POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DO INTESTINO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum)*

Larissa Andréia Ferreira Sampaio[1], Thalis Ferreira dos Santos[2], Lucas Alvarenga dos Santos[3]

[1]*Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Brasil (larismpo@gmail.com)*
[2]*Universidade Federal do Oeste do Pará,, Santarém, Brasil*
[3]*Universidade Federal do Oeste do Pará,, Santarém, Brasil*

Resumo: Os probióticos apresentam potencial no controle de patógenos. Portanto, o trabalho objetivou isolar bactérias ácido-lácticas (BAL) do intestino de *Colossoma macropomum* e avaliar seu potencial probiótico. As bactérias foram submetidas à atividade hemolítica, antagonismo contra patógenos, teste de catalase, coloração de Gram e tolerância ao pH 3,0. 28 cepas apresentaram hemólise negativa, inibição entre 6,75mm e 12,63mm e enquadraram-se como BAL. A tolerância à acidez variou entre 0,03% a 69,86%.

Palavras-chave: microrganismo; antimicrobianos; hemólise; atividade antagonista.

INTRODUÇÃO

A aquicultura vem se destacando como um importante setor da produção animal nos últimos anos, atuando de forma relevante na produção mundial de alimentos e contribuindo para a geração de emprego e renda, além de ser um método alternativo à pesca reduzindo, desta forma, a sobrepesca de animais selvagens (Zorriehzahra et al., 2016; Alonso et al., 2019).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresenta-se como uma das principais espécies de grande potencialidade na aquicultura em virtude de sua fácil adaptação aos alimentos formulados, tolerância a valores críticos de oxigênio dissolvido, elevado desempenho produtivo, fácil manejo, bom rendimento de carcaça (45%) e grande demanda do mercado por apresentar uma carne bastante apreciada e com alto valor nutricional (Cyrino et al., 2010; Mendonça et al., 2012; Silva e Fujimoto, 2015).

Entretanto, o rápido avanço deste método principalmente em função de sua grande importância econômica implica em maior número de instalações para cultivos de alta densidade, fator que além de causar impactos ambientais como alterações na qualidade da água pode também gerar estresse nos animais levando à disseminação de doenças (Pridgeon e Klesius, 2012). A fim de tentar controlar a incidência dessas doenças os produtores recorrem à utilização de antibióticos, o que despertou a motivação dos pesquisadores na busca por outros mecanismos de controle uma vez que, o uso prolongado desta droga química pode afetar negativamente os animais pela permanência de resíduos em seu organismo ou ainda pelo aumento do índice de resistência antimicrobiana (Ringo et al., 2020; Pereira et al., 2020). Como alternativa aos antibióticos surgem os probióticos, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, sendo, portanto um método sustentável e promissor para o controle de doenças em peixes (Hill et al., 2014; Akhter et al., 2015). Mais especificamente, um probiótico pode ser classificado como qualquer célula microbiana viva que beneficia o hospedeiro através da dieta ou água de cultivo (Tachibana et al., 2019).

As bactérias ácido-lácticas (BAL) compreendem um dos principais grupos de microrganismos com potencial probiótico apresentando a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, diminuindo desta forma a incidência de doenças (Buglione-neto et al., 2013; Yamashita et al., 2017). Além disso, é válido ressaltar ainda que essas bactérias estão presentes na microbiota intestinal dos peixes de água doce auxiliando na resposta imunológica desses animais (Yamashita et al., 2017; Ruiz, 2019). Dentro do contexto da busca por vias alternativas no controle de microrganismos patogênicos presentes na aquicultura e, levando em consideração o ótimo desempenho de BAL relatados na literatura, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial probiótico de bactérias ácido-lácticas isoladas da microbiota intestinal de tambaquis.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos intestinos de tambaqui

Dez tambaquis juvenis saudáveis isentos de tratamento

prévio com produtos químicos foram coletados de tanques situados no viveiro do Laboratório Múltiplo para a Produção de Organismos Aquáticos (LAMPOA) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Os animais foram eutanasiados utilizando sobredose de benzocaína, lavados, limpos com álcool 70% e necropsiados seguido da remoção dos intestinos. Posterior a isso, o material foi transportado para o Laboratório de Microbiologia da UFOPA para realização dos testes e análises.

Diluições, Plaqueamento e Isolamento

Os intestinos coletados foram abertos longitudinalmente usando tesoura cirúrgica. O material fecal foi coletado e em seguida os órgãos foram lavados com solução salina NaCl 0,9% estéril. 1cm^2 de cada peça foi inoculado em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Acumedia®). Adicionalmente eles também foram inoculados diretamente no ágar MRS-azul de anilina (0,3%) (Êxodo Científica®). O mesmo procedimento foi realizado com o material fecal, 1g foi inoculado em caldo MRS e inoculado diretamente sobre ágar MRS (Kasvi®). Os grupos foram divididos e identificados de acordo com o tipo de cultivo em I (intestino inoculado no caldo MRS), IC (intestino inoculado diretamente no ágar MRS), F (conteúdo fecal inoculado no caldo MRS) e FC (conteúdo fecal inoculado diretamente no ágar MRS).

As placas e os frascos contando meio líquido foram incubados em estufa bacteriológica por 48 horas a 35°C em anaerobiose. Após esse período, o cultivo em caldo foi submetido à diluição seriada, plaqueamento em MRS-azul de anilina e incubação por 48 horas a 35°C. As placas do cultivo direto do intestino e fezes foram analisadas quanto a presença de colônias azuis. Essas colônias foram estriadas em superfície do meio MRS e incubas sob as mesmas condições descritas acima. Colônias isoladas do cultivo direto ou a partir de diluição seriada foram foram reisoladas por estriamento em superfície, incubação e posterior armazenamento a 20°C em caldo MRS e 20% de glicerol.

Condições de Cultivo

Os microrganismos antes de todos os experimentos fora, reativados por cultivo em caldo MRS, com inóculo de 10% e incubação a 37°C por 18 horas.

Atividade hemolítica

Todos os isolados foram submetidos ao teste da atividade hemolítica para excluir possíveis patógenos. Para realização do teste, preparou-se um litro de meio de cultura base de Ágar Sangue (Kasvi®), seguindo as especificações do fabricante. O meio foi autoclavado e, após resfriamento, acrescido de 10% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram inoculadas com 10 µl de cultivo de cada um dos isolados, reativados de acordo com a descrição acima. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O teste foi analisado com relação a sua capacidade de hemólise a partir de halos claros formados ao redor das colônias. Apenas os microrganismos que se mostraram negativos para atividade hemolítica prosseguiram no estudo. O teste foi realizado em triplicata.

Atividade Antagonista

Para o teste da atividade antagonista os ensaios foram realizados em duas etapas. Na primeira os microrganismos potencialmente probióticos foram reativados e tiveram sua concentração ajustada para 10^8UFC/ml. Os microrganismos foram espalhados pela superfície de placas de ágar MRS (Kasvi®) com o auxílio de um swab estéril seguido de incubação a 37ºC por 24 horas. Na segunda etapa, foram retirados blocos de ágar das placas de crescimento dos microrganismos potencialmente probióticos. Eles foram adicionados a placas de Mueller Hinton (Kasvi®) previamente inoculadas com um dos patógenos (108 UFC/ml) a seguir: *Aeromonas hydrophila, Escherichia coli, Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. As placas foram então incubadas a 37ºC por 24 horas. Após o período de incubação as placas foram analisadas quanto a formação de halos de inibição ao redor dos discos de ágar. As análises foram realizadas em triplicata.

Teste de Gram e Catalase

Os microrganismos que apresentaram atividade antimicrobiana foram submetidos a caracterizações subsequentes: coloração de Gram e teste de catalase. Os microrganismos foram reativados por cultivo em ágar MRS (Kasvi®) e incubação a 37°C por 24 horas. Para o teste de catalase, cada colônia foi depositada em uma lâmina, colônias que reagiram formando bolhas de gás, correspondendo a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, foram consideradas catalase positivas. Foram utilizados microrganismos sabidamente positivos e negativos para essa característica como controles.

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 de vidro. Em seguida procedeu-se a coloração de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante do Kit. Assim, gotas de cristal violeta (NewProv®) foram despejadas permanecendo na lâmina por 60 segundos; o corante foi então lavado com água destilada; em seguida a lâmina foi coberta com lugol (NewProv®), o qual também permaneceu por 60 segundos e lavado novamente com água destilada, em sequência foi aplicado álcool etílico a 95% para descorar a lâmina e, após 10 segundos, realizada mais uma rápida lavagem com água destilada; por último despejou-se gotas de fucsina (NewProv®) sobre a lâmina, sendo lavada com água destilada decorridos 30 segundos depois de sua aplicação. Após secagem, as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico em aumento de 40.000x e 100.000x.

Teste de resistência ao pH ácido

Para testar a resistência ao ácido, 6 microrganismos que apresentaram em média os maiores halos de inibição no teste de análise antimicrobiana foram selecionados. Os isolados foram reativados e sua concentração foi ajustada para 108UFC/mL. As culturas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e então ressuspendidas em solução salina NaOH 0,9%, pH 3,0, ajustado com solução HCl 1N. As bactérias foram mantidas em estufa a 37°C por 2 horas. A viabilidade das linhagens foi mensurada por diluição seriada, plaqueamento em ágar MRS e contagem das colônias. A

contagem inicial foi considerada como 100% de viabilidade.

Análise Estatística

A diferença estatística entre as médias encontradas nos testes de atividade antimicrobiana e de resistência ao ácido foi calculada por one-way ANOVA e teste de Tukey. Os dados foram processados no software GraphPad Prism 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas ao todo 92 linhagens microbianas dos 4 tipos de cultivo que foram feitos a partir de amostras de fezes e do intestino.

A análise dos halos no teste hemolítico mostrou que 64 isolados apresentaram hemólise positiva frente às hemácias de carneiro (Figura 1. A) e 28 isolados não apresentaram hemólise (Figura 1. B), sendo 19 provenientes do intestino (I=12 e IC=7) e 9 provenientes das fezes (F=4 e FC=5). Os isolados com resultado negativo para hemólise foram selecionados para os testes seguintes.

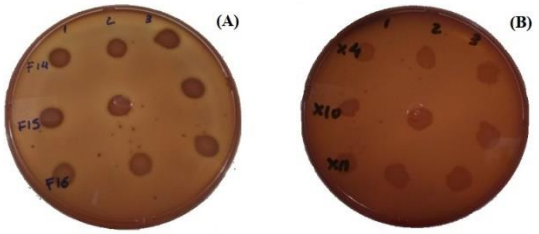

Figura 1. Isolados de tambaqui apresentando (A) atividade hemolítica positiva e (B) atividade hemolítica negativa.

A produção de hemolisina é um fator de virulência compartilhado entre uma vasta gama de microrganismos patogênicos, pois facilita a disponibilidade de ferro necessário para suas atividades metabólicas e, como consequência, causa anemia e edema no hospedeiro (Pádua et al., 2013).

Farias et al. (2018), ao avaliar a resistência de tambaquis ao desafio com *A. hydrophila* após suplementação de probióticos verificou que os animais sem suplementação apresentaram redução nos níveis de hemoglobina em consequência de uma provável hemorragia ou hemólise, característica da infecção de bactérias do gênero *Aeromonas*, já os peixes que foram tratados com probióticos na dieta apresentaram manutenção homeostática. Este teste é de fundamental importância na busca por potenciais cepas probióticas a fim de descartar bactérias que apresentem atividade hemolítica uma vez que implica na capacidade de destruição das hemácias, com liberação de hemoglobina no plasma (Pereira et al., 2015).

A ausência e presença da atividade antagonista foram observadas (Figura 2. A e Figura 2. B). Dentre os 28 isolados, todos foram capazes de inibir *E. coli*, *S. Enteritides* e *A. hydrophila*. 26 isolados inibiram o crescimento de *P. aeruginosa.* Apenas as linhagens I4 e IC4, isoladas do intestino, não apresentaram formação de halo de inibição para esse patógeno. A média do diâmetro dos halos variou de 6mm a 14,33mm, sendo que esses dois extremos foram encontrados no teste de inibição de *A. hydrophila*. À exceção de *P. aeruginosa*, as médias de halos de inibição diferiram significativamente em pelo menos dois valores para cada patógeno testado individualmente.

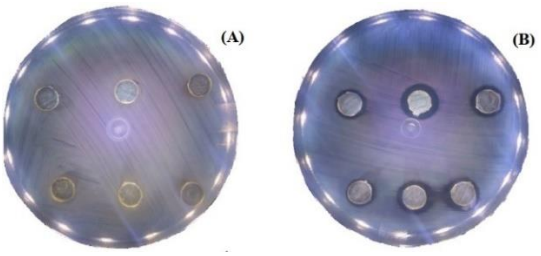

Figura 2. Isolados de tambaqui apresentando (A) ausência e (B) presença de atividade antagonista contra as bactérias patogênicas.

Neste trabalho o efeito antagonista exercido sobre as bactérias patogênicas foi observado em todos os isolados testados (Tabela 1), comprovando seu grande potencial como probiótico uma vez que a capacidade de inibir o crescimento de patógenos é característica essencial de uma cepa probiótica.

Tabela 1. Valores médios dos halos de inibição (mm) dos isolados contra as bactérias patogênicas.

Isolados	***A. hydrophila***	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. enteritidis*	Média
I4	12,33	8,67	0,00	10,33	7,83
I9	9,00	10,33	10,17	10,83	10,08
I10	6,00	9,67	10,00	9,67	8,83
I17	11,17	9,17	10,67	8,83	9,96
I18	14,33	12,00	12,00	12,17	12,63
I22	12,00	9,17	7,17	9,50	9,46
I23	9,83	10,17	10,17	11,67	10,71
I24	12,17	10,17	11,33	1,50	11,29
I25	13,50	11,67	13,17	10,50	12,21
I26	11,50	11,00	13,00	9,17	11,17
I27	12,33	9,17	12,67	12,33	11,38
I28	6,00	12,67	12,00	12,00	10,67
IC1	8,33	8,17	10,17	12,67	9,84
IC4	8,67	11,67	11,67	12,50	11,13
IC9	10,17	7,83	9,83	9,33	9,29
IC10	10,50	7,33	0,00	10,17	6,75
IC11	12,83	8,67	7,17	10,33	9,75
IC12	10,00	10,17	10,83	10,83	10,46
IC13	11,67	10,00	11,33	12,00	11,25
F2	11,17	8,17	9,33	8,17	9,21
F3	11,33	8,83	9,00	7,67	9,21
F10	10,33	9,67	8,17	7,50	8,92
F12	8,83	9,83	7,50	7,67	8,45
FC1	11,17	10,33	9,33	11,17	10,50
FC2	12,17	13,50	10,83	12,67	12,29
FC3	11,50	11,17	11,67	11,33	11,42
FC4	11,00	10,00	12,00	11,50	11,13
FC6	6,00	11,33	13,33	11,33	10,50

Hermanns et al. (2013) e Tamanini et al. (2012), em seus ensaios de atividade antagonista frente a patógenos verificaram a presença de halos de inibição para *E. coli* e *Salmonella* sp. De forma semelhante, a análise da formação de halos no presente trabalho mostrou que todos os isolados apresentaram atividade antagonista contra estes dois patógenos. Balduino et al. (1999) relataram a formação de halos de inibição medindo entre 7mm e 8mm para *E. coli.* Neste estudo foi verificado um diâmetro mínimo de 7,33mm e máximo de 12,63mm, correspondendo aos isolados IC10 e I28 respectivamente, para o mesmo patógeno.

A maior zona de inibição no presente trabalho foi verificada para *A. Hydrophila* com 14,33mm de diâmetro, proveniente do isolado I18. Estes dados corroboram com o trabalho de Bonin (2019) o qual observou diâmetro máximo de aproximadamente 14,55mm também para *A. hydrophila* utilizando bactérias ácido-lácticas obtidas comercialmente.

O efeito antagonista exercido para esta bactéria patogênica especificamente é de suma importância na busca por probióticos com utilização na aquicultura uma vez que a mesma representa um dos maiores causadores de doenças em peixes sendo responsável por grandes perdas na produção e comercialização (Leão et al., 2020), além de submeter os peixes a condições de estresse podendo prejudicar funções das brânquias, tegumento e intestino (MARINHO-NETO et al., 2019)

As propriedades antimicrobianas mediadas por bacteriocinas produzidas por BAL tornam este grupo de bactérias um dos principais candidatos a probióticos (Dubourg et al., 2015). Além disso, o efeito antagonista também é exercido pela produção de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Oelschlaeger, 2010). Entretanto, o presente trabalhou limitou-se apenas a avaliar qualitativamente observando presença ou ausência dos halos de inibição e quantitativamente através da medida dos halos, sendo necessários mais estudos a fim de caracterizar tais substâncias antimicrobianas produzidas.

Os 28 isolados foram submetidos ao teste de gram e catalase para confirmação das características de bactérias ácido-lácticas (gram positivas e catalase negativas). Como resultado, todos os isolados se apresentaram como gram positivos (Figura 3) e catalase negativos, não havendo formação de bolhas (Figura 4. A), em contraste com o controle utilizado o qual apresentou reação positiva (Figura 4. B), evidenciando seu perfil como BAL.

Figura 3: Isolado apresentando-se como positivo para o teste de coloração de Gram.

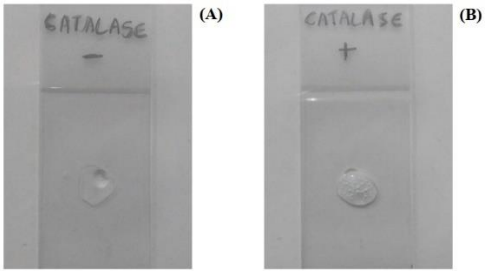

Figura 4: (A) Isolado de bactéria ácido-láctica apresentando reação negativa para catalase. (B) Isolado de levedura utilizado como controle apresentando reação positiva para catalase.

A capacidade dos isolados de sobreviver em simulação *in vitro* com as mesmas condições de acidez do ambiente gastrintestinal foi avaliada. A figura 3 mostra a porcentagem de sobrevivência para cada um dos 6 isolados submetidos ao teste de tolerância ao pH 3,0 simulando a acidez do ambiente gastrintestinal.

Foram verificadas maiores taxas de sobrevivência para os isolados IC13 e I27 com 69,86% 69,11% respectivamente. Em contraste, FC3 não mostrou crescimento favorável nestas condições uma vez que seu percentual de sobrevivência foi quase zero (0,03%). As médias de sobrevivência variaram significativamente entre os grupos. I27 e IC13 apresentam a mesma porcentagem de sobrevivência e diferiram significativamente dos demais isolados testados.

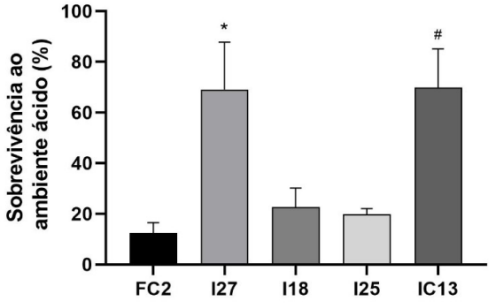

Figura 3: Porcentagem de sobrevivência dos isolados quando condicionados a simulação in vitro do ambiente gastrintestinal com pH ajustado para 3,0. O isolado FC3 não apresentou resistência. *Diferença estatística em relação aos outros isolados à exceção de IC13. #Diferença estatística em relação aos outros isolados à exceção de I27.

O pH do intestino de *C. macropomum* apresenta variação entre 7 e 8, porém, o pH do estômago é muito ácido e pode reduzir em até 90% a densidade de células bacterianas (Ramesh et al., 2017). Dessa forma, a capacidade de sobreviver ao ambiente gastrintestinal é um dos principais requisitos na seleção de um microrganismo probiótico, pois o mesmo deve se manter viável para que possa fornecer benefícios à saúde do hospedeiro, sendo, portanto, de suma importância que possua a capacidade de resistir a níveis de pH baixos mantendo sua viabilidade (Balasingham et. al, 2017). No entanto, a literatura aponta para variações de resistência entre as potenciais bactérias probióticas estudadas. Alonso et al. (2018) constataram que apenas uma cepa (*Lactobacillus plantarum*) permaneceu viável ao avaliar a capacidade de resistência de quatro diferentes cepas de BAL em pH 3,0, reforçando as alterações que ocorrem dentro deste grupo de bactérias.

Deste modo, fica evidente que por BAL ser um grupo bastante amplo e diverso é possível encontrar também numerosas variações. Entretanto, tais variações não comprometem seu potencial como probiótico, pois, embora o pH do ácido estomacal dos peixes varie entre 2,4 e 4,2, a ingestão de alimentos alteram o ambiente provocando diminuição da acidez (Baldisserotto, 2013). Além disso, estratégias como o encapsulamento desses microrganismos podem auxiliar sua passagem pelo trato gastrintestinal bem como a permanência de sua viabilidade por um período maior. Esta abordagem fornece proteção da linhagem probiótica, geralmente utilizando-se de polímeros para manter sua estabilidade e viabilidade em ambientes adversos, como por exemplo, o pH gástrico (Salas-Jara et al., 2016).

A suplementação de probióticos na dieta de peixes têm mostrado melhoras significativas nas condições biológicas e fisiológicas desses aimais, bem como,

consequentemente, redução de perdas econômicas advindas da mortandade ocasionada por patógenos. Azevedo et al. (2016) avaliaram o efeito da suplementação de rações probióticas formuladas com *Bacillus subtilis* em tambaquis jovens e constataram que os peixes apresentaram melhora na taxa de crescimento. Similarmente, Jatobá e Mouriño (2015) verificaram aumento da produtividade para tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) ao consumirem rações suplementadas com *Lactobacillus plantarum.* Carnevali et al. (2004) também concluíram que a administração de *Lactobacillus* spp. em peixes promoveu diminuição da mortalidade dos animais durante a larvicultura e alevinagem, comprovando a importância econômica da inclusão desses microrganismos na dieta dos animais.

Outro fato que deve ser considerado na busca por potenciais cepas probióticas é a época e local da coleta, pois as bactérias apresentam variações em suas características dependendo das condições ambientais como clima e qualidade da água. Além disso, é válido ressaltar que, apesar do modo mais eficaz da administração de probióticos ser pela alimentação, eles podem ainda ser aplicados diretamente na água de cultivo provocando efeitos benéficos ao ambiente e ao hospedeiro (Mouriño et al., 2012).

CONCLUSÃO

Os 28 isolados triados pela atividade hemolítica enquadraram-se no perfil de bactérias ácido-lácticas e apresentaram antagonismo frente aos patógenos testados, ainda que haja variação na capacidade observada pela diversidade de tamanho dos halos de inibição. Os resultados para resistência em ácido mostraram que essa é uma característica que varia conforme a linhagem, no entanto é importante destacar que duas das linhagens analisadas apresentaram boa porcentagem de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

AKHTER, N., WU, B., MEMON, A. M.; MOHSIN, M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 733-741, 2015.

ALONSO, S.; CASTRO, M., BERDASCO, M.; DE LA BANDA, I.; MORENO-VENTAS, X.; DE ROJAS, A. Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 11: 569-579, 2019.

AZEVEDO, R. V.; FILHO, J. C.; PERERIRA, S. L.;CARDOSO, L. D., JUNIOR, M. V.; ANDRADE, D. R. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51: 9-1, 2016.

BALASINGHAM, K.; VALLI, C.; RADHAKRISHNAN, L.; BALASURAMANYAMD. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from swine intestine. **Vet World**, 10(7):825-829, 2017.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. Editora UFSM (3º ed.), Santa Maria, RS, 2013.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, C. O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação lática desenvolvida por cultura mista de bactérias láticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, 1999.

BONIN, M. C. Evaluation of the antagonistic activity of lactic acid bacteria and their metabolites against animal pathogens. **Brazilian Journal of Development,** 5: 18511-18525, 2019.

BUGLIONE-NETO, C.; MOURIÑO, J. L.; VIEIRA, F. N.; SILVA, B. C.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W.; FRACALOSSI, D. M.; ANDREATTA, E. Métodos para determinação da digestibilidade aparente de dietas para camarão marinho suplementadas com probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., Brasília, v.48, n.8, p.1021-102, 2013.

CARNEVALI, O.; ZAMPONI, M.C.; SULPIZIO, R. et al. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. **Aquaculture International**, v.12, p.377-386, 2004.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia,** 39: 68-87, 2010.

DUBOURG, G.; ELSAWI, Z.; RAOULT, D. Assessment of the in vitro antimicrobial activity of Lactobacillus species for identifying new potential antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 46: 590-593, 2015.

FARIAS, A. E.; DIAS J. A.; SOUSA, N. C.; COUTO, M. V. et al. Resistência de tambaquis suplementados com probiótico ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. **EMBRAPA**, 2018.

HERMMANS, G.; FUNCK, G. D.; SCHIMIDT, F.T.; RICHARD, N. S. P. S. Isolation and identification of supposedly bacteriocinogenic lactic acid bacteria from milk and cheese. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, 11: 191-196, 2013.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G., MERENSTEIN, D. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Gastroenterology & Hepatology: Nature reviews**, 11: 506-514, 2014.

JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L., 2015. Efeito do *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal de alevinos de *Oreochromis niloticus*. **Ciência Animal Brasileira**, 16: 45-53.

LEÃO, S. O. A.; SILVA, A. M. S.; VELASQUEZ, J. G. R.; BRANDÃO, F.; CHAGAS E. C.; MAJOLO, C. Ocorrência de *Aeromonas* multirresistentes em tambaquis cultivados em tanques escavados. **Scientia Amazonia**, v.9, n.4, CA17-CA24, 2020.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVAQUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural

aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PloS one**, v. 14, n. 9, 2019.

MENDONÇA, P. P.; VIDAL, M. V. J.; POLESE, M. F.; SANTOS, M. V. B.; REZENDE, F. P.; ANDRADE, D. R. Morphometrical development of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) under diferente photoperiods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 41, n. 6, 2012.

MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F.; JATOBÁ, A. B.; SILVA, B. C.; JESUS, G. F. A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Aquaculture Nutrition**, 18: 73-80, 2012.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **International Journal of Medical Microbiology**, 300: 57-62, 2010.

PÁDUA, S. B.; NETO, J. D.; SAKEBE, R.; CLAUDIANO, G. S.; CHAGAS, E. C.; PILARSKI, F. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.1171-1174, 2013.

PEREIRA, D. S. P.; GUERRA-SANTOS, B.; MEDEIROS, S. D.; ALBINATI, R. C. B.; AYRES, M. C. C**.** Comparação de metodologias utilizadas na análise dos parâmetros sanguíneos e da proteína total de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.16, n.4, p.893-904, 2015.

PEREIRA, S. A.; JESUS, G. F. A.; PEREIRA, G. V.; SILVA, B. C.; SÁ, L. S.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P. the chelating mineral on organic acid salts modulates the dynamics and richness of the intestinal microbiota of a silver catfish *Rhamdia quelen*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1483-1495, 2020.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. **CAB Reviews**, v. 7, p. 1-16, 2012.

RAMESH, D.; SOUISSI, S.; AHAMED, T. S. Effects of the potential probiotics *Bacillus aerophilus* KADR3 in inducing immunity and disease resistance in *Labeo rohita*, **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 408-415, 2017.

RINGO, E.; VAN DOAN, H.; LEE, S. H.; SOLTANI, M.; HOSEINIFAR, S. H.; HARIKRISHNAN, R.; SONG, S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 116-136, 2020.

RUIZ, M. L.; OWATARI, M. S.; YAMASHITA, M. M.; FERRAREZI, J. V. S.; GARCIA, P.; CARDOSO, L.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P. Histological effects on the kidney, spleen, and liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed different concentrations of probiotic *Lactobacillus plantarum*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 1, p. 167-176, 2019.

SALAS-JARA, M.; ILABACA, A.; VEGA, M.; GARCIA, A. Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. **Microorganisms**, 4: 35, 2016.

SILVA, C. A.; FUJIMOTO, R. Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques rede. **Acta Amazonica**, 43: 323-332, 2015.

TACHIBANA, L.; NATORI, M. M.; DIAS, D. C.; HAMED, S. B.; ISHIKAWA, C. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; GONÇALVES, G. S. Recentes avanços dos estudos e utilizações de probióticos na piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, Maria José Tavares et al (Org.). **Biotecnologia e sanidade de organismos aquáticos.** São Paulo: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos (ABRAPOA), cap. 2. p. 41-80, 2019.

TAMANINI, R.; BELOTI, V., SILVA, L.C.C.; ANGELA, H.L.; YAMADA, A. K., et al. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, 2012.

YAMASHITA, M. M.; PEREIRA, S. A.; CARDOSO, L.; ARAUJO, A. P.; ODA, C. E.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J.L. Probiotic dietary supplementation in Nile tilápia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 3, n. 7, p. 1235-1243, 2017.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; DELSHAD, S. T.; ADEL, M.; TIWARI, R..; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; LAZADO, C. C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: na update on their multiple modes of action: a review. **The Veterinary Quarterly**, 36: 228-241, 2016.