

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
UNIOESTE *CAMPUS* DE TOLEDO - PR
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA – PREP
MESTRADO

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
PARA O CULTIVO DE PEIXES MARINHOS

Toledo

2021

RAONÍ GONÇALVES DE SOUZA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
PARA O CULTIVO DE PEIXES MARINHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Dr. Altevir Signor

Co-orientadora: Dr.^a Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves

Toledo

2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Souza, Raoní Gonçalves de

Seleção de bactérias com potencial probiótico para o cultivo de peixes marinhos / Raoní Gonçalves de Souza; orientador Altevir Signor; coorientadora Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves. -- Toledo, 2021.
38 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2021.

1. Probióticos. 2. Antimicrobiano. 3. Bactérias benéficas. 4. Robalo-peva. I. Signor, Altevir, orient. II. Gonçalves, Flávia Regina Spago de Camargo, coorient. III. Título.

RAONÍ GONÇALVES DE SOUZA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
PARA O CULTIVO DE PEIXES MARINHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca - Mestrado, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/Campus de Toledo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Altevir Signor
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo/PR

Prof.^a Dr. Aldi Feiden
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo/PR

Prof. Dr. Leonardo Demier Cardoso
Instituto Federal do Espírito Santo – Piúma/ES

Aprovada em: 01 de setembro de 2021.
Local de defesa: Online / Síncrono.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, por sempre ter me guiado e por me dar sentido à vida.

A minha família, em especial a minha mãe, dona Eliza, a quem me deu apoio incondicional, não importando as circunstâncias. Te amo!

Ao meu amor, Viviane, por ser minha companheira e cúmplice de vida. Os momentos ao seu lado são perfeitos.

Ao professor e orientador Dr. Altevir, por ter aceitado o convite de me instruir e por todos os ensinamentos.

À professora e coorientadora, Dr^a. Flávia, por ter confiado, a mim, seu laboratório e a responsabilidade de executar o projeto. Pelos ensinamentos e pelas broncas de não estar utilizando a máscara (rsrs).

Ao professor Dr. Léo, “Paquito”, por ter ajudado durante todo o manejo, por todo ensinamento, pelas “zueiras” e momentos de descontração dos extensos dias de trabalho.

Às técnicas de laboratório, Suzana, Dani e Amanda, ao meu parceiro Lucas e à parceira de projeto, Naessa. Sem vocês, esse trabalho jamais teria sido concluído.

Ao professor Dr. Henrique, por ter cedido um espaço, nos âmbitos do LANPOA, para execução dessa pesquisa.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado Diego e João Lucas... “que missão que a gente se meteu hein”? (kkk) Mas hoje, todo esse esforço começa a fazer sentido!

À UNIOESTE - Campus Toledo/PR, instituição incrível, que me deu essa oportunidade de agregar valor à minha construção pessoal e profissional.

Ao IFES - Campus Piúma/ES por, de fato, transformar vidas, 2012 o início de tudo.

À CAPES, pelo fomento e pela ajuda a minha dedicação exclusiva ao programa e poder desenvolver uma pesquisa de qualidade, com retorno para a sociedade.

À FAPES, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que me esqueci de citar, mas que, de alguma forma, participaram e participam da minha vida. O “Raoní de hoje” tem um pouco de cada um de vocês!

“Aquele cujo a vida tem um ‘porquê’,
pode suportar quase todos os ‘comos’.”

Friedrich Nietzsche

Dissertação de mestrado elaborado e
formatado conforme as normas e modelo de
dissertação e tese da UNIOESTE – TOLEDO/PR

SOUZA, R.G.; GONÇALVES, F.R.S.de C.; CARDOSO, L.D.; SIGNOR, A. **SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA O CULTIVO DE PEIXES MARINHOS**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar em dois estudos, o potencial probiótico de bactérias isoladas do ambiente marinho e do intestino de *Rachycentron canadum* e *Macrobrachium rosenbergi* e verificar sua capacidade de colonização do trato intestinal de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Estudo I foram utilizados 225 juvenis de robalo-peva ($3,08 \pm 1$ g e $77,7 \pm 7,12$ mm), distribuídos em 15 tanques de 100 L alimentados duas vezes por dia a 5% da biomassa total, divididos em 3 tratamentos: probiótico desenvolvido (PRO) multicepa (B21CO, B21C, MG, MGO, MB e MBO); controle positivo (C+) com probiótico comercial; e controle negativo (C-) grupo placebo, por um período de 65 dias. A atividade antimicrobiana antagonicas ao patógeno *Vibrio parahaemolyticus* foram positivas, as cepas bacterianas MBO, MB, B21C e B21CO tiveram os melhores halos inibitórios. Todas as cepas foram resistentes a pH ácido e sais biliares podendo sobreviver ao processo digestivo até atingir o trato intestinal do animal. Todas as cepas foram capazes de se autoagregar, sendo a MG e MGO os melhores resultados de agregação. Foram analisadas bactérias totais e *Vibrio spp.* no intestino e na água de cultivo e em ambos os resultados não houveram diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Estudo II foram 72 juvenis de robalo-peva ($15,47 \pm 6,59$ g e $100,76 \pm 10,40$ mm), distribuídos em 12 tanques de 100 L (6 peixes/tanque) e divididos em 4 tratamentos: Controle (placebo), MBO (*Enterobacter hormaechei*), B21CO (*Bacillus subtilis*) e MBO + B21CO (*E. hormaechei* + *B. subtilis*) pelo período de 28 dias. A quantificação dos probióticos no intestino e na água de cultivo foram maiores no T1 (primeira coleta, no 14º dia de cultivo) do que no T2 (coleta final, no 28º dia de cultivo) após a inoculação do patógeno. Os *Vibrio spp.* tanto no intestino quanto na água de cultivo dos tratamentos com probióticos foram significativamente ($p < 0,05$) menores comparados ao grupo controle. Conclui-se que as cepas *E. hormaechei* e *B. subtilis* tem grande potencial no antagonismo *in vitro* frente ao *V. parahaemolyticus*. Todas as cepas analisadas sobrevivem as condições do trato gastrointestinal, as cepas *E. hormaechei* e *B. subtilis* colonizaram o intestino de robalo-peva (*C. parallelus*) em 14 dias, e a cepa *S. marcescens* em 21 dias. Todas as cepas mostraram capacidade efetiva de se autoagregar. Nos testes *in vivo* as cepas *B. subtilis* e *E. hormaechei* foram capazes de reduzir significativamente os *Vibrio spp.* no intestino e na água de cultivo.

Palavras-chave: Antimicrobiano, Bactérias benéficas, Robalo-peva.

SOUZA, R.G.; GONÇALVES, F.R.S.de C.; CARDOSO, L.D.; SIGNOR, A. **SELECTION OF BACTERIA WITH PROBIOTIC POTENTIAL FOR THE CULTIVATION OF MARINEFISH.** Dissertation (Master) - State University of Western Paraná.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate, in two studies, the probiotic potential of substances from the marine environment and the intestine of *Rachycentron canadum* and *Macrobrachium rosenbergi* and to verify their colonization capacity in the intestinal tract of fat snook (*Centropomus parallelus*). Study I used 225 juvenile fat snook (3.08 ± 1 g and 77.7 ± 7.12 mm), distributed in 15 100 L tanks fed twice a day at 5% of the total biomass, divided into 3 treatments: multistrain developed (PRO) probiotic (B21CO, B21C, MG, MGO, MB and MBO); positive control (C +) with commercial probiotic; and negative control (C-) placebo group, for a period of 65 days. The antimicrobial activity antagonistic to the pathogen *Vibrio parahaemolyticus* was positive, the bacterial strains MBO, MB, B21C and B21CO had the best inhibitory halos. All strains were resistant to acid pH and bile salts, being able to survive the digestive process until reaching the animal's intestinal tract. All strains were able to self-aggregate, with MG and MGO being the best aggregation results. Total bacteria and *Vibrio spp.* in the intestine and in the culture water and in both results there are no statistical differences ($p < 0.05$). Study II consisted of 72 juvenile fat snook (15.47 ± 6.59 g and 100.76 ± 10.40 mm), distributed in 12 100 L tanks (6 fish / tank) and divided into 4 treatments: Control (placebo), MBO (*Enterobacter hormaechei*), B21CO (*Bacillus subtilis*) and MBO + B21CO (*E. hormaechei* + *B. subtilis*) for a period of 28 days. The quantification of probiotics in the intestine and in the culture water were higher in T1 (first collection, on the 14th day of culture) than in T2 (final collection, on the 28th day of culture) after pathogen inoculation. *Vibrio spp.* both in the intestine and in the culture water of the treatments with probiotics were studied ($p < 0.05$) smaller compared to the control group. It is concluded that *E. hormaechei* and *B. subtilis* strains have great potential without in vitro antagonism against *V. parahaemolyticus*. All strains analyzed survive according to the conditions of the gastrointestinal tract, as *E. hormaechei* and *B. subtilis* strains colonized the intestine of fat snook (*C. parallelus*) in 14 days, and the *S. marcense* strain in 21 days. All strains with effective ability to self-aggregate. In vivo tests such as *B. subtilis* and *E. hormaechei* strains were able to reduce the benefits of *Vibrio spp.* without intestine and in the growing water.

Keywords: Antimicrobial, Beneficial bacteria, Fat snook.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de barras, referente a capacidade de autoagregação das cepas bacterianas...20

Figura 2. Boxplot do número totais de bactérias no trato gastrointestinal de robalo-peva (*C. parallelus*) representado em Log_{10} UFC.g⁻¹ de cada tratamento, sete dias após o início da suplementação probiótica T1 (07º dia), e as últimas duas semanas T2 e T3 (58º e 65º dias) após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.....21

Figura 3. Gráfico em barras evidenciando o quantitativo total de vibrio no trato gastrointestinal de robalo-peva (*C. parallelus*) entre os tratamentos, referentes a primeira coleta T1 (07º dia) e após a inoculação do patógeno T2 e T3 (58º e 65º dia).....22

Figura 4. Boxplot do número totais de bactérias na água de cultivo representado em Log_{10} UFC.g⁻¹ de cada tratamento, sete dias após o início da suplementação probiótica T1 (07º dia), e as últimas duas semanas T2 e T3 (58º e 65º dia) após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.....22

Figura 5. Gráfico em barras evidenciando o quantitativo total de vibrio na água de cultivo entre os tratamentos (PRO, C- e C+), referentes a primeira coleta T1 (07º dia) e após a inoculação do patógeno T2 e T3 (58 e 65º dia).....23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro médio (mm) do halo de inibição das bactérias probióticas frente ao antagonismo do patógeno <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de colônias probióticas no trato gastrointestinal de robalo-peva (<i>C. parallelus</i>) nos tratamentos representados em Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ , referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).....	24
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de colônias probióticas na água de cultivo nos tratamentos representados em Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ , referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).....	24
Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de vibrios totais contidos no trato gastrointestinal nos tratamentos, representados em Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ , referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).....	25
Tabela 5. Valores médios e desvio padrão de vibrios totais na água de cultivo nos tratamentos representados em Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ , referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 CEPAS PROBIÓTICAS.....	13
2.2 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	14
2.3 ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO PH GÁSTRICO E SAL BILIAR	14
2.4 TESTE DE AUTOAGREGAÇÃO.....	15
2.5 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	15
2.6 AQUISIÇÃO DOS PEIXES.....	15
2.7 PREPARAÇÃO DO PROBIÓTICO	16
2.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
2.8.1 Estudo I.....	16
2.8.2 Estudo II	17
2.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO DAS CEPAS PROBIÓTICAS	17
2.10 AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS E VÍBRIO NA ÁGUA DE CULTIVO	17
2.11 INOCULAÇÃO DOS PATÓGENOS NOS PEIXES	18
2.12.1 Inoculação do patógeno nos peixes do experimento 1	18
2.12.2 Inoculação do patógeno nos peixes no experimento 2	18
2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
3 RESULTADOS	18
3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	18
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	19
3.3 TOLERÂNCIA A PH ÁCIDO E SAIS BILIARES.....	19
3.4 AUTOAGREGAÇÃO	20
3.5 ESTUDO I.....	20
3.5.1 Bactérias e víbrios totais no trato gastrointestinal de <i>Centropomus parallelus</i> e na água de cultivo.....	20
3.6 ESTUDO II.....	23
3.6.1 Colonização probiótica gastrointestinal e da água de cultivo.....	23
3.6.2 Víbrios totais no trato gastrointestinal e na água de cultivo.....	25
4 DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A pesca extrativista se mantém estagnada há mais de duas décadas, em oposição, à aquicultura que vem se intensificando e suprindo a demanda de proteína para a população global. No período de 2018, a maricultura produziu cerca de 179 milhões de toneladas (FAO, 2020). A piscicultura marinha é um dos segmentos que mais crescem no mundo, porém, no Brasil, apesar das condições climáticas serem favoráveis, o cultivo de organismos aquáticos marinhos ainda não é uma atividade consolidada (CAVALLI & HAMILTON, 2009; FAO, 2020).

No Brasil, vem se estudando diversas espécies de peixes marinhos, com foco no desenvolvimento de tecnologias de cultivo (BALDISSEROTTO & GOMES, 2010). O robalo-peva – *Centropomus parallelus* – foi observado como um peixe com características e resultados promissores para cultivo em águas nacionais (LIEBL et al., 2016; PINHO et al., 2016). Entre essas características favoráveis estão elencados o crescimento equivalente ao de muitas espécies marinhas já cultivadas, boa taxa de conversão alimentar, resistência a diferentes salinidades e grandes densidades de estocagem (CERQUEIRA, 2010).

Com a crescente intensificação e comercialização da produção aquícola, as doenças se tornaram um dos principais obstáculos na indústria de cultivo (HAI, 2015). As doenças mais comuns na aquicultura são causadas por patógenos bacterianos Gram-negativos como os dos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Yersinia*. Esses patógenos são agentes etiológicos de várias patologias como a doença da boca vermelha entérica, furunculose, hemorragia, septicemia, vibriose entre outras (CASCALES et al., 2016; PATRA et al., 2016; WIKLUND, 2016; RONNESETH et al., 2017).

Na aquicultura, os agentes quimioterápicos, como antibióticos e produtos químicos, são a cura clássica para infecções microbianas (CHAUHAN & SINGH, 2019). No entanto, o uso extensivo desses quimioterápicos leva ao seu acúmulo no habitat aquático e resulta em consequências prejudiciais como o surgimento de bactérias resistentes a antibióticos, acúmulo de resíduos de antibióticos na carne, eliminação de micróbios benéficos do trato gastrointestinal e alterações na microbiota (efeito em micróbios não-alvo) do ambiente aquático (MUNOZ-ATIENZAL et al., 2013; AZEVEDO et al., 2015).

Uma abordagem alternativa emergente e promissora para prevenir doenças em peixes, está no uso de probióticos, que ajudam os peixes a resistir aos patógenos por vários mecanismos (CHAUHAN & SINGH, 2019). A importância dos probióticos usados na aquicultura não se

limita apenas ao trato gastrointestinal, mas também desempenha um papel importante na melhoria da saúde geral de um organismo (MEHRABI et al., 2018).

As bactérias do gênero *Bacillus* são as mais estudadas como probiótico, bem como sua associação com o hospedeiro, entre a grande variedade de animais aquáticos, porém existe uma gama de bactérias que podem ser utilizadas para a melhoria do cultivo de peixes marinhos. A introdução de probióticos na aquicultura começou com o advento de tecnologias agrícolas sustentáveis e científicas, como sistemas de recirculação de água (RAS), sistemas de produção de aquicultura com troca mínima de água e tecnologias de bioflocos (BFT) (JAMES et al., 2021). Na literatura foram relatados diversos benefícios com a utilização de *Bacillus sp.* na suplementação de rações de organismos aquáticos como: aumento de taxa de sobrevivência e redução na conversão alimentar (YANBO & ZIRONG, 2006), capacidade de resistir a doenças (BALCÁZAR et al., 2006; KAVITHA et al., 2018; RAMESH & SOUISSI, 2018; YI et al., 2018), melhora no sistema imunológico (NAYAK, 2010; ABRIOUEL et al., 2011; BURUIANĂ et al., 2014), redução do estresse em várias espécies de cultivo (SHAHEEN et al., 2014; ABDOLLAHI-ARPAHAHI et al., 2018; EISSA et al., 2018) e também desempenha papel importante na manutenção da qualidade de água de vários sistemas aquícolas (CAMARGO & ALONSO 2006; NIMRAT et al., 2012; ZOKAEIFAR et al., 2014).

Grandes variedades de bactérias Gram-negativas também desempenham papel como probióticos putativos na aquicultura. Embora as bactérias Gram-negativas não sejam comumente administradas na aquicultura, diversos autores descrevem seus efeitos benéficos na suplementação do animal (HAI, 2015).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial probiótico de bactérias isoladas do ambiente marinho e do intestino de *Rachycentron canadum* e *Macrobrachium rosenbergi* e verificar sua capacidade de colonização do trato intestinal de robalo-peva (*Centropomus parallelus*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto do qual esse trabalho faz parte está registrado na CEUA/Ifes sob o número 23185.000445-2018-10.

2.1 CEPAS PROBIÓTICAS

As cepas utilizadas para a formulação do probiótico foram previamente isoladas pela equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana do IFES – *Campus* Piúma-ES. A cepa denominada B21CO foi isolada do intestino de juvenis de beijupirá (*Rachycentron canadum*), a cepa B21C foi isolada da água de cultivo de beijupirás e as cepas MG e MGO foram isoladas da água de cultivo de camarões, as cepas MB e MBO foram isoladas do intestino de camarão da Málasia (*Macrobrachium rosenbergii*).

2.2 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO *IN VITRO*

As cepas selecionadas foram submetidas ao teste de inibição em triplicata, sendo que o patógeno *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) foi inoculado com uso de um swab (10^8 UFC/mL) em placas de Petri com meio de cultura Ágar Nutriente adicionado de 3% de NaCl (ANS), a bactéria antagonista foi inoculada no centro da placa com o auxílio de uma alça de platina e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro.

2.3 ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO PH GÁSTRICO E SAL BILIAR

O teste de resistência em pH ácido foi feito de acordo com a metodologia descrita por Sansawat e Thirabunyanon (2009), a bactéria foi inoculada em caldo nutriente estéril adicionado de 3% de NaCl (CNS) na proporção de 10^8 UFC/mL verificada em espectrofotômetro (*Spectro 560 Visible Spectrophotometer - MARTE*) e diluiu-se 100 µL da solução em 900 µL de tampão fosfato (pH 2,5) e posteriormente incubada por 3 horas a 35°C em estufa bacteriológica (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*). Logo após, diluiu-se 100 µL da solução ácida em 900 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), homogeneizou-se e plaqueou-se 50 µL da solução em meio ANS e foi incubado por 24 horas a 35°C em estufa bacteriológica (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*). Após o período de incubação foi realizado a quantificação das colônias.

Para o teste de resistência a sais biliares, utilizou-se 100 µL da solução de cada cepa e adicionou e diluiu em 900 µL de caldo nutriente (CN) com 0,3% de extrato de bile e incubados a 35°C por 24 horas em estufa (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*). Em seguida foram plaqueados 50 µL da solução em meio ANS, incubados por 24 horas a 35°C em estufa (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*), e posteriormente, quantificou-se o número de colônias formadas.

2.4 TESTE DE AUTOAGREGAÇÃO

Foi utilizado o método proposto por Grzeskowiak et al., (2012) com modificações para esse teste. As bactérias foram cultivadas em CNS por 24 horas a 37°C em estufa (*LUCA 81/180* - *LUCADEMA*). As culturas foram centrifugadas a 4500 rpm durante 15 minutos e lavadas 2 vezes com tampão fosfato de potássio (pH 7,0). O alimento foi ressuspensionado em 4 mL tampão fosfato e ajustada a concentração para 10⁸ UFC.g⁻¹, seguindo a escala McFarland 0.5. Os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex por 10 segundos e incubados a 35°C em estufa bacteriológica (*LUCA 81/180* - *LUCADEMA*). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (*Spectro 560 Visible Spectrophotometer* - *MARTE*), com 600_{nm}. Para a leitura, 0,1 mL da suspensão bacteriana (porção superior) foi transferido para um tubo contendo 3,9 mL de tampão fosfato, nos tempos 1, 2 e 18 horas após incubação. O cálculo da porcentagem de autoagregação foi realizado de acordo com a fórmula:

$$AT = 1 - \left(\frac{Af}{Ai} \right) * 100$$

AT: autoagregação, *Ai*: leitura anterior a incubação. *Af*: leitura após 1 hora de incubação.

(GRZESKOWIAK et al., 2012)

2.5 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura caldo nutriente, a 35°C/24 horas e posteriormente transferidas para o kit *API20E*[®] ou *API50*[®] da *Biomerieux* para a identificação bioquímica das cepas.

A identificação molecular foi realizada através de sequenciamento de alto desempenho do gene 16S rRNA região V3-V4, utilizando o *MiSeq Sequencing System* – *Illumina*.

2.6 AQUISIÇÃO DOS PEIXES

Os exemplares do robalo-peva (*Centropomus parallelus*) foram obtidos diretamente da Maricultura Pandini LTDA localizada ao norte do estado do Espírito Santo no município de Conceição da Barra. Os peixes foram estocados em sacos plásticos oxigenados e transportados em veículo terrestre até o Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) – *Campus Piúma*, onde

foram aclimatados e soltos em duas caixas circulares de 2,0 m³ provisoriamente, onde ficaram por um período de 30 dias antes do início do experimento.

2.7 PREPARAÇÃO DO PROBIÓTICO

Uma solução contendo as bactérias probióticas foi preparada diariamente, utilizando-se cada bactéria na concentração final de 10¹¹ UFC/g de alimento, verificados em espectrofotômetro (*Spectro 560 Visible Spectrophotometer - MARTE*). A dieta experimental utilizada foi o filé de peroá (*Balistes capriscus*) in natura, cortado em pequenos cubos. As cepas bacterianas foram centrifugadas (*DT 4500 – DAIKI*) e após as 24 horas de crescimento em caldo nutriente a 35°C em estufa (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*), ressuspendidas em tampão fosfato de potássio (pH 7,0), ajustadas a concentração de 10¹¹ UFC/mL e aspergidas no alimento (1 mL/g). O grupo controle positivo (C+) foi feito de acordo com as especificações do fabricante, por diluição em água, ajustadas e aspergidas no alimento em proporções igual ao grupo anteriormente descrito. Após 30 minutos os peixes foram alimentados.

2.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.8.1 Estudo I

Cada repetição foi isolada e mantida em sistema único com um filtro adaptado para partículas físicas e biológicas em cada caixa. As análises de qualidade de água foram feitas diariamente e os parâmetros avaliados: amônia, nitrito, pH, temperatura (°C), salinidade e oxigênio dissolvido.

Os juvenis de *C. parallelus* (n = 225; 3,08 g ± 1 g; 77,7 ± 7,12 mm) foram distribuídos em 15 tanques de 100 L (15 peixes/tanque) e alimentados duas vezes ao dia, totalizando 5% da biomassa total. Foram utilizados três tratamentos: Probiótico (PRO), composto pelas cepas selecionadas anteriormente (B21CO, B21C, MG, MGO, MB, MBO); controle positivo (C+), utilizando-se um probiótico comercial; e controle negativo (C-), grupo placebo. Semanalmente, os peixes foram deixados em jejum por 24 horas e cinco peixes por tratamento foram anestesiados utilizando-se eugenol 10% e eutanasiados por insensibilização térmica para análise de colonização probiótica. O experimento foi realizado por um período de 65 dias.

2.8.2 Estudo II

Cada repetição foi isolada e mantida em sistema único com um filtro adaptado para partículas físicas e biológicas em cada caixa. As análises de qualidade de água foram feitas diariamente e os parâmetros avaliados: amônia, nitrito, pH, temperatura (°C), salinidade e oxigênio dissolvido.

Os juvenis de *C. parallelus* ($n = 72$; $15,47 \pm 6,59$ g; $10,76 \pm 1,40$ mm) foram distribuídos em 12 tanques de 100 L (6 peixes/tanque) e alimentados duas vezes ao dia, totalizando 5% da biomassa total. Foram utilizados quatro tratamentos: controle (C) grupo placebo; MBO (*E. hormaechei*) uma cepa gram-negativa; B21CO (*B. subtilis*) uma cepa gram-positiva; e MBO + B21CO (*E. hormaechei* e *B. subtilis*) um probiótico multicepa composto de uma gram-positiva e uma gram-negativa. O tempo total de experimento foi de 28 dias (quatro semanas). Ocorreram duas coletas, uma no 14º dia e outra no 28º dia de experimento. Três peixes foram deixados em jejum por tratamento durante 24 horas, e posteriormente, anestesiados utilizando-se eugenol 10% e eutanasiados por insensibilização térmica para análise de colonização probiótica.

2.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO DAS CEPAS PROBIÓTICAS

Foram coletadas amostras de intestino, maceradas em solução salina estéril (0,85%) na proporção de 1:10, diluídas serialmente e plaqueadas em meio de cultura Ágar Nutriente (AN). As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C em estufa (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*) e o número de UFC.g⁻¹ foi determinado. Para a identificação das bactérias utilizadas na formulação do probiótico foram utilizados a observação morfológica detalhada e posteriormente realizada a avaliação bioquímica com a utilização de sete testes distintos: fermentação de glicose e sacarose, produção de H₂S, produção de gás, produção de urease, utilização de manitol e degradação de triptofano.

2.10 AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS E VÍBRIO NA ÁGUA DE CULTIVO

As amostras de água foram coletadas semanalmente e diluídas serialmente em solução salina estéril (0,85%), plaqueadas em Ágar Nutriente (AN) para avaliação de bactérias totais e em Ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS) para avaliação de vibrios totais e incubadas em estufa a 35°C durante 24 horas (*LUCA 81/180 - LUCADEMA*) para posterior determinação do número de UFC/mL.

2.11 INOCULAÇÃO DOS PATÓGENOS NOS PEIXES

2.12.1 Inoculação do patógeno nos peixes do experimento 1

A inoculação do patógeno ocorreu na sétima semana de suplementação dos probióticos. O *V. parahaemolyticus* foi suspenso em solução salina estéril (0,85%) na concentração 10^8 UFC/mL verificado em espectrofotômetro (*Spectro 560 Visible Spectrophotometer - MARTE*). Foram injetados 200 μ L da suspensão bacteriana em cada peixe, por meio de injeção intraperitoneal.

2.12.2 Inoculação do patógeno nos peixes no experimento 2

A inoculação do patógeno ocorreu 21º dia de suplementação dos probióticos. O *V. parahaemolyticus* foi suspenso em solução salina estéril (0,85%) na concentração 10^8 UFC/mL verificado em espectrofotômetro (*Spectro 560 Visible Spectrophotometer - MARTE*). Foram injetados 200 μ L da suspensão bacteriana em cada peixe, por meio de injeção intraperitoneal.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo software de análises estatísticas Statistica® 10. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Bartlett, normalidade Shapiro-Wilk e à análise de variância, seguido de teste de Tukey em nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

De acordo com os resultados das análises bioquímicas, a bactéria B21CO pertence ao gênero *Bacillus*, as bactérias MG e MGO pertencem ao gênero *Serratia* e as demais bactérias foram classificadas como sendo da família *Enterobacteriaceae*.

Com o sequenciamento do RNA 16S foi possível classificar as bactérias como sendo do filo *Proteobacteria*. A cepa B21CO pertence à classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Bacillaceae*, do grupo dos *Bacillus subtilis*. As demais bactérias pertencem à classe *Gamaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae*, sendo as cepas

MG e MGO identificadas como *Serratia marcescens*, as cepas B21C, MB e MBO como *Enterobacter hormaechei*.

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As cepas selecionadas foram submetidas a o teste de inibição para comprovação do antagonismo ao patógeno *V. parahaemolyticus*. As cepas gram-negativas B21C, MB e MBO (*E. hormaechei*) e a B21CO (*B. subtilis*) uma gram-positiva comumente usada na aquicultura em probióticos comerciais, diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, e obtiveram os melhores resultados de inibição frente ao patógeno *V. parahaemolyticus* (Tabela 1). As gram-negativas MGO e MG (*S. marcescens*) obtiveram halos de 6 e 5 mm respectivamente, inibindo o mesmo patógeno.

Tabela 1. Diâmetro médio (mm) do halo de inibição das bactérias probióticas frente ao antagonismo do patógeno *Vibrio parahaemolyticus*:

Cepas probióticas	Diâmetro médio dos halos de inibição <i>V. parahaemolyticus</i>
B21CO	10 ^a
B21C	11 ^a
MGO	06 ^b
MBO	12 ^a
MG	05 ^b
MB	11 ^a

* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p > 0,05$). B21CO (*B. subtilis*), MGO e MG (*S. marcescens*.), B21C, MBO e MB (*E. hormaechei*).

3.3 TOLERÂNCIA A PH ÁCIDO E SAIS BILIARES

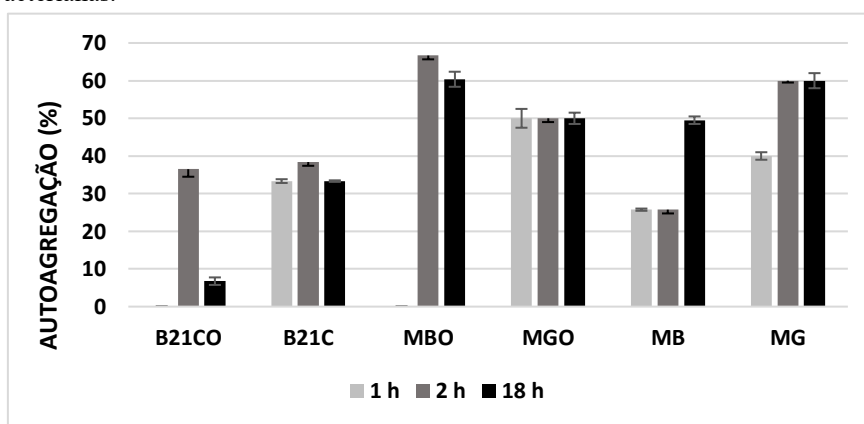
Esse teste consiste em avaliar a capacidade da bactéria em sobreviver às condições do trato gastrointestinal dos peixes. Todas as cepas tiveram resultados satisfatórios diante a análise de resistência ao pH ácido, tendo crescimento em toda superfície da placa de Petri, com isso, impossibilitando a quantificação das cepas, mesmo após diluições seriadas. Diante aos sais biliares, os resultados evidenciaram positivamente todas as cepas, que obtiveram taxa de sobrevivência superior a 50 %, em todos os tempos analisados, o número e/ou crescimento foi tão elevado que foi impossível efetuar a contagem das cepas, com resultados superiores a 9×10^8

UFC.g⁻¹. Com isso, pode-se supor que todas as cepas analisadas são capazes de sobreviver a passagem pelo trato digestório e podem chegar até o intestino do robalo.

3.4 AUTOAGREGAÇÃO

As cepas MBO e B21CO não foram capazes de se autoagregar no período de 1 hora (Figura 1). As cepas MGO e MG obtiveram as maiores taxas de 60 e 40% respectivamente, de autoagregação no período de 1 hora.

Figura 1. Gráfico de barras, referente a capacidade de autoagregação das cepas bacterianas.



* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$). B21CO (*B. subtilis*), MGO e MG (*S. marcescens*), B21C, MBO e MB (*E. hormaechei*).

Após 2 horas as cepas MBO e MG, obtiveram taxas de 66,67 e 60% respectivamente, sendo as que mais autoagregam nesse período, e as cepas B21CO e MB foram as que menos autoagregaram nesse mesmo tempo. Depois das 18 horas mais uma verificação foi feita, e constatou-se que as cepas MG e MBO novamente alcançaram resultados superiores as demais cepas, atingindo as taxas de 60,37 e 60% respectivamente.

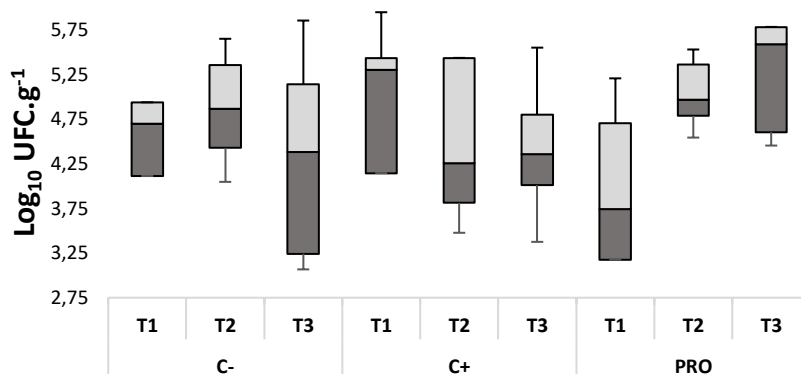
3.5 ESTUDO I

3.5.1 Bactérias e vibrios totais no trato gastrointestinal de *Centropomus parallelus* e na água de cultivo

O número de bactérias totais no intestino dos peixes variou entre 9×10^4 e 9×10^6 UFC/g durante o experimento e não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

A Figura 2, mostra o número de bactérias totais referente ao 07º dia (T1) de suplementação com o probiótico e do 58º (T2 - sete dias após a inoculação do vibrio), e 65º dia (T3 - última coleta).

Figura 2. Boxplot do número totais de bactérias no trato gastrointestinal de robalo-peva (*C. parallelus*) representado em Log_{10} UFC.g⁻¹ de cada tratamento, sete dias após o início da suplementação probiótica T1 (07º dia), e as últimas duas semanas T2 e T3 (58º e 65º dias) após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.

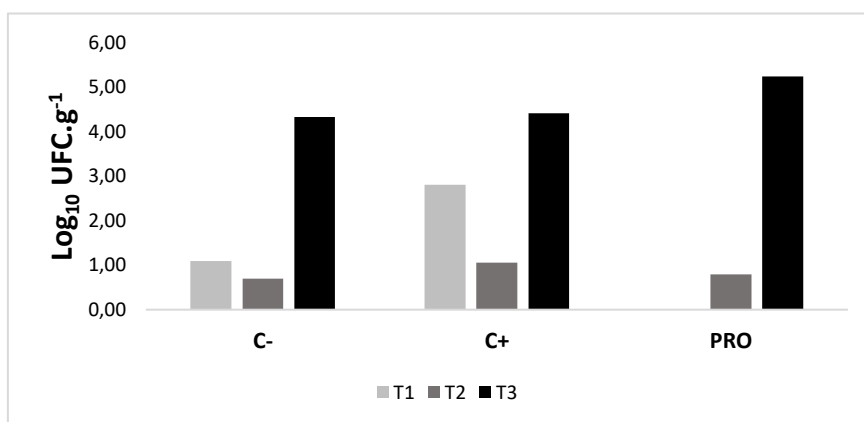


* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).
 Tratamentos: grupo placebo (C-) controle negativo; probiótico comercial (C+) controle positivo; e probiótico multicepa (PRO).
 T1: primeira coleta após 7 dias de suplementação probiótica; T2: sete dias após inoculação do vibrio; e T3: última coleta.

Após observação morfológica, isolamento de cada cepa em cultura pura e realização de provas bioquímicas, foram identificadas as cepas componentes do probiótico experimental (PRO). A colonização observada durante o experimento teve comportamento heterogêneo em relação ao período de adesão das cepas ao intestino. *B. subtilis* (B21CO) e *E. hormaechei* (B21C, MBO e MB) colonizaram o trato gastrointestinal do robalo no 14º dia após o início da suplementação do probiótico multicepa e se manteve estável até o final do experimento. Já a *S. marcescens* (MGO e MG) só colonizaram o trato gastrointestinal após 21 dias de suplementação do probiótico multicepa.

Para os vibrios totais no intestino, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Na coleta do 7º dia (T1) de cultivo, pode-se observar na Figura 3, valores de vibrios totais de 9×10^2 para os tratamentos controle negativo (C-) e positivo (C+).

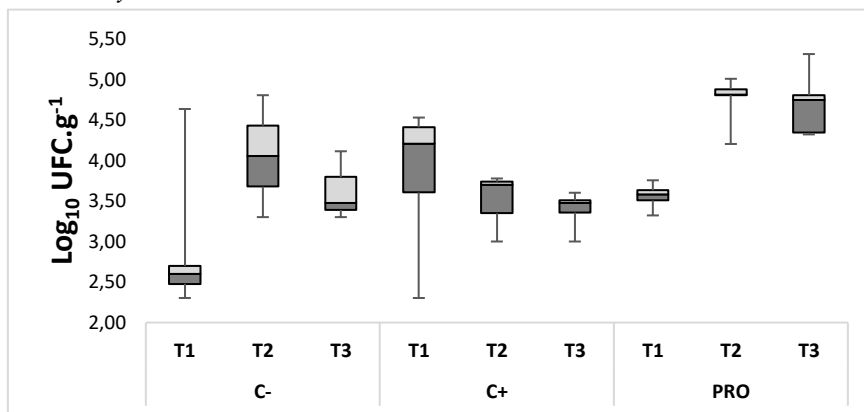
Figura 3. Gráfico em barras evidenciando o quantitativo total de vibrio no trato gastrointestinal de robalo-peva (*C. parallelus*) entre os tratamentos, referentes a primeira coleta T1 (07º dia) e após a inoculação do patógeno T2 e T3 (58º e 65º dia).



* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Tratamentos: grupo placebo (C-) controle negativo; probiótico comercial (C+) controle positivo; e probiótico multicepa (PRO). T1: primeira coleta após 7 dias de suplementação probiótica; T2: sete dias após inoculação do vibrio; e T3: última coleta.

Não houve diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos relacionado ao quantitativo total de bactérias na água.

Figura 4. Boxplot do número totais de bactérias na água de cultivo representado em Log₁₀ UFC.g⁻¹ de cada tratamento, sete dias após o início da suplementação probiótica T1 (07º dia), e as últimas duas semanas T2 e T3 (58º e 65º dia) após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.



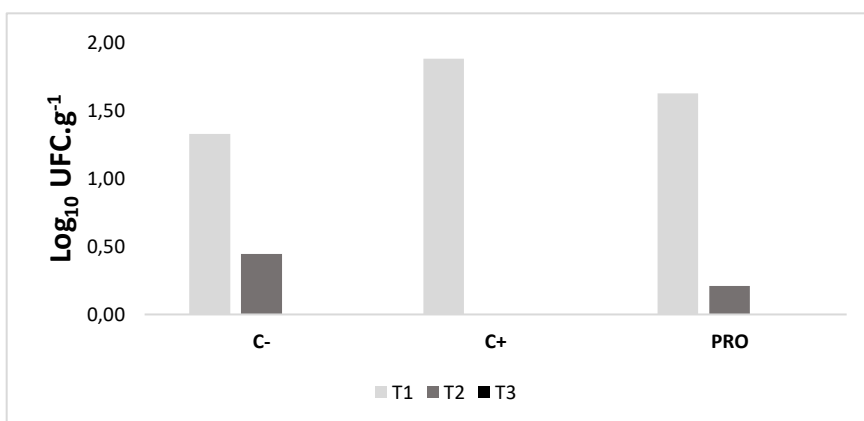
* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Tratamentos: grupo placebo (C-) controle negativo; probiótico comercial (C+) controle positivo; e probiótico multicepa (PRO). T1: primeira coleta após 7 dias de suplementação probiótica; T2: sete dias após inoculação do vibrio; e T3: última coleta.

O quantitativo das cepas manteve-se entre os níveis 9×10^4 e 9×10^5 UFC.g⁻¹ para o probiótico experimental desenvolvido (PRO), os tratamentos controle negativo (C-) e controle positivo (C+) não obtiveram diferenças significativas entre si.

Para o quantitativo de vibrios totais na água, não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Na primeira semana, observou-se valores superiores de vibrios totais

na água de cultivo. Ao passar das semanas, até o fim do experimento, esses valores foram diminuindo até zerarem na última coleta para todos os tratamentos (Figura 5).

Figura 5. Gráfico em barras evidenciando o quantitativo total de vibrio na água de cultivo entre os tratamentos (PRO, C- e C+), referentes a primeira coleta T1 (07º dia) e após a inoculação do patógeno T2 e T3 (58 e 65º dia).



* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$).
 Tratamentos: grupo placebo (C -) controle negativo; probiótico comercial (C +) controle positivo; e probiótico multicepa (PRO).
 T1: primeira coleta após 7 dias de suplementação probiótica; T2: sete dias após inoculação do vibrio; e T3: última coleta.

Os parâmetros de qualidade de água dos tratamentos mantiveram os níveis médios de: amônia ($0,10 \pm 0,1$), nitrito ($1,29 \pm 0,03$), pH ($7,77 \pm 0,02$), salinidade ($7\% \pm 0,0$), temperatura ($22,63^\circ \text{C} \pm 0,01$) e oxigênio dissolvido ($5,1 \text{ mg/L}^{-1} \pm 0,21$). Foram monitorados diariamente e permaneceram em valores próximos entre os tratamentos.

3.6 ESTUDO II

3.6.1 Colonização probiótica gastrointestinal e da água de cultivo

Para os resultados de colonização probiótica, foram quantificados apenas as cepas selecionadas e isoladas do montante total. O total de cepas probióticas encontradas no trato gastrointestinal variou de 9×10^3 a 9×10^6 UFC.g⁻¹ entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de colônias probióticas no trato gastrointestinal de robalo-peva (*C. parallelus*) nos tratamentos representados em Log₁₀ UFC.g⁻¹, referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).

Tratamento	T1 (14 dias de cultivo)	T2 (28 dias de cultivo)
Controle	0 ^c ± 0,00	0 ^b ± 0,00
MBO	4,62 ^a ± 0,66	2,23 ^a ± 1,60
B21CO	2,67 ^b ± 0,43	3,00 ^a ± 0,00
MBO + B21CO	5,22 ^a ± 0,72	3,83 ^a ± 0,83

* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

MBO: *Enterobacter hormaechei*, B21CO: *Bacillus subtilis* e Controle: grupo placebo.

T1: primeira coleta 14 dias após a suplementação probiótica; T2: coleta final, uma semana após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.

Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos com probióticos desenvolvidos. Na primeira coleta (T1) em números absolutos, o grupo multicepa (MBO + B21CO) teve desempenho melhor frente aos outros tratamentos. Ao observar cada cepa separadamente, a cepa MBO (*E. hormaechei*) teve mais sucesso na colonização gastrointestinal do que a cepa comumente utilizada em probióticos comerciais B21CO (*B. subtilis*). Na última coleta (T2), sete dias após a inoculação do patógeno, não houve diferenças significativas entre os tratamentos experimentais ($p < 0,05$). Após a inoculação do vibrio, observou-se uma queda em todos os tratamentos contendo a cepa MBO (*E. hormaechei*), essa possivelmente, foi afetada diretamente após a inserção do patógeno, apesar da eficiência antagônica nos testes *in vitro* ao mesmo, anteriormente descrita. Não foram encontradas colônias probióticas no trato gastrointestinal do tratamento controle.

Nos valores de cepas probióticas contidas na água de cultivo, observou-se que em todos os tratamentos, mantiveram o quantitativo similar entre 9x10³ UFC.g⁻¹ (Tabela 3). Não foi observada diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos de probióticos desenvolvidos nos dois períodos analisados (T1 e T2).

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de colônias probióticas na água de cultivo nos tratamentos representados em Log₁₀ UFC.g⁻¹, referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).

Tratamento	T1 (14 dias de cultivo)	T2 (28 dias de cultivo)
Controle	0 ^b ± 0,00	0 ^b ± 0,00
MBO	2,35 ^a ± 0,28	2,26 ^a ± 0,47
B21CO	2,47 ^a ± 0,08	2,00 ^a ± 0,53
MBO + B21CO	2,57 ^a ± 0,64	2,77 ^a ± 0,05

* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

MBO: *Enterobacter hormaechei*, B21CO: *Bacillus subtilis* e Controle: grupo placebo.

T1: primeira coleta 14 dias após a suplementação probiótica; T2: coleta final, uma semana após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.

Os tratamentos experimentais com cepas solitárias (MBO e B21CO) desenvolvidas apresentaram redução do quantitativo de colônias probióticas na água de cultivo após o segundo período (T2). O tratamento multicepa (MBO + B21CO) apresentou aumento posterior a inoculação do patógeno. Não foram encontradas colônias probióticas na água de cultivo do tratamento controle.

3.6.2 Víbrios totais no trato gastrointestinal e na água de cultivo

Os víbrios totais contidos no trato gastrointestinal foram coletados e quantificados, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos experimentais nos dois períodos de coleta em comparação ao tratamento controle (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de víbrios totais contidos no trato gastrointestinal nos tratamentos, representados em $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).

Tratamento	T1 (14 dias de cultivo)	T2 (28 dias de cultivo)
Controle	$2,36^a \pm 0,47$	$3,47^a \pm 0,34$
MBO	$0,14^b \pm 0,43$	$1,23^b \pm 1,18$
B21CO	$0,17^b \pm 0,41$	$1,62^b \pm 1,30$
MBO + B21CO	$0,51^b \pm 0,80$	$1,24^b \pm 1,28$

* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

MBO: *Enterobacter hormaechei*, B21CO: *Bacillus subtilis* e Controle: grupo placebo.

T1: primeira coleta 14 dias após a suplementação probiótica; T2: coleta final, uma semana após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.

Em todos os tratamentos antes da inoculação do vibrio pode-se observar um quantitativo de víbrios endógenos oportunistas. Os tratamentos de probióticos desenvolvidos tiveram valores aproximados quando comparados ao grupo controle. Com isso, fica evidente a eficiência de ambas as cepas, tanto no controle de víbrios totais, quanto aos pós inoculados, obtendo uma infecção do vibrio mais branda, quando comparado ao tratamento placebo.

Os víbrios totais na água de cultivo foram quantificados, e na primeira coleta não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), já na última coleta, os tratamentos com probióticos desenvolvidos diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) do tratamento placebo (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão de vibrios totais na água de cultivo nos tratamentos representados em Log₁₀ UFC.g⁻¹, referente ao 14º dia (T1) e no 28º dia (T2).

Tratamento	T1 (14 dias de cultivo)	T2 (28 dias de cultivo)
Controle	1,86 ^a ± 1,26	2,97 ^a ± 0,77
MBO	1,22 ^a ± 0,80	1,80 ^b ± 0,57
B21CO	0,74 ^a ± 0,90	1,68 ^b ± 0,81
MBO + B21CO	1,40 ^a ± 0,87	1,32 ^b ± 0,88

* Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de tukey ($p < 0,05$). Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

MBO: *Enterobacter hormaechei*, B21CO: *Bacillus subtilis* e Controle: grupo placebo.

T1: primeira coleta 14 dias após a suplementação probiótica; T2: coleta final, uma semana após a inoculação do patógeno *V. parahaemolyticus*.

No primeiro tempo (T1) a suplementação probiótica dos tratamentos desenvolvidos não foi suficiente estatisticamente para o controle dos vibrios totais, mas quando observamos o momento pós inserção do vibrio (T2) nos robalos, os tratamentos de probióticos desenvolvidos tiveram eficácia significativa ($p < 0,05$) na redução de vibrios totais quando comparados ao tratamento placebo.

Os parâmetros de qualidade de água dos tratamentos mantiveram os níveis médios de: amônia ($0,12 \pm 0,2$), nitrito ($1,20 \pm 0,12$), pH ($7,61 \pm 0,01$), salinidade ($7 \% \pm 0,0$), temperatura ($23,10^\circ \text{C} \pm 0,22$) e oxigênio dissolvido ($5,3 \text{ mg/L}^{-1} \pm 0,12$). Foram monitorados diariamente e permaneceram em valores próximos entre os tratamentos.

4 DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* de antagonismo diante de patógenos, fundamentado na competição por nutrientes e na produção de compostos inibitórios, são premissas cruciais para a seleção de uma potencial cepa probiótica (GILDBERG et al., 1995; HUYS et al., 2001). Nesse estudo podemos observar um antagonismo interessante da cepa *B. subtilis* diante do *V. parahaemolyticus*, o mesmo obteve um diâmetro expressivo na inibição do patógeno. O gênero *Bacillus* são amplamente relatados na literatura pela sua produção de compostos antimicrobianos que incluem peptídeos e antibióticos lipopeptídicos, bacteriocinas e inibidores semelhantes (STEIN, 2005; ABRIQUEL et al., 2011; SUMI et al., 2015). A gram-negativa *E. hormaechei* é relativamente nova nas pesquisas com suplementação probiótica. Um estudo *in vitro* liderado por Gosh et al., (2011), demonstrou capacidade inibitória frente a *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio corallilyticus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae* e *Vibrio metschnikovii*, e no presente estudo, pode-se observar a eficiência na inibição de crescimento do *Vibrio parahaemolyticus*. Diante disso, podemos afirmar que a gram-negativa *E. hormaechei* tem grande potencial

combativo *in vitro* ao gênero *Vibrio*, que é um dos principais causadores de enfermidades nos empreendimentos aquícolas.

Para a seleção de uma cepa bacteriana como potencial probiótico, é fundamental que ela sobreviva os trânsitos da alimentação, até atingir o intestino do animal. Partindo desse pressuposto, diversos autores selecionam bactérias autóctones para elaboração de possíveis probióticos (COSTA et al., 2013; GHANEI-MOTLAGH et al., 2019; KAKTCHAM et al., 2017; LINH, SAKAI & TAOKA, 2017). Nesse estudo, ambas as cepas tiveram sobrevivência superior a 50 % quando testadas nos sais biliares, e o pH ácido não inibiu o crescimento das cepas, pelo contrário, tiveram um crescimento exacerbado impossibilitando a contagem. Assim, pode-se afirmar que as bactérias têm potencial probiótico, por suportarem as adversidades do trato digestório, e dessa maneira, poder atingir o intestino do animal.

A autoagregação é uma forma indireta de determinar a capacidade de aderência das bactérias (COLLADO, MERILUOTO & SALMINEN, 2008). As bactérias responsáveis pela agregação formam um precipitado e, portanto, produzem uma solução superior límpida em comparação com as cepas não agregadoras que produzem uma suspensão turva (BALAKRISHNA & KUMAR, 2012). No presente estudo foi observada capacidade positiva de autoagregação em todas as cepas analisadas, sendo o período de 2 horas o de maior sucesso entre os tempos examinados. A cepa *Serratia sp.* (MGO e MG), foram as que tiveram melhor taxa de autoagregação, de acordo com Clements et al. (2019), o gênero *Serratia sp.* são uma fonte predominantemente inexplorada de metabólitos secundários antimicrobianos, produtora de compostos biossurfactantes, esses compostos tem alta capacidade de emulsificação que pode ser interessante para o hospedeiro, mas ainda deve ser estudada mais profundamente.

Probióticos, muitas vezes referidos como promotores da vida, são os suplementos microbianos vivos que melhoram o equilíbrio da flora intestinal e conferem benefícios à saúde, melhorando naturalmente o estado geral de saúde do hospedeiro (FULLER 1989; GISMONDO et al., 1999; FAO & WHO, 2002). As espécies de *Bacillus* frequentemente exercem efeitos sinérgicos sobre a microbiota intestinal nativa do hospedeiro. Como outras espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* também promove e ajuda a estabelecer outra microbiota benéfica como bactérias de ácido láctico (BAL) no trato gastrointestinal do hospedeiro (HOA et al., 2000). Sendo um anaeróbio facultativo, ele utiliza o oxigênio livre no intestino do hospedeiro rapidamente, favorecendo o crescimento de outras bactérias (HOA et al., 2000; KAUR et al., 2002; DENG et al. 2013). Jesus et al. (2016), suplementaram *B. subtilis* em ração extrusada (45 % PB) para juvenis de robalo-peva e após 30 dias observaram que além da colonização de sucesso, o número da microbiota em geral (gram-positiva e gram-negativa) foi elevado de forma

significativa, esse resultado não pode ser afirmado no primeiro estudo (experimento 1), apesar de ocorrer um ligeiro aumento na microbiota total intestinal, a mesma não é significativa entre os tratamentos. Segundo Souza et al. (2010), que trabalharam com suplementação probiótica de bactérias do ácido láctico (*Lactococcus sp.* e *Lactobacillus plantarum*) para robalo-peva (*Centropomus parallelus*) observaram que esse aditivo adicionado a alimentação, reduziu significativamente o quantitativo de *Vibrio spp.* no trato intestinal do animal quando comparados com o tratamento placebo, isso corrobora com o resultado observado no presente estudo.

A *E. hormaechei* é uma espécie gram-negativa pouco relatada como probiótico na aquicultura. Os estudos comumente encontrados na literatura, mostram a cepa *E. hormaechei* como patógeno causador de enfermidades em humanos (DING et al., 2021; JIMÉNEZ-CASTILLO et al., 2021) e resistente a atividades antimicrobianas (KHODOR et al., 2021; SEKYERE & RETA, 2021). Nesse estudo a *E. hormaechei* (MBO) foi capaz de controlar e reduzir significativamente o número de vibrios totais no intestino de robalo-peva tanto na primeira coleta (T1) quanto na coleta final (T2), e na água de cultivo observou-se uma redução significativa apenas na coleta final (T2), quando comparados ao tratamento controle em ambos testes. Monowar et al. (2021) afirmam que *E. hormaechei* é produtora de AgNPs (nanopartículas de prata) com atividade antimicrobiana significativa contra *B. cereus* patogênico (ATCC 10876), *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 11632) e *C. albicans* (ATCC 10231) em comparação com antibióticos convencionais.

O bem-estar e o crescimento de qualquer organismo dependem diretamente de seu ambiente (HURA et al., 2018). A condição ótima e o estado físico-químico da água de criação é uma preocupação essencial na aquicultura e a maioria das infecções pode ser resultado da má qualidade da água (ZOKAEIFAR et al., 2014). Bactérias gram-positivas do gênero *Bacillus* foram correlacionadas não apenas com a melhoria da qualidade de água, mas também com o declínio na população de patógeno no ambiente de cultivo, a taxa melhorada de sobrevivência e crescimento e as melhores condições de bem-estar dos juvenis de Camarão-tigre-gigante – *Penaeus monodon* – (NGAN & PHU 2011). No presente experimento as cepas estudadas *B. subtilis* e *E. hormaechei* foram capazes de reduzir o quantitativo de *Vibrio spp.* no ambiente de cultivo, quando comparados ao tratamento controle. Enzimas extracelulares e peptídeos antimicrobianos produzidos por espécies de *Bacillus* não apenas controlam bactérias patogênicas, mas também melhoram a qualidade da água de criação (XU et al., 2013; NAVINCHANDRAN et al., 2014; NIMRAT et al., 2012; OCHOA-SOLANO & OLMOS-SOTO, 2006).

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foi possível definir que as cepas *E. hormaechei*, *B. subtilis* e *S. marcenses* tem grande potencial no antagonismo *in vitro* frente ao patógeno *V. parahaemolyticus*, bem como, sobreviver as condições do trato gastrointestinal e colonizar o intestino de robalo-peva (*C. parallelus*) em 14 dias para as cepas *E. hormaechei* e *B. subtilis* e 21 dias para a cepa *S. marcenses*. Todas as cepas são capazes de se autoagregar sendo a *S. marcenses* a com melhor taxa testada nesse experimento. Nos testes *in vivo* as cepas *B. subtilis* e *E. hormaechei* foram capazes de reduzir significativamente os *Vibrio spp.* no intestino e na água de cultivo. Sendo assim, para entendimento dos mecanismos de ação das cepas, deve ser feito outros estudos com metodologias específicas, a fim de compreender a dinâmica de atuação no organismo.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-ARPANAHI D.; SOLTANI E.; JAFARYAN H.; SOLTANI M.; NADERI-SAMANI M.; CAMPA-CORDOVA A.I. Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunophysiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**. 496:43–49, 2018. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aquaculture.2018.06.082>
- ABRIOUEL H.; FRANZ C.M.A.P.; OMAR N.B.; GÁLVEZ A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiol. Rev.** 35:201–232, 2011. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- AZEVEDO R.V.D.; FOSSE FILHO J.C.; CARDOSO L.D.; MATTOS D.D.C.; JUNIOR V.; VAZQUEZ M.; ANDRADE D.R.D. Economic evaluation of prebiotics, probiotics and synbiotics in juvenile Nile tilapia. **Rev. Ciênc. Agron.** 46(1):72–79, 2015.
- BALAKRISHNA A.; KUMAR N.A. Preliminary studies on siderophore production and probiotic effect of bacteria associated with the Guppy, *Poecilia reticulata* Peters, 1859. **Asian Fish Sci.** 25:193–205, 2012. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2012.25.2.008>
- BALCAZAR J.L.; BLAS I.D.; RUIZ I.Z.; CUNNINGHAM D.; VENDRELL D.; MUZQUIZ J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Vet. Microbiol.** 114:173–186, 2006. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2ª ed. Santa Maria: **Ed. da Universidade Federal de Santa Maria**. 608p., 2010.
- BURUIANĂ C.T.; PROFIR A.G.; VIZIREANU C. Effects of probiotic *Bacillus* species in aquaculture—an overview. **Ann. University Dunarea De. Jos.** 38:9–17, 2014.
- CAMARGO J.A.; ALONSO Á. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. **Environ. Int.** 32:831–849, 2006. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.envint.2006.05.002>

CASCALES D.; GUIJARRO J.A.; REIMUNDO P.; GARCIA-TORRICO A.I.; MENDEZ J. Genome sequence of the fish pathogen *Yersinia ruckeri* strain 150, isolated from diseased rainbow trout. **Genome Announc**, 2016. [https://doi-](https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1128/genomeA.01331-16)

[org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1128/genomeA.01331-16](https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1128/genomeA.01331-16)

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Ver. Bras. Reprod. Anim.** 6:64-69, 2009.

CERQUEIRA, V.R. Cultivo de Robalo-peva (*Centropomus parallelus*), p. 489-520, in BALDISSEROTTO, B. & GOMES, L.C. (eds.), Espécies Nativas para piscicultura no Brasil. 2ª.ed. **Ed. da Universidade Federal de Santa Maria**, 608 p., 2010.

CHAUHAN, A.; SINGH, R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. **Symbiosis**. 77:99–113, 2019. [https://doi-](https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13199-018-0580-1)

[org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13199-018-0580-1](https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13199-018-0580-1)

CLEMENTS, T.; NDLOVU, T.; KHAN, W. Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. **Microbiological Research**, 229, 2019.

COLLADO M.C.; MERILUOTO J.; SALMINEN S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **Eur. Food Res. Technol.** 226:1065–1073, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>

COSTA, H.H.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L. B.; CUNHA, A. F.; RESENDE, M. F.; NUNES, A. C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 65:1858-1866, 2013.

DENG J.; LI Y.; ZHANG J.; YANG Q. Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. **Research in Veterinary Science**, 94:62–68, 2013.

DING, M.; SHI, J.; DIN, A.U.; LIU, Y.; ZHANG, F.; YAN, X.; LI, Q.; BAI, J.; CHEN, W.; ZHOU, Y. Co-infections of two carbapenemase-producing *Enterobacter hormaechei* clinical strains isolated from the same diabetes individual in China. **J. Of Med. Micro.** 70 (3), 2021. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001316>.

EISSA N.; WANG H.P.; YAO H.; ABOU-ELGHEIT E. Mixed *Bacillus* species enhance the innate immune response and stress tolerance in yellow perch subjected to hypoxia and air-exposure stress. **Sci. Rep.** 8, 2018. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1038/s41598-018-25269z>

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

FAO & WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probióticos in Food**. United Nations / Food and Agriculture Organization / World Health Organization, Londres, Ontário, 2002

FULLER R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. 66:365– 378, 1989.

GHANEI-MOTLAGH, R.; MOHAMMADIAN, T.; GHARIBI, D.; MENANTEAU-LEDOUBLE, S.; MAHMOUDI, E.; KHOSRAVI, M.; ZAREA, M.; EL-MATBOULI, M. Quorum Quenching Properties and Probiotic Potentials of Intestinal Associated Bacteria in Asian Sea Bass *Lates calcarifer*. **Marine Drugs**. 18(1):1-25, 2019.

GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; BØGWALD, J. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**. 138, 23–34, 1995.

GISMONDO M.R.; DRAGO L.; LOMBARDI A. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 12(4):287-292, 1999.

GHOSH S.; RINGØ E.; DEBORAH G.S.A.; MUJEEB RAHIMAN K.M.; HATHA A.A.M. *Enterobacter hormaechei* BAC 1010 from the gut of flathead grey mullet as probable aquaculture probiont. **Journal of Nat. Sci. and Sust. Tec.** 5(3):189-199, 2011.

GRZESKOWIAK, L.; COLLADO, M.; SALMINEN, S. Evaluation of aggregation abilities between commensal fish bacteria and pathogens. **Aquaculture**. v. 356-357, 2012.

HAI, N.V. The use of probiotics in aquaculture. **Journ. Of Appl. Microb.** 119(4):917-935, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12886>.

HOA, N. T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P. H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, A. S. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and environmental microbiology**, 66(12), 5241–5247, 2000.

<https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5241-5247.2000>

HURA M.U.D.; ZAFAR T.; BORANA K.; PRASAD J.R.; IQBAL J. Effect of commercial probiotic *Bacillus megaterium* on water quality in composite culture of major carps. **Int. J. Curr. Agric. Sci.** 8:268-273, 2018.

HUYS, L.; DHERT, P.; ROBLES, R.; OLLEVIER, F.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Search for beneficial strains or turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. **Aquaculture**, Amsterdam, 193: 25–37, 2001.

JAMES, G.; DAS, B.C.; JOSE, S.; V.J, R.K. *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. **Aquaculture International**. 29(1):323-353, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-020-00630-0>.

JESUS, E.C.; ARPINI, C.M.; MARTINS, J.D.L.; SILVA, C.B.B.; CASTHELOGE, V.D.; CLEMENTE-CARVALHO, R.B.G.; GOMES, L.C. Isolation and evaluation of autochthonous *Bacillus subtilis* strains as probiotics for fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). **Journal Of Applied Ichthyology**, 32-4, 682-686, 2016.

JIMÉNEZ-CASTILLO, R.A.; AGUILAR-RIVERA, L.R.; CARRIZALES-SEPØLVEDA, E.F.; GÓMEZ-QUIROZ, R.A.; LLANTADA-LÓPEZ, A.R.; GONZÁLEZ-AGUIRRE, J.E.; NÁÑEZ-TERREROS, H.; RENDÓN-RAMÍREZ, E.J. A case of round pneumonia due to *Enterobacter hormaechei*: the need for a standardized diagnosis and treatment approach in adults. **Rev. do Inst. de Med. Trop. de SP.**, 63, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946202163003>.

KAKTCHAM, P.M.; TENGOUA, J.B; ZAMBOU, F.N.; RUIZ, G.D.; WACHER, C.; CHABELA, M.L.P. Quantitative analyses of the bacterial microbiota of rearing environment, tilapia and common carp cultured in earthen ponds and inhibitory activity of its lactic acid bacteria on fish spoilage and pathogenic bacteria. **World Jour. of Micr. and Biot.**, 33:2-7, 2017.

KAUR I.P.; CHOPRA K.; SAINI A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 15:1–9, 2002.

KAVITHA M.; RAJA M.; PERUMAL P. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus spp.* isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). **Aquac. Rep.** 11:59–69, 2018. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aqrep.2018.07.001>

KHODOR, R.; SALLOUM, T.; JISR, T.E.; CHAAR, M.E.; TOKAJIAN, S. Detection and genomic characterization of mcr-9 in *Enterobacter hormaechei* recovered from a pediatric patient in Lebanon. **Inf., Gen. and Evo.** 94, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105014>.

LIEBL, F.; AMARAL JR.H.; GARCIA, S.; SOUTO, L.I.M.; CARVALHO, C.V.A.; CERQUEIRA, V.R. Desempenho de juvenis de robalo-flecha e robalo-peva submetidos a diferentes densidades de estocagem em água doce. **Bol. Inst. Pesca.** 42(1):145-155, 2016.

LINH, N.T.; SAKAI, K.; TAOKA, Y. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented food as potential probiotics for aquacultured carp and amberjack. **Fisheries Science**, 84, 101-111, 2017.

MEHRABI F.; KHALESİ M.; HAZAİE K. Effects of pre-and probiotics on growth, survival, body composition, and hematology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry from the Caspian Sea. **Turk J. Fish Aquat. Sci.** 18(4):597–602, 2018.

MONOWAR, T.; RAHMAN, M.S.; BHOORE, S.J.; SATHASIVAM, K.V. Endophytic bacteria *Enterobacter hormaechei* fabricated silver nanoparticles and their antimicrobial activity. **Pharmaceutics**. 8;13(4):511, 2021.

MUNOZ-ATIENZAL E.; GOMEZ-SALA B.; ARAUJO C.; CAMPANEROL C.; DEL CAMPO R.; HERNANDEZ P.E.; HERRANZ C.; CINTAS L.M. Antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. **BMC Microbiol.** 13(1):15, 2013.

NAVINCHANDRAN M.; IYAPPARAJ P.; MOOVENDHAN S.; RAMASUBBURAYAN R.; PRAKASH S.; IMMANUEL G.; PALAVESAM A. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** 36:38-45, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.004>

NAYAK S.K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish Shellfish Immun.** 29:2–14, 2010. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fsi.2010.02.017>

NGAN P.T.T.; PHU T.Q. Effects of *Bacillus* bacteria (B8, B37, B38) on water quality of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured tanks. **Proceedings of the 4th aquaculture.** 28-41, 2011.

NIMRAT S.; SUKSAWAT S.; BOONTHAI T.; VUTHIPHANDCHAI V. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Vet Microbiol.** 159:443–450, 2012. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>

OCHOA-SOLANO J.; OLMOS-SOTO J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiol.** 23:519-525, 2006. 10.1016/j.fm.2005.10.004

PATRA A.; SARKER S.; BANERJEE S.; ADIKESAVALU H.; BISWAS D.; ABRAHAM T.J. Rapid detection of *Flavobacterium columnare* infection in fish by species-specific polymerase chain reaction. **J. Aquac. Res. Dev.** 7:1–4, 2016.

PINHO, S.M.; BROL, J.; ALMEIDA, E.J.; MELLO, G.L.; JERÔNIMO, G.T.; EMERCIANO, G.C. Effect of stocking density and vertical substrate addition on growth performance and health status of fat snook *Centropomus parallelus*. **Aquaculture**, 457:73-78, 2016.

RAMESH D.; SOUISSI S. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* KADR1 and its subcellular components on immune responses and disease resistance in *Labeo rohita*. **Aquac. Res.** 49:367–377, 2018. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1111/are.13467>

RONNESETH A.; CASTILLO D.; D'ALVISE P.; TONNESEN O.; HAUGLAND G.; GROTKJAR T.; ENGELL-SØRENSEN K.; NORREMARK L.; BERGH O.; WERGELAND H.I.; GRAM L. Comparative assessment of vibrio virulence in marine fish larvae. **J. Fish Dis.** 40(10):1373–1385, 2017.

SANSAWAT, A.; THIRABUNYANON, M. Anti-*Aeromonas hydrophila* activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. **Maejo International Journal of Science and Technology**. 3:77-87, 2009.

SEKYERE, J.O.; RETA, M.A. Global evolutionary epidemiology and resistome dynamics of *Citrobacter* species, *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella variicola*, and *Proteaceae* clones. **Environmental Microbiology**, 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.15387>.

SHAHEEN A.A.; EISSA N.; ABOU-EL-GHEIT E.N.; YAO H.; WANG H.P. Probiotic effect on molecular antioxidant profiles in yellow perch, *Perca flavescens*. **Glob. J. Fish Aquac. Res.** 1:16–29, 2014.

SOUZA, R.M.; MOURIÑO, J.L.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE, C.C.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. Selection of potential probiotic bacteria to use in fat

snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) culture. **Boletim do Instituto de Pesca**, 36(1):17-24, 2010.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Mol. Microbiol.** 56:845 – 857, 2005.

SUMI, C.D.; YANG, B.W.; YEO, I.-C.; HAHM, Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. **Can. J. Microbiol.** 61:93–103, 2015.

WIKLUND T. *Pseudomonas anguilliseptica* infection as a threat to wild and farmed fish in the Baltic Sea. **Microbiol. Aust.** 37(3):135–136, 2016.

XU D.; WANG Y.; SUN L.; LIU H.; LI J. Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp, **Food Control**, 30:58-61, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.025>

YANBO W.; ZIRONG X. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Anim. Feed sci.** 127:283–292, 2006. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003>

YI Y.; ZHANG Z.; ZHAO F.; LIU H.; YU L.; ZHA J.; WANG G. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. **Fish Shellfish Immunol.** 78:322–330, 2018. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fsi.2018.04.055>

ZOKAEIFAR H.; BABAEI N.; SAAD C.R.; KAMARUDIN M.S.; SIJAM K.; BALCAZAR J.L. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 36:68–74, 2014. <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.fsi.2013.10.007>