, os sais biliares têm a função de atuar como detergentes biológicos, promovendo a emulsificação e solubilização de lipídios, desempenhando um papel importante na digestão de gorduras (TULINI et al., 2013). No intestino dos peixes, a concentração fisiológica de bÍlis foi relatada variando 0,4% a 1,3% (BALCÁZAR et al., 2008).

Nesse estudo, foi atestado a viabilidade e o crescimento de todas as cepas após o cultivo em meio de cultura contendo 10% de sais biliares, o que demonstra um excelente desempenho. Os efeitos tóxicos dos sais biliares nas células bacterianas ainda não são completamente compreendidos, mas esses compostos anfipáticos possuem atividade antimicrobiana significativa na superfície. Portanto, a resistência aos sais biliares é um parâmetro essencial na seleção de cepas probióticas, uma vez que a presença de bile no intestino delgado pode reduzir a sobrevivência das bactérias, danificando suas membranas celulares (SILVA et al., 2016).

Ao testar a viabilidade de BAL em muco intestinal de peixe, acrescido de líquido biliar diluído, Mukherjee et al. (2017), comprovaram a capacidade dos isolados de suportar o efeito inibitório do sal. Do mesmo modo, Ashraf et al., (2016), ao testar cepas de *Lactobacillus* sp, demonstrou que estes mantiveram a viabilidade após exposição a 0,5% de bile por 12 horas.

A capacidade dos microrganismos probióticos de proteger o trato gastrointestinal do hospedeiro é de grande importância. Essa capacidade engloba a habilidade de se agregar aos patógenos, inibir sua adesão à mucosa intestinal (SIMÕES et al., 2021). A hidrofobicidade, a qual influencia a adesão ao epitélio intestinal, a autoagregação e a co-agregação, que afetam a formação de conglomerados, são características inter-relacionadas que desempenham um papel importante na interação das cepas bacterianas com o ambiente e com outras bactérias.

A avaliação da autoagregação é um dos métodos utilizados para verificar a habilidade das bactérias em aderir e se multiplicar no trato digestivo, pré-requisito para a colonização do trato gastrointestinal (SOMEMARIE et al., 2022). A capacidade de adesão

à mucosa intestinal é um importante critério de seleção, visto que essa capacidade de adesão permite a exclusão competitiva de patógenos no epitélio intestinal, além de modular a resposta imunológica e prevenir a eliminação dos probióticos devido ao peristaltismo (TULINI et al., 2013). Diversos estudos científicos mencionaram que uma faixa de hidrofobicidade entre 30% e 40% pode indicar a capacidade dos probióticos de interagir com as células epiteliais e, pelo menos, estabelecer uma adesão transitória (ABDULLA et al., 2014; SIDIRA et al., 2015; ILAVENIL et al., 2016).

Nesse estudo, a capacidade auto-agregação dos isolados foi relativamente baixa, alcançando o percentual máximo de 28,05%, para a cepa M13. Quanto maior, mais elevada a intensidade de adesão celular, promovendo a interação entre o microrganismo e as células epiteliais (ALKALBANI et al., 2022).

Porém, o percentual de coagregação foi substancial, principalmente para as cepas I10 e F4, tendo um papel significativo na prevenção da colonização de superfícies por patógenos. É amplamente reconhecido que as habilidades de coagregação das cepas LAB podem interferir na capacidade das espécies patogênicas de infectar o hospedeiro e também podem impedir a colonização de patógenos de origem alimentar. Ao fazer essas análises, Gómez et al. (2016), demonstraram que cepas de *Lactobacillus* produtoras de bacteriocina, apresentaram altos resultados de autoagregação e co-agregação de 69% e 74,6%.

A análise de coagregação avalia a capacidade dos isolados em inibir bactérias patogênicas no trato digestivo, como um "efeito de barreira", através da exclusão competitiva. Este, confere resistência contra bactérias patogênicas, prevenindo ou inibindo a sua colonização. Dessa forma, o teste avalia o efeito das cepas no mecanismo de defesa do organismo, particularmente no trato digestivo, contra infecções causadas por bactérias patogênicas (SOMEMARIE et al., 2022).

No teste de adesão a solvente realizado, avaliou-se, de forma qualitativa, a polaridade ou não polaridade da superfície bacteriana, indicando o potencial de adesão a superfícies apolares no epitélio da mucosa (SILVA et al, 2016). Dessa forma, assim como nos ensaios anteriores, as cepas I10 e M13 apresentaram excelentes resultados nessa análise, sendo classificadas com um elevado potencial de ligação entre a cepa e as células epiteliais, mas pôde-se destacar, também, a cepa M14 com o maior percentual.

Associado ao pontencial hidrofóbico, está a formação de biofilme, a qual é considerada uma característica vantajosa para cepas probióticas, pois facilita a colonização e a adesão prolongada das LAB à mucosa do hospedeiro, prevenindo a colonização por bactérias patogênicas (SADEGHI et al, 2022). Esta propriedade foi

avaliada comparando o número de células aderidas ao vidro em relação à população no controle, e foi verificado que a cepa M14 demonstrou-se como forte produtora dessa matriz polissacarídea, a qual auxilia na proteção contra antibióticos e enzimas. Nas bactérias patogênicas é um fator importante que causa infecção a longo prazo, produção de virulência e resistência a medicamentos de bactérias patogênicas (WANG et al., 2022).

Ao analisar a formação de biofilme de uma cepa de *L. rhamnosus*, Wang et al. (2022) verificaram que esta era uma forte produtora de polissacarídeo, o qual impediu a formação de biofilme pela cepa de *A. hydrophila* em 20%. Ainda, os estudos conduzidos por Gómez et al. (2016) e Aoudia et al. (2016) demonstraram que *L. plantarum* e *L. fermentum* são capazes de crescer e formar biofilmes e têm a capacidade de controlar a formação de biofilmes de patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7, descobertas consistentes com os resultados obtidos nesse estudo, reforçando a habilidade das espécies de LAB em formar biofilmes.

Nos peixes, a superfície da mucosa intestinal atua como primeira linha de defesa contra invasão de patógenos. Dessa forma a microbiota autóctone exerce uma função essencial no sistema imunológico, influenciando a maturação do tecido linfóide associado ao intestino e servindo como uma barreira protetora contra vários microrganismos patogênicos (CAVALCANTE et al., 2020).

A ocorrência de surtos do patógeno *Aeromonas hydrophila* na piscicultura resulta em taxas significativas de mortalidade devido à septicemia, que é caracterizada por úlceras cutâneas, necrose da musculatura subjacente e hemorragias internas. Portanto, a implementação de medidas profiláticas ajuda na redução da mortalidade e proporciona benefícios econômicos aos produtores (CAVALCANTE et al., 2020).

No presente estudo, a capacidade anti-*Aeromonas* foi atestada *in vitro* e *in vivo*. O teste de antagonismo demonstrou que na concentração de 10^8 UFC/mL, todas as cepas conseguiram inibir a bactéria patogênica. Desta forma, pressupõe-se que estas cepas produzem substâncias antimicrobianas que inibiram o crescimento da bactéria patogênica, destacando o isolado M14, com a formação de um halo de 19,33 milímetros. Sabe-se que os mecanismos de ação dos probióticos envolvem a produção de compostos com atividade antimicrobiana, como peróxido de hidrogênio, ácido láctico, bacteriocinas, substâncias semelhantes a antibióticos ou a uma combinação desses compostos (SILVA et al., 2016).

Em concordância com este estudo Hanol et al. (2020) identificaram a presença de 25 isolados de bactérias LAB em diversos peixes de água doce, capazes de inibir bactérias patogênicas, exibindo uma ampla gama de zonas de inibição, variando de fraca

a muito forte. Os isolados mais promissores foram posteriormente identificados como pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*.

Da mesma forma, Mukherjee et al. (2017), através da análise dos resultados obtidos por meio do ensaio de placa de microtitulação, demonstrou a capacidade de LAB autóctone de inibir o crescimento de *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii* e *A. salmonicida*. Concomitantemente, Wang et al. (2022) mostraram que as culturas de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum* inibiram, significativamente, com diâmetros médios de 15,85 mm, 14,56 mm e 14,13 mm, respectivamente, o crescimento de *A. hydrophila*.

Apesar de não haver um método universal para determinar a ação antagônica das LAB em relação a bactérias patogênicas, em um levantamento de dados, foram avaliadas um total de 1.056 cepas, abrangendo os gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, quanto à sua atividade antimicrobiana utilizando a técnica de estiramento cruzado, foi constatado que 946 (89%) das cepas testadas produziram substâncias antimicrobianas que apresentavam atividade contra, pelo menos, uma das 10 cepas de patógenos oportunistas utilizadas como indicadores, cujo maiores zonas de inibição estavam presente nos *Lactobacillus* (GARMASHEVA et al., 2022).

Essa administração é uma estratégia nutricional que pode ser adotada e especificamente em sistemas de produção intensiva, onde fatores estressantes como manuseio frequente, altas densidades populacionais e nutrição inadequada podem levar a um desequilíbrio na homeostase fisiológica, resultando em redução do crescimento, capacidade reprodutiva comprometida e supressão do sistema imunológico (TACHIBANA et al., 2020). Portanto, outra forma de confirmar a capacidade dessas cepas em atangonizar essa bactéria patogênica, foi a suplementação *in vivo* de larvas de tambaqui via alimento vivo e ração. Nessa etapa, foi observado tanto o desempenho zootécnico como a proteção contra a aeromonose.

Primeiramente, quanto ao desempenho foi observado, durante os 10 primeiros dias de suplementação, uma diferença significativa no crescimento das larvas de tambaqui entre os diferentes isolados, especialmente para o tratamento com a cepa M13. Ainda, foi verificado uma taxa de sobrevivência acima de 50% para os tratamentos com as cepas autóctones, demonstrando eficácia em promover o aumento da viabilidade e o melhor desempenho das larvas, indicando a capacidade dessas bactérias em estabelecer uma interação simbiótica no trato gastrointestinal das larvas, contribuindo para a melhoria do processo digestivo, o fortalecimento do sistema imunológico e a prevenção de infecções por patógenos.

Além disso os resultados demonstraram que as larvas alimentadas com a ração farelada suplementada não alcançaram um crescimento satisfatório quando comparadas àquelas alimentadas com *A. salina* suplementada. Essa falta de desempenho pode ser atribuída à baixa capacidade das larvas em digerir os alimentos complexos presentes na dieta artificial utilizada, sugerindo maior tempo de administração do alimento vivo. Essa limitação na digestão de nutrientes pode ser semelhante ao que foi observado em estudos anteriores realizados com a larvicultura do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), no qual também foi constatado um baixo desenvolvimento quando alimentado com dieta artificial em comparação com o uso de alimento vivo (BORGES et al., 2013).

Esses resultados reforçam a importância de considerar a capacidade de digestão e aproveitamento dos nutrientes pelas larvas ao formular dietas artificiais para espécies de peixes como o tambaqui. Além disso, eles ressaltam a necessidade de explorar alternativas, como o uso de alimentos vivos, que possam proporcionar um melhor crescimento e desenvolvimento das larvas, garantindo assim a viabilidade e o sucesso da larvicultura dessa espécie. O baixo crescimento observado na terceira fase do experimento podem ser atribuídos à incapacidade morfológica e fisiológica das larvas em digerir moléculas complexas logo após o início da alimentação exógena, durante o processo de desenvolvimento do trato digestivo, sendo esta uma característica comum a várias espécies (BORGES et al., 2013).

Os resultados favoráveis de crescimento de larvas, obtidos neste estudo através da utilização de náuplios de *A. salina*, assemelham-se aos resultados encontrados por MARCIALES-CARO et al. (2010) no contexto da fase inicial de larvicultura do surubim cachara, *P. fasciatum*, no qual na sua forma natural também demonstrou ser eficaz.

A fase de larvicultura é considerada uma etapa crítica, especialmente devido à alimentação, que desempenha um papel fundamental no crescimento e na sobrevivência das larvas. A falta de oferta adequada de alimentos pode resultar em altas taxas de mortalidade nas fases iniciais de vida. No entanto, esse problema pode ser minimizado quando um alimento apropriado é fornecido. Alguns estudos destacam que é praticamente inviável oferecer alimento inerte como a primeira fonte exógena (PORTELLA et al., 2012; PEREIRA et al., 2016). Portanto, recomenda-se iniciar a alimentação com alimentos vivos, seguido de um processo de transição gradual até a substituição completa pelo uso de alimentação comercial (VIEIRA, 2022).

Além disso, a adição de probióticos por meio de alimentos vivos tem demonstrado melhorias significativas no desempenho de crescimento, na eficiência alimentar e na saúde geral dos animais (SOUSA et al., 2020). Vale ressaltar que as cepas que se

destacaram, nos testes *in vitro*, principalmente nos testes de autoagregação, co-agregação e hidrofobicidade (I10, M13 e M14), também foram destaque no desempenho, mostrando uma possível modulação da microbiota intestinal, a qual exerce influência no desenvolvimento, crescimento e no sistema imunológico das larvas, desempenhando um papel crucial na saúde peixes (MUNIR et al., 2018).

A capacidade de inibir patógenos é uma das características mais desejáveis em bactérias do ácido láctico para sua aplicação na aquicultura, e isso pôde ser verificado nesse estudo, também *in vivo*, pela sobrevida das larvas suplementadas com as cepas probióticas M13 e M14, após o desafio com *A. hydrophyla* (VIEIRA, 2022).

Assim como neste, um estudo sobre a suplementação da dieta de *M. macrocephalus* com artemia enriquecida com probiótico autóctone *E. faecium* na concentração de 10^8 UFC/mL e uma frequência de administração de 3 a 4 vezes ao dia, foi observada uma redução significativa na taxa de mortalidade acumulada durante a infecção aguda de 96 horas pelo patógeno *A. hydrophila* (VIEIRA, 2022).

Dessa forma, considerando as alternativas ao uso indiscriminado e convencional de antibióticos, devido ao surgimento de bactérias cada vez mais resistentes, o uso de probióticos se destaca como uma abordagem promissora, na qual sua utilização têm se difundido como uma medida profilática eficaz, principalmente por assegurar a manutenção de um sistema imunológico saudável nos animais, resultando em maior produtividade na aquicultura (VIEIRA, 2022).

Uma das características marcantes das bactérias lácticas é a capacidade de adaptação ao trato gastrointestinal, o que lhes permite competir por sítios de ligação específicos na camada intestinal e dominar a comunidade bacteriana, suprimindo o crescimento de bactérias nocivas (LI et al., 2018). Essa capacidade de adesão por exclusão e redução expressiva de bactérias patogênicas é uma das características do efeito probiótico no hospedeiro, sendo associada à produção de substâncias antimicrobianas e ao mecanismo de quorum sensing, proporcionando ativação do sistema imunológico do hospedeiro em situações de estresse ou exposição a doenças agudas (CHAUHAN et al., 2019).

A suplementação dietética com cepas probióticas tem o potencial de promover o equilíbrio da microbiota intestinal e desencadear benefícios diretos para o hospedeiro, como a melhoria da função digestiva, a inibição da colonização de patógenos no trato gastrointestinal e o aprimoramento da integridade do epitélio intestinal, melhorando o desempenho da produção, diminuindo os índices de doenças e conseqüentemente reduzindo a utilização de antimicrobianos (ZANG et al., 2022). Portanto, o uso das cepas

isoladas nesse estudo, em especial M13 e M14, no alimento vivo durante as fases iniciais de vida de *C. macropomum* foi capaz de melhorar a sobrevivência após o contato com *Aeromonas hydrophila*, uma vez que conferiram maior resistência à bactéria patogênica.

7. CONCLUSÃO

Foram isoladas 115 cepas bacterianas do aparelho gastrointestinal e seu conteúdo. Entre estas cepas 5 foram identificadas como bacilos Gram positivos e catalase negativos, γ -hemolíticas e formavam colônias esbranquiçadas, brilhantes, com forma arredondada e bordas bem definidas, pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp., chamadas de I3, I10, F4, M13 e M14.

Todas as cepas mostraram-se suscetíveis a Oxitetraciclina, Penicilina, Ampicilina, Clorafenicol e Eritromicina, apresentando halos de inibição ao redor das colônias., exceto a Estreptomicina.

Quanto ao pH, as cepas bacterianas foram capazes de sobreviver e crescer em condições ácidas e alcalinas. O crescimento máximo foi observado em pH 8,0. Em meios de cultura com pH 2 e 3, as cepas M13 e I3 apresentaram desempenho superior, respectivamente. Na presença de sais biliares, todas as cepas testadas mostraram taxa de sobrevivência, indicando que não foram afetadas pela presença desses compostos. A cepa I10 se destacou com a maior taxa de sobrevivência, seguida pelos isolados M14, F4, M13 e I3.

A cepa I10 se destacou em vários aspectos, mostrando altas taxas de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade. Além disso, essa cepa apresentou a maior taxa de sobrevivência na presença de sais biliares. Esses resultados sugerem que a cepa I10 tem um potencial probiótico significativo e pode ser uma candidata promissora para aplicações futuras. Além disso, os testes de inoculação em juvenis de tambaqui demonstraram a segurança das cepas, não causando efeitos adversos e, na verdade, promovendo um ganho de peso significativo.

In vitro as cepas I10 e M14 demonstraram a capacidade de inibir o crescimento da cepa patogênica *A. hydrophila*, exibindo halos de inibição significativos. Isso indica um potencial antagonista dessas cepas bacterianas, sugerindo que elas podem produzir substâncias com propriedades inibitórias.

No teste *in vivo* utilizando larvas de tambaqui, as cepas M13 e M14 demonstraram um potencial significativo de promover a sobrevivência das larvas, apresentando taxas de mortalidade mais baixas em comparação com os outros grupos. Esses resultados indicam que a presença dessas cepas probióticas pode conferir uma imunoproteção efetiva contra a aeromonose, uma doença comum em larvas de peixe. Além disso, os grupos suplementados com M13 e M14 também apresentaram uma maior taxa de sobrevivência, destacando a eficácia dessas cepas na promoção da saúde e resistência das larvas.

As cepas bacterianas isoladas do intestino de tambaqui demonstraram propriedades probióticas relevantes, como autoagregação, coagregação, hidrofobicidade, formação de biofilme, antagonismo de patógeno, promoção da sobrevivência e o potencial de imunoproteção contra a aeromonose. Essas características indicam seu potencial para promover interações benéficas com o hospedeiro, melhorar a saúde intestinal e potencialmente aumentar o desempenho de organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

ALKABANI, N. S. Caracterização in vitro e identificação de potenciais leveduras probióticas isoladas de laticínios fermentados e produtos alimentícios não lácteos. **Journal of Fungi**. 544. 2022

ALONSO, S.; CASTRO, M. C. Isolamento e Caracterização Parcial de Bactérias do Ácido Lático da Microbiota Intestinal de Peixes Marinhos para Potencial Aplicação como Probióticos na Aquicultura. **Probióticos e Proteínas Antimicrobianas**. 2018

AMIR, I; ZUBERI, A. Evaluation of commercial application of dietary encapsulated probiotic (*Geotrichum candidum* QAUGC01): Effect on growth and immunological indices of rohu (*Labeo rohita*, Hamilton 1822) in semi-intensive culture system. **Fish & Shellfish Immunology**. Volume 95, December 2019, Pages 464-472

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. **Anuário peixe BR da piscicultura**. A força do peixe brasileiro. 2023

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. **Anuário peixe BR da piscicultura**. Disponível em: <http://www.peixebr.com.br/parana-rondonia-e-sao-paulo-puxam-crescimento-da-piscicultura-no-brasil/>. Acesso 7 de julho de 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA – PEIXE BR. **Tambaqui de cultivo: produção e consumo em crescimento no país**. São Paulo/SP, 2018. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/tambaqui-de-cultivo-producao-e-consumo-em-crescimento-no-pais/>. Acesso em: 22 de junho de 2022.

ASHRAF, R. AND SMITH, S.C. Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains-tolerance to bile, pepsin and antibiotics. **International Food Research Journal** **23(2)**: 777-789. 2016

AUGUSTINA, A.; SAPTIANI, G.; HARDI, E. H. Isolation and identification of potential lactic acid bacteria as probiotics from the intestines of repang fish (*Puntiplites waandersi*). **AAFL Bioflux**, 2022, Volume 15, Issue 1.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Veterinary Science*. 2017. 10.1016/j.rvsc.2017.01.016

B.C. SILVA, S.H.C. SANDES, L.B. ALVIM, M.R.Q. BOMFIM, J.R. NICOLI, E. NEUMANN, A.C.

NUNES. Seleção de uma cepa probiótica candidata de *Pediococcus pentosaceus* da microbiota fecal de cavalos por testes *in vitro* e alegações de saúde em um modelo de camundongo de infecção por *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 122, Edição 1. 2017. 225-238

BORGES, P. G. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO, CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS DO JUNDIÁ, *Rhamdia quelen*, ALIMENTADAS COM *Artemia salina*. Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. 2013.

BORGES, P. G. Crescimento e sobrevivência de larvas do jundiá, *Rhamdia quelen*, alimentadas com alimento vivo enriquecido e dieta artificial. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 20, n. 4, p. 216-221, out./dez. 2013

BRABO, M. F. Piscicultura no Estado do Pará: situação atual e perspectivas. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, 2 (1): i-vii. 2014.

BRABO, M. F. Piscicultura no Estado do Pará: situação atual e perspectivas. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, (2)1: 1-7. 2016.

BRABO, M. F. Viabilidade econômica da produção familiar de tambaqui em gaiolas flutuantes no Oeste paraense, Amazônia, Brasil. *Custos e @gronegocio on line* - v. 13, n. 1 – Jan/Mar - 2017. ISSN 1808-2882

CAVALCANTE, R. B. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance T and protection against *Aeromonas hydrophila* infection **Reviews in Aquaculture**. 2020

CHAUHAN, A.; SINGH, R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. **Symbiosis**. v. 77, n. 23, p. 1-15, 2018

DEEKSHIT, V. K.; MAITI, B.; KRISHNA, B. Resistência antimicrobiana em patógenos de peixes e estratégias alternativas de mitigação de riscos. **Reviews in Aquaculture**. Volume 15, Edição 1. Janeiro de 2023. Páginas 261-273

DIAS, D. C. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 33, n. 4, p. 365-368, 2011.

DOWARAH, R., VERMA, A. K., AGARWAL, N., PATEL, B. H. M., SINGH, P. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs. **Livestock Science**, 195:74-79, 2017.

GARCEZ, J. R.; NÓBREGA, V. S. L.; TORRES, T. P. SIGNOR, A. A. Cultivo de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques-rede: Aspectos técnicos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, e45810817560, 2021. Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17560>.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation. (2018). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FAO, 2021. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA . **FAO lança Ano Internacional da Pesca e Aquicultura Artesanais 2022 na América Latina e no Caribe.** Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1456876/>. Acesso 07 julho 2022.

FERREIRA, G. S.; BOLÍVAR, N. C.; PEREIRA, S. A. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Aquaculture AQUA** 631711. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.006. 2015.

FERREIRA, A. R. C. **Desenvolvimento e validação de uma ferramenta molecular de multiplex-PCR para a detecção de *Vibrio alginolyticus*, *aguillarum* e *Vibrio harveyi* em peixes de aquicultura.** 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos recursos pesqueiros). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche, Peniche, Portugal, 2018.

FERREIRA, A. H. C. Probiótico na alimentação de pós-larvas de tilápias-do-nilo submetidas a desafio sanitário. **Rev. Bras. Saúde Prod. Animal.**, Salvador, v.16, n.2, p.430-439 abr./jun., 2015. ISSN 1519 9940

FILHO, M. X. P.; FLORES, R. M. V. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. O mercado de peixes da piscicultura no Brasil: estudo do segmento de supermercados. **Embrapa Pesca e Aquicultura.** ISSN 2358-6273. 2020

GARMASHEVA, I. L.; OLESCHENKO, L. T. Um estudo comparativo de espectros de atividade antagônica de bactérias do ácido láctico isolados de alimentos fermentados. **Letters in Applied Microbiology.** Volume75, Edição4. Outubro de 2022. Páginas 991-999

GHOMRASSI, H., BEN BRAIEK, O., CHOISSET, Y., HAERTLÉ, T., HANI, K., CHOBERT, J.M., GHRAIRI, T., 2016. Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Dis. Aquat. Organ.* 118, 31-43

GOMES, P. F. F. **Perfil da piscicultura na microrregião Bragantina, Nordeste do Pará, Brasil.** *Bol. Téc. Cient. Cepnor*, v. 16, n. 1, p: 37 - 40, 2016.

GOMÉZ, N. C.; RAMIRO, J. M. P. Uso de Biofilmes Potenciais de Bactérias Probióticas do Ácido Láctico (LAB) para o Controle de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e Formação de Biofilmes de *Escherichia coli* O157:H7. **Frontiers in Microbiology.** 2016

HAI, N. V.; BULLER, N.; FOTEDAR, R. Capacidade de encapsulamento de *Artemia* nauplii com probióticos personalizados para uso no cultivo de camarões-rei ocidentais (*Penaeus latissulcatus* Kishinouye, 1896). **Aquaculture Research.** 13 de maio de 2010

HILSDORF, A. W.; HALLERMAN, E.; VALLADÃO, G. M. R. A agricultura e a criação de *Colossoma macropomum*: Das águas amazônicas à produção sustentável. **Reviews in Aquaculture.** 25 de novembro de 2021

HOSSAIN, S.; DAHANAYAKE, P.S. *Aeromonas* spp. multirresistente isolado de peixe-zebra (*Danio rerio*): antibiograma, genes de resistência antimicrobiana e cassetes de genes de integron classe 1. **Applied Microbiology International.** Volume68, Edição5. Maio 2019. Pg 370-377

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017). **Cidades**. Disponível em: <www.cidades.ibge.gov.br> Acesso em: 07 de julho 2022.

IBGE. (2018). **Produção da Pecuária Municipal - 2017**. Rio de Janeiro: IBGE. Rio de Janeiro, RJ. v. 45, 2019, p. 1-8. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso em: 07 de julho de 2022.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2015). Estado do Pará. Acessado em 07 de julho de 2022

ISHTHIAQ, I. B.; AHMED, J.; RAMALINGAM, K. Probiotics in Brackish Water Fish Farming: A Special Focus on Encapsulated Probiotics. Volume 11, Issue 6, 2021, 14697 - 14708

INTERAMINENSE, J. A. In vitro and in vivo potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella* algae for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. **Reviews in Aquaculture**. AQUA 633029. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.027>. 2022.

KOZENT, S. BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO DO INTESTINO DE TAMBACUI (*Colossoma macropomum*). Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. 2017

L.A. Simões,A. Cristina de Souza,I. Ferreira,D.S. Melo,L.A.A. Lopes,M. Magnani,R.F. Schwan,D.R. Dias. Propriedades probióticas de leveduras isoladas de azeitonas de mesa fermentadas brasileiras. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 131. Edição 4. 2021. 1983-1997

MELO, D. S. D; SÁ, A. L. A. Crescimento, sobrevivência e expressão gênica miogênica nas pós-larvas do *Colossoma macropomum* provisionadas com *Artemia nauplii*. **Fisiologia e Bioquímica de Peixes**. 2023.

MUKHERJEE, A.; DUTTA, D. BANERJEE, S. Bactérias intestinais autóctones culináveis em rohu, *Labeo rohita*. Inibição do crescimento in vitro contra *Aeromonas* spp. patogênico, estabilidade no intestino, bio-segurança e identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. **Symbiosis** 73. 177. 2017

MOHAMMADIAN, T. Efeitos protetores do *Lactobacillus Delbrueckii* não encapsulado e microencapsulado Subsp. *Bulgaricus* em *Truta Arco-Íris* (*Oncorhynchus Mykiss*) Exposto ao Chumbo (Pb) Via Dieta. **Anais de Ciência Animal**. Volume & Issue: Volume 22 (2022) - Issue 1 (January 2022)

MORAIS et al., 2017. **Biologia, habitat e cultivo do tambacui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816)**. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, 81-93, 2017 Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org> ISSN:2238.1910.

NASS, D. H. **Efeito da antecipação da oferta de *Artemia* na larvicultura do peixe-palhaço *Amphiprion clarkii***. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina

NOWLAND, T. L.; KIRKWOOD, R. N; PLUSKE, J. R. Review: Can early-life establishment of the piglet intestinal microbiota influence production outcomes?. **Rev. ANIMAL**. Volume 16, Supplement 2, June 2022, 100368

OKON, E. M. Resistência antimicrobiana em peixes e aves: implicações para a saúde pública para a produção de alimentos de origem animal na Nigéria, Egito e África do Sul. **Frontiers in Antibiotics**. 10 de novembro de 2022

PAIXÃO, P. E. G. Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Reviews in Aquaculture**. 2020

PEREIRA, G. V.; CUNHA, D. G.; MOURINO, J. L. Caracterização da microbiota no intestino *Arapaima gigas* e isolamento de potenciais bactérias probióticas. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 123, Edição 5. 2017. 1298-1311

PUTRA, T. F. The antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from peda, an Indonesian traditional fermented fish. **Earth and Environmental Science**. 2018

RUDTANATIP, T. Bioencapsulation efficacy of sulfated galactans in adult *Artemia salina* for enhancing immunity in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**. Volume 94, November 2019, Pages 90-98

SANTOS, F. A. C.; JULIO, G. S. C.; BATISTA, F. S; MIRANDA, L. N. L.; PEDRAS, P. P. C.; LUZ, R. K. High stocking densities in the larviculture of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system: Performance, survival and economic viability. **Aquaculture**. Volume 552, 15 April 2022, 738016

SANTOS, F. A. C.; JULIO, G. S. C. Densidade de estocagem na larvicultura *Colossoma macropomum*, um peixe de água doce, no sistema de aquicultura de recirculação. **Aquaculture Research**. Volume 52, Edição 3. Março de 2021. Páginas 1185-1191

SRINIVASH, M; KRISHNAMOORTHY, R; MAHALINGAM, P. U. Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. **Journal of Agriculture and Food**. v11. 2023

TACHIBANA, L; TELLI, G. S.; DIAS, D. C.; Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth T performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. **Reviews in Aquaculture**. 2020

TALWAR, C.; NAGAR, S.; LAL, R.; NEGI, R.K. Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. **Indian Journal of Microbiology**. v. 58, n. 4, p.397-414, 2018.

TOURAKI, M.; KARAMANLIDOU, G.; KARAVIDA, P. Avaliação dos probióticos *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* bioencapsulados em *Artemia* nauplii contra vibriose em larvas de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*, L.). **Revista Mundial de Microbiologia e Biotecnologia**. 2012

TULINI, F. L.; WINKELSTROTER, L. K.; MARTINS, E. C. P. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. **Reviews Anaerobe**. 2013

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Reviews in Aquaculture**. 2020

VIEIRA, V. H. P. **PROBIÓTICO AUTÓCTONE (*Enterococcus faecium*) NA FREQUENCIA DE ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PIAUÇU *Megaleporinus macrocephalus* (GARAVELLO & BRITSKY, 1988) SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E RESISTENCIA À PATÓGENOS.** Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Pará. 2022

XIMENES, L. F. **PRODUÇÃO DE PESCADO NO BRASIL E NO NORDESTE BRASILEIRO. Caderno Sentorial ETENE.** n150. ano 5. 2021

XUE, J.; SHEN, K.; HU, Y.; HU, Y.; KUMAR, V.; YANG, G.; WEN, C. **Effects of dietary *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Paracoccus marcusii*, and *Lactobacillus plantarum* supplementation on the growth, immune response, antioxidant capacity, and intestinal health of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*).** **Reviews in Aquaculture.** 2020

WANG, R.; RAN, C.; RINGØ, E.; ZHOU, Z. G. **Progress in fish gastrointestinal microbiota research. Reviews in Aquaculture.** v. 10, p. 626-640, 2018.

YANG, G.; SHEN, K.; YU, R.; WU, Q.; YAN, Q.; CHEN, W.; DING, L.; KUMAR, V.; WEN, C.; PENG, M. **Probiotic (*Bacillus cereus*) enhanced growth of Pengze crucian carp by modulating the antioxidant defense response and exerting beneficial impacts on inflammatory response via Nrf2 activation. Reviews in Aquaculture.** 2020. AQUA 735691.

ZANG, Y.; LIANG, X-F.; HE, S.; FENG, H.; LI, L. **Dietary supplementation of exogenous probiotics affects growth performance and gut health by regulating gut microbiota in Chinese Perch (*Siniperca chuatsi*).** **Reviews in Aquaculture.** 2022.

WANG, T.; TIAM, X.; XU, X. **Dietary supplementation of probiotics fermented Chinese herbal medicine *Sanguisorba officinalis* cultures enhanced immune response and disease resistance of crucian carp (*Carassius auratus*) against *Aeromonas hydrophila*.** **Fish & Shellfish Immunology.** Volume 131, December 2022, Pages 682-696