

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS TOLEDO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

LUISA FRANCISCO SAGGIN

**ESTUDO DA PRODUÇÃO PROBIÓTICA DE ESPÉCIES DO GENÊRO *Bacillus*, EM
PACUS (*Piaractus mesopotamicus*)**

TOLEDO

2021

LUISA FRANCISCO SAGGIN

**ESTUDO DA PRODUÇÃO PROBIÓTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bacillus* EM
PACUS (*Piaractus mesopotamicus*)**

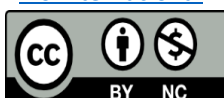
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito para a obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso

TOLEDO

2021

[4.0 Internacional](#)



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

LUISA FRANCISCO SAGGIN

**ESTUDO DA PRODUÇÃO PROBIÓTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bacillus* EM
PACUS (*Piaractus Mesopotamicus*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso

16 de Dezembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Priscila Vaz de Arruda
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Geni e Olívio, aos quais sou grata por todo apoio, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo durante essa caminhada longa da faculdade, especialmente os momentos de dificuldade onde as dependências e a falta de amadurecimento bateram na porta e aumentaram um pouco mais o fim dessa etapa.

Acrescento a esses agradecimentos, a todos os professores do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, nos quais eu acompanhei de perto desde o primeiro dia de aula do curso no ano de 2015, todos os desafios e batalhas para manter a qualidade do ensino e a cada vez mais melhorá-lo. Espero que o curso se consolide ainda mais e cresça conforme sua magnitude, assim bem como que todos os professores sejam cada vez mais abraçados e levem a diante todos os conceitos do curso, para muitos estudantes que o escolherem como profissão.

Somo a minha gratidão, ao meu orientador, Prof. Dr. Cleverson Busso, por estar presente ao meu lado ao longo da graduação, com muito conhecimento e didáticas excelentes e por todas as orientações durante esse percurso, com muito apoio, paciência e confiança, tendo em vista o momento pandêmico em que vivemos.

“No Brasil, manter a esperança viva em si, é um ato revolucionário”

-Paulo freire.

RESUMO

O peixe *Piaractus mesopotamicus*, conhecido popularmente como “Pacu”, tem sido uma das alternativas para a piscicultura brasileira devido a sua rusticidade, rápido crescimento e carne de boa qualidade. Todavia, com o avanço da piscicultura extensiva, devido as práticas de manejo não científico como, uso de medicamentos de forma não regulada, altas densidades de estoque e técnicas de pesca destrutivas, a probabilidade de aumento do desenvolvimento de doenças nas indústrias de aquicultura, tem sido cada vez mais presentes, tornando os animais suscetíveis a uma variedade de doenças letais ocasionadas por agentes que podem ter origens bacterianas, fúngicas, virais ou parasitárias. Outra situação alarmante que é originada dessas decorrências é o extensivo uso de antibióticos em busca de conter e prevenir surtos epidemiológicos, nos quais acabam por criar uma pressão seletiva para o surgimento de bactérias resistentes a esses medicamentos. Visando mitigar os efeitos gerados, os probióticos, que são compostos de origem bacteriana extraídos dos tratos gastrointestinais dos próprios hospedeiros, abriram uma janela de soluções, por serem capazes de atuar de forma eficiente em uma ampla gama de atuações, partindo-se em relação a imunidade do peixe, até a qualidade da água dos viveiros. Nos últimos anos, um grande número de bactérias tem sido relatadas como potenciais candidatos probióticos em setores da piscicultura, em que as espécies do gênero *Bacillus*, vem ganhando uma atenção especial devido a sua atividade protetiva e ótima adaptabilidade. Observados os aspectos citados, nesta revisão, buscou-se resumir os recentes avanços na pesquisa de probióticos na piscicultura e seu impacto na saúde dos peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus*, além de suscitar as problemáticas da piscicultura extensiva.

Palavras chave: Probióticos, piscicultura, microrganismos.

ABSTRACT

Piaractus mesopotamicus fish, popularly known as “Pacu”, has been one of the alternatives for Brazilian fish farming due to its rusticity, fast growth, and good quality meat. However, with the advancement of extensive fish farming, due to unscientific management practices such as unregulated drug use, high stock densities, and destructive fishing techniques, the likelihood of increased development of diseases in aquaculture industries has been increasingly present, making animals susceptible to a variety of lethal diseases caused by agents that may have bacterial, fungal, viral, or parasitic origins. Another alarming situation that arises from these events is the extensive use of antibiotics in order to contain and prevent epidemiological outbreaks, which end up creating selective pressure for the emergence of bacteria resistant to these drugs. Aiming to mitigate the effects generated, probiotics, which are compounds of bacterial origin extracted from the gastrointestinal tracts of the hosts themselves, have opened a window of solutions, since they are able to act efficiently in a wide range of actions, breaking down in relation to immunity of the fish, to the quality of the water in the nurseries. In recent years, many bacteria have been reported as potential probiotic candidates in fish farming sectors, in which the *Bacillus* species has been gaining special attention due to its protective activity and excellent adaptability. Having observed the aspects mentioned, this review sought to summarize recent advances in the research of probiotics in aquaculture and their impact on the health of fish of the species *Piaractus mesopotamicus*, in addition to raising the problems of extensive fish farming.

Keywords: Probiotics, pisciculture, micro-organisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas de administração de um probiótico na rotina da piscicultura	14
Figura 2: Representação ilustrativa do <i>Piaractus mesopotamicus</i>	15
Figura 3: Estrutura de um esporo bacteriano.....	17
Figura 4: Procedimento de seleção para a definição de um possível probiótico.....	19
Figura 5: Exemplificações de resultados de plaqueamento para identificar Atividades Hemolíticas em bactérias.....	21
Figura 6: Exemplo de teste com difusão em disco em placa de petri, contendo antimicrobianos ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina e evancomicina.....	23
Figura 7: Modo de Ação dos probióticos	33
Figura 8: Método de Extrusão	43

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Definição de Probióticos	13
3.2. Caracterização da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i>	15
3.3. Caracterização do <i>Bacillus sp.</i>	17
3.4. Seleção de critérios para a escolha do probiótico	19
3.4.1. Não patogenicidade	20
3.4.2. Ausência de genes de resistência	21
3.4.3. Tolerância ao pH e aos sais de bile	24
3.4.4. Capacidade Antagônica	24
3.4.5. Produção extracelular de enzimas	26
3.4.6. Natureza indígena	28
3.5. Probióticos bacterianos e as doenças ligadas aos peixes	30
3.6. Antibióticos e seu uso em excesso na aquicultura	32
3.7. Modo de ação dos probióticos	33
3.7.1. Atividade antagônica ou inibição de compostos	34
3.7.2. Produção de enzimas	35
3.7.3. Competição para colonizar a superfície da mucosa	35
3.7.4. Modulação imunológica	36
3.7.5. Competição pela absorção de ferro	39
3.8. Probióticos e sua influência na qualidade da água	40
3.9. Probióticos e as tecnologias de encapsulação	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A cada ano o consumo de pescados no mundo tem aumentado de forma significativa, sendo o setor de aquicultura responsável por produzir maior parte dos alimentos. Em 2018 foram produzidos cerca de 178,9 milhões de toneladas de pescados, sem discriminação por tipos de cultivos, sendo que desse valor, 82 milhões representam a parte dos peixes comestíveis. Anualmente as taxas de produtividade, se ampliam dentro de 5,4% dos resultados dos anos anteriores, o que corresponde a uma taxa considerada alta e bastante expressiva, demonstrando a ampliação da busca do consumidor pelos produtos e com isso exigindo uma produção mais ampliada (FAO/OMS, 2018).

Considerando o aumento do consumo do pescado, o setor produtivo tem priorizado expandir a eficiência da produção, aumentando sua intensidade através de pesquisas e com isso abrindo novas perspectivas de avanços tecnológicos. Uma das alternativas encontradas para se otimizar a produção de pescados, vem do uso de probióticos acrescidos nas rações, visto que a suplementação corresponde a um custo de 40 a 60% da mesma (WEBSTER e LIM, 2002). Somados a isso para que esses valores sejam reduzidos substancialmente, deve-se construir uma boa dieta que forneça nutrientes essenciais para apoiar o crescimento e desenvolvimento do organismo cultivado (GATLIN, 2002).

O emprego dos probióticos traz avanços na piscicultura, por englobarem as necessidades das cadeias produtivas de forma ampla e objetiva, pois são aditivos alimentares à base de microrganismos vivos que contribuem para o equilíbrio da flora intestinal, gerando efeitos benéficos, dentre os quais, podem-se se citar a competição por substrato e nutrientes, resistência à colonização de bactérias patogênicas; produção de compostos antagonistas aos patógenos; aumento da resposta imune e resistência às doenças. Além disso são reportados, melhorias na digestibilidade; da conversão alimentar; da taxa de eficiência proteica e do desempenho produtivo (OSHIRO, 2015, apud RINGO e GATESOUBE, 1998; VERSCHUERE *et al.*, 2000; BALCÁZAR *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2008; KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008, BAGHERI *et al.* 2008, MERRIFIELD *et al.* 2010). De acordo com a literatura, possui um papel importante em auxiliar na substituição de antibióticos quimicamente oriundos, devido ao fato desses compostos apresentarem ampliação de resistências nos mais diversos patógenos e a manutenção de suas estruturas químicas no produto final, ocasionando uma troca de genes resistentes ao consumidor humano (SMITH, 2008 e ROMERO, 2012). Somados ao denotado, questão ambiental também pode ser acrescida, tendo em vista a contaminação dos efluentes conectados a produção (KENNEDY *et al.*, 1998; MORIARTY, 1998).

Um dos peixes em que a busca por adesão de probióticos em sua dieta tem despertado interesse é o Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, nos quais os estudos referentes a essa espécie têm se focado nos últimos anos, entorno das características da palatabilidade da carne, tendo em vista o seu sabor diferenciado e a maciez. Além disso, há os fatores produtivos, onde caracteriza-se como um peixe rústico de boa adaptação a viveiros, apresentando um crescimento com taxas consideráveis e um dos fatores de maior importância, a boa adaptabilidade ao consumo de alimentações artificiais (CASTAGNOLI e CYRINO, 1986).

Com relação aos microrganismos no qual são mais utilizados como probióticos na aquicultura, suas derivações advêm de bactérias dos gêneros *Lactobacillus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, embora outros gêneros ou espécies também tenham sido mencionados (VERSCHUERE et al., 2000). A espécie do gênero *Bacillus* no qual será focado os estudos, tem como característica agir positivamente na sobrevivência e no crescimento dos organismos cultivados, estimulando o sistema digestivo, com isso melhorando a absorção do probiótico, e associado a isso o sistema imunológico do animal, também apresenta respostas mais rápidas em seus mecanismos de defesa (ZIAEI-NEJAD, 2006). Além disso, observa-se que ao aderir o microrganismo na dieta, há uma contribuição na melhoria da qualidade da água em termos de biorremediação dos viveiros (BLAIN KENNEDY *et al.*, 1998; MORIARTY, 1998).

Neste contexto, o trabalho elaborado teve como finalidade realizar uma revisão de trabalhos já publicados referentes às pesquisas envolvendo estudos de introdução de probióticos compostos por espécies de microrganismos do gênero *Bacillus* em dietas de *Piaractus mesopotamicus* e os efeitos da pesca extensiva, nos viveiros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Apresentar o estado da arte referente aos probióticos oriundos de cepas de espécies do gênero *Bacillus* extraídas de tecidos presentes em tratos gastrointestinais de peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus* e a sua introdução no setor de piscicultura.

2.2. Objetivos Específicos

- Apresentar o andamento das pesquisas referentes ao tema e as aplicações no setor da piscicultura.
- Avaliar o desempenho, dos microrganismos selecionados no combate aos patógenos encontrados nas áreas de criação.
- Analisar a capacidade antibiótica, imunoestimulante, inibitória e de produção enzimática.
- Destacar os principais pontos que selecionam os microrganismos da espécie do gênero *Bacillus*, como uma possível fonte de uso probiótica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Definição de Probióticos

Probióticos são produtos que contêm em sua composição um ou mais microrganismos viáveis que em quantidades adequadas possuem capacidade de alterar, por colonização, a microbiota própria do intestino do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos à saúde de quem o consome (SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001). As primeiras definições que delineiam o produto, surgiram na década de 60 por Lily e Stillwell (1965), que o descreveram como "substâncias secretadas por um organismo visando estimular outros em conjunto". Até o ano de 1974, essa definição era a mais disseminada por meio da comunidade científica, no entanto, durante esse período, apresentou-se uma nova forma de dissertar sobre o assunto focalizando na parte animal, definindo-se probióticos como "organismos e substâncias que têm um efeito benéfico sobre o hospedeiro, contribuindo para o equilíbrio microbiano intestinal" (PARKER, 1974).

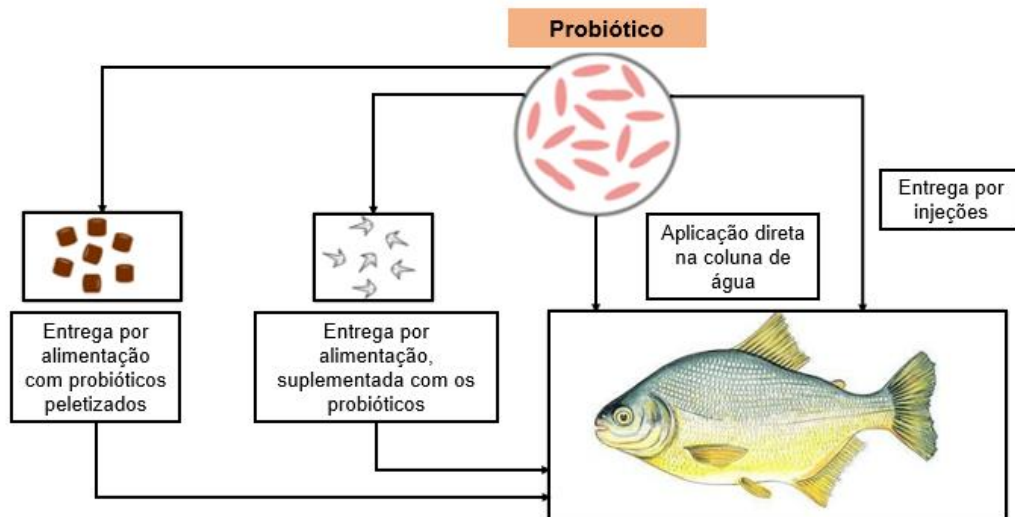
Fuller (1992), definiu um conceito mais amplo considerando que um probiótico é "Um microrganismo vivo suplementado na dieta, o qual beneficia o animal hospedeiro devido ao fato de melhorar o balanço microbiano intestinal". O autor ainda delineia, aspectos que validam um produto para uso probiótico, estipulando de forma elencada as principais características, que partem da eficácia na aplicação, a não patogenicidade e não toxicidade, de ser uma célula viável, que preferencialmente se encontre em grande número, possuir capacidade de sobrevivência e estar ativamente envolvido no metabolismo do ambiente intestinal e por fim possibilitar a estabilização para permanecer viável durante longos períodos de armazenamento.

Hotel e Cordoba (2001) detalharam de forma mais completa o termo probiótico como: "Microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro". Somados ao especificado, a primeira definição que interligou os probióticos a piscicultura provém de Verschuere *et al.* (2000), que delineou o probiótico como qualquer adjunto microbiano vivo que tem efeito benéfico no hospedeiro, seja modificando o próprio organismo animal ou a comunidade microbiana do ambiente aquático, através de uma melhora na dieta ou no valor nutricional, na resposta do hospedeiro a doenças, ou ainda na qualidade do ambiente que se encontra. Os termos delineados, por meio de Vendrell *et al.* (2008), ampliam-se e constrói-se uma definição mais completa sobre os probióticos na piscicultura, afirmando que esses microrganismos benéficos influenciam favoravelmente o

desenvolvimento e a estabilidade da microbiota normal do hospedeiro, além de inibir a colonização por patógenos, influenciando na barreira mucosa por seus efeitos tróficos no epitélio intestinal e estimulando componentes específicos e não específicos do sistema imunológico.

Em um contexto geral o probiótico é uma célula viva, morta ou apenas um componente celular microbiano que ao ser administrado via ração ou pela água de criação (Figura 1), beneficia o hospedeiro em vários aspectos, tais como: melhora da resistência a doenças, otimização do crescimento e aceleração das respostas aos estresses ambientais. Estes fatos podem ser alcançados, através das melhorias provenientes do equilíbrio microbiano dos hospedeiros ou do equilíbrio microbiano do ambiente " (MERRIFIELD *et al.*, 2010). Além disso os probióticos podem reduzir a incidência das doenças ou diminuir a gravidade dos surtos na aquicultura, além de prevenir doenças infecciosas intestinais através da secreção de bacteriocinas que inibem o crescimento de outros microrganismos virulentos como a *Escherichia coli* e a *Salmonella* no lúmen intestinal (BARTHS *et al.*, 2009).

Figura 1: Rotas de administração de um probiótico na rotina da piscicultura

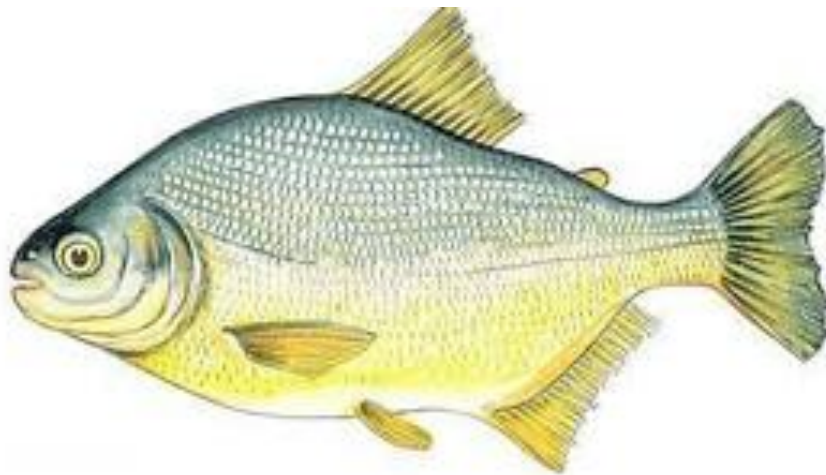


Fonte: Adaptado de Jahangiri e Esteban, (2018).

3.2. Caracterização da espécie *Piaractus mesopotamicus*

O *P. mesopotamicus*, ou popularmente conhecido como Pacu (Figura 2), tem por característica ser um dos peixes de água doce mais estudado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. São originários da Bacia do Rio Prata e do Pantanal do Mato Grosso e é morador habitual das grandes coleções de água, como as dos rios Paraná, Mogi-Guaçu, Paraíba e baixo Tietê (PETRERE, 1989). Conforme observado pelo último censo de pecuária municipal (PPM), realizado em 2019 pelo IBGE, a produção anual da espécie no Brasil corresponde a 2,2%, com um total em quilogramas de 11.651.200 consumidos, ficando na quarta posição, abaixo da Tilápia, da Carpa e do Tambaqui. Apesar do baixo consumo no Brasil, há uma busca crescente na adesão das espécies nativas das bacias do país nos mercados consumidores e o Pacu é um desses casos a se observar, uma vez que a difícil adaptação de espécies exóticas aos diversos tipos de manejo, devido a questões de clima e de parâmetros físico-químicos das águas que não correspondem ao seu espectro de adaptação, favorecem a busca por peixes regionais (ZANIBONE FILHO, 2000).

Figura 2: Representação ilustrativa do *Piaractus mesopotamicus*



Fonte: SADO, (2008).

Com relação a sua classificação, é um peixe teleósteo da família *Characidae* que apresenta escamas, corpo romboide e achatado, possuindo uma coloração uniforme, variando do castanho ao cinza-escuro, com o ventre amarelado (COSTA *et al.*, 2013). A espécie possui fácil adaptabilidade a tanques e viveiros, no qual se adentra a suplementação que exige um número baixo de proteínas e de farinha de peixes, demonstrando a facilidade de adaptar-se à alimentação artificial (FERNANDES *et al.*, 2000). Além disso apresenta rápido crescimento, rusticidade no manejo e uma carne com textura macia e sabor apreciável (JOMORI *et al.*, 2008). Um fator de suma importância, é a característica de ser um peixe onívoro, isso expande a possibilidade de acréscimo proteico na dieta, de diferentes tipos de composições (BICUDO, 2008). Outro aspecto advém do tamanho de seu intestino, que por ser mais longo, permite a permanência do alimento por mais tempo em contato com as enzimas digestivas, maximizando a digestão para suprir o baixo valor nutritivo dos alimentos ingeridos (ROTTA, 2003). Essas características citadas o fizeram ser um alvo da aquicultura, por ser um peixe com fácil manejo e boa adaptação as condições de um ambiente confinado.

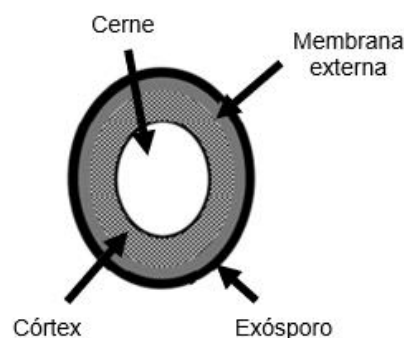
Somados ao apresentado, é válido ressaltar que o *Piaractus mesopotamicus* com a sua adesão a piscicultura extensiva, tem sofrido com os danos gerados, sobretudo pelo o peixe estar em um confinamento com uma grande quantidade de animais de mesma espécie, gerando desequilíbrios no espaço e abrindo portas para infecções, perda de peso e posterior falecimento devido a desnutrição e desbalanceamento nutricional. Buscando mitigar esses efeitos e melhorar a vivência da espécie, estudos focando no uso de microrganismos da espécie do gênero *Bacillus*, tem se tornado bastante presentes, devido ao fato de possuir especificações que o delineiam como um ótimo probiótico, tendo em vista que se aderem aos tecidos da região intestinal com grande facilidade, possuem uma ótima colonização e sobretudo adaptabilidade as condições ali presentes. Farias (2012), por exemplo delinea a extração de amostras de *B. subtilis* e *B. Cereus* dos próprios tecidos intestinais dos animais, visando identificar e suscitar os benefícios na parte imunológica, hematológica e melhoras de produção. Além disso, os microrganismos podem ser utilizados para combater doenças associadas ao cultivo, como é o caso de infecções geradas pela bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*, Farias *et al.*, (2016), avaliou o efeito de uma composição contendo *B. subtilis* e *B. cereus* ministrada em peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus*. Os resultados indicaram uma redução da infecção induzida por *A. hydrophila* e conseqüentemente os animais adquiriram uma resistência maior ao invasor.

3.3. Caracterização do *Bacillus* sp.

O gênero de estudo são espécies aeróbicas e facultativamente anaeróbicas, indicando possibilidades de crescimento nos mais diversos nichos de competição contra potenciais patógenos agressivos (YI *et al.*, 2018). Somados a isso, uma das principais características que os tornam estas bactérias foco no processo de desenvolvimento de probióticos é a capacidade de produzir endósporos, por favorecer a viabilidade celular durante um período maior no trato gastrointestinal dos animais, devido ao esporo proporcionar um arcabouço de proteção em torno da bactéria (HUANG *et al.*, 2008).

A constituição física de um esporo bacteriano (Figura 3) parte-se da estrutura central denominada Cerne, no qual abriga-se os cromossomos, e é preenchido com pequenas proteínas solúveis em ácido chamada SASP (fenótipo secretor associado a senescência) que saturam o DNA e ajudam a protegê-lo. No entorno há uma membrana lipídica e em seguida, uma camada grossa de peptidoglicanos, denominada córtex, que difere de outra estrutura de mesma bioquímica, que apresenta aspecto não-poroso tanto na ligação cruzada quanto na composição. O córtex mantém a atividade de água do núcleo de esporos relativamente baixa, o que, por sua vez, é essencial para a resistência dos mesmos, ao seu redor está uma complexa estrutura multicamadas chamada exósporo que desempenha papéis de resistência aos esporos, germinação, e também possui funções enzimáticas que podem possivelmente permitir interações com outros organismos no ambiente (DRIKS, 2004).

Figura 3: Estrutura de um esporo bacteriano



Fonte: Adaptado de Driks, 2014.

Os esporos protegem a bactéria, por meio de um estado altamente defensivo e resistente a condições ambientais tais como: temperaturas extremas, radiações, pH, alterações de pressão e agentes químicos tóxicos, fatores que prejudicariam a forma vegetativa e lesionariam a bactéria. Se tratando de seu uso como um agente probiótico algumas partes do trato gastrointestinal representam um ambiente hostil para o microrganismo, tendo em vista de ser uma região em que há um pH extremamente baixo e ocorrem situações de anoxia (privação total de oxigênio dentro de tecidos ou de órgãos). Apesar das conjunturas apresentadas, o esporo é inerte a essas condições e proporcionaria um trânsito sem impedimentos através do trato gastrointestinal, especialmente no estômago e intestino delgado. No entanto, a germinação na primeira parte do intestino delgado rica em nutrientes e por possuir uma baixa pressão microbiana proporciona um bom ambiente mais consistente para a atuação da mesma, esses fatores independem do ser vivo de estudo (BERNARDEAU *et al.*, 2017).

Por possuir uma capacidade de gerar um mecanismo protetor, a formação desses encapsulamentos naturais, não as impedem de sofrer com tensões extremas, oferecendo uma solução biológica para a formulação e solução de problemas no que tangem a preservação durante uma possível produção em escala industrial, o que pode atribuir-se ao processo de peletização da ração animal, portanto apresentando maior vantagem na sua utilização como probiótico em relação a outras bactérias que são fornecidas na forma vegetativa (HONG *et al.*, 2005). Em suma, uma das vantagens de se utilizar os *Bacillus* sp., devido a característica citada, é a capacidade de gerar baixos custos de produção, devido a sua facilidade de preparação, resistência aos processos de produção e uma vida útil prolongada ao longo de uma ampla gama de temperaturas (BARBOSA *et al.*, 2005).

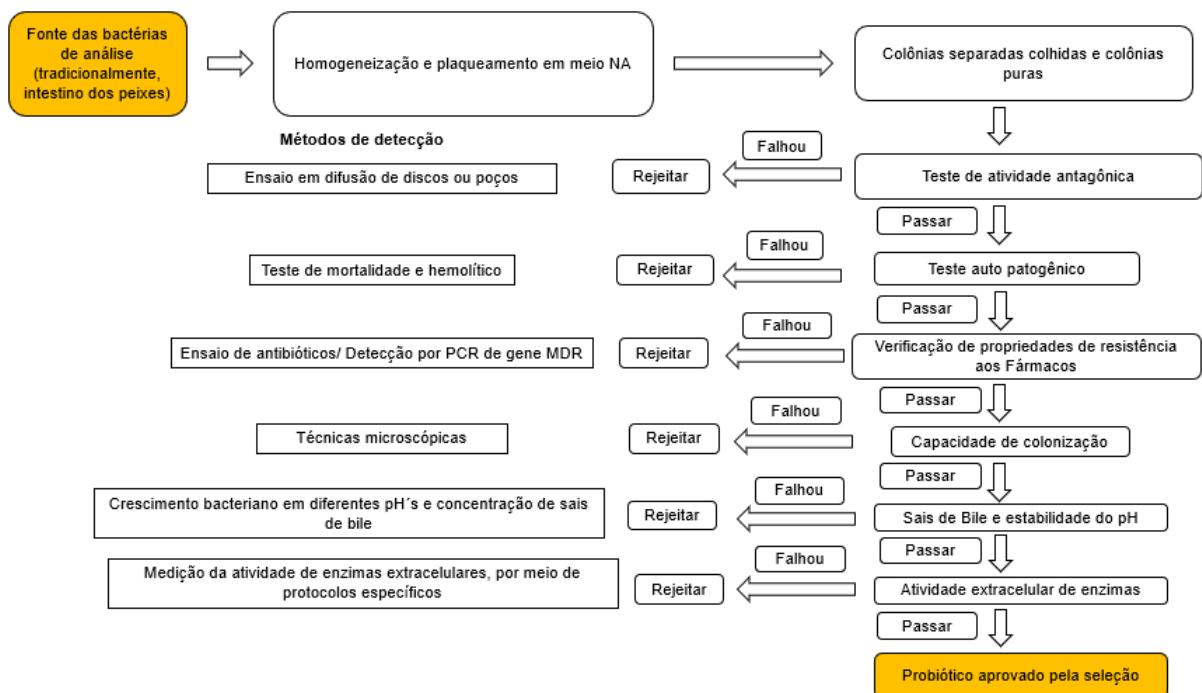
Além do apresentado, os estudos sobre a utilização de *Bacillus* sp. se expandem para a sua capacidade de produção de bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos, produzidos através da síntese ribossomal (CHERIF *et al.*, 2001, ABRIOUEL *et al.*, 2011) e aumento das respostas imunológicas (BARBOSA *et al.*, 2005, CHERIF *et al.*, 2001; CLADERA-OLIVERA *et al.*, 2004; DUC *et al.*, 2004). Além disso, com relação ao local onde é inserido os probióticos, cria-se capacidades altíssimas de conversão da matéria orgânica em CO₂, gerando por consequência uma quantidade de lodo considerável (BALCAZAR *et al.* 2006; MOHAPATRA *et al.*, 2012). Gatesoup (1999), cita que ao introduzir os bacilos nas proximidades imediatas dos aeradores das lagoas de cultivo, evidencia-se uma redução significativa da demanda química do oxigênio nas lagoas, o que infere que a aplicação desses microrganismos gera uma ampliação nas taxas de aeração.

Espécies do gênero *B. subtilis* crescem de forma eficiente com fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, devido as enzimas no quais secretam. Estas enzimas, são muito eficientes, quebrando uma grande variedade de proteínas, carboidratos e lipídios de origem animal e vegetal, pois atuam na degradação dos detritos orgânicos acumulados das culturas de camarão e peixes, induzindo a biorremediação de lagoas e, conseqüentemente, a prevenção de doenças virais e bacterianas (OLMOS *et al.*,2014).

3.4. Seleção de critérios para a escolha do probiótico

Uma das propriedades mais importantes dos probióticos é aderir-se e proliferar-se no local específico para a máxima utilidade das espécies hospedeiras, para que essas atribuições sejam efetivadas e se obter muitos benefícios. O candidato bem sucedido deve possuir em suas características o encaixe em determinados critérios tomados como importantes, ao se escolher o mesmo, esses procedimentos de seleção (tanto *in vivo* quanto *in vitro*) de bactérias probióticas são trabalhosos e diferem ligeiramente de um organismo para outro, pois o modo de ação do candidato probiótico varia de animais aquáticos para terrestres, no entanto, os parâmetros de seleção geral são quase os mesmos (Figura 4).

Figura 4: Procedimento de seleção para a definição de um possível probiótico



Fonte: Adaptado de Banerjee *et al.*, (2017).

3.4.1. Não patogenicidade

Em princípio a cepa bacteriana selecionada não deve ser patogênica para os peixes, para assim evitar que os mesmos não sejam afetados pelo que lhe foi atribuído ao consumo. Assim sendo, o grau de patogenicidade depende da capacidade de produção de toxinas e varia de uma cepa para outra, conforme se delineia na observação de dois trabalhos em que Meeran *et al.*, (2015), por meio de testes com a espécie *Heteropneustes fossilis*, popularmente conhecida como bagre americano, ao colocar o peixe em contato com *Aeromonas hydrophila* sem o acréscimo de qualquer antibiótico ou probiótico, obteve em seus estudos altas taxas de contaminação. Em contradição, Gunasekara *et al.*, (2010), através da mesma cepa bacteriana inoculada em tanques onde se encontravam a espécie *Artemia franciscana nauplii*, houve a identificação de que a mesma auxiliou na manutenção do organismo durante seu crescimento.

As metodologias utilizadas para testar a não patogenicidade, partem de identificações *in vitro* e *in vivo*, sendo a principal determinação *in vitro* o estudo da atividade hemolíticas (Figura 5) e *in vivo* o acompanhamento de possíveis reações após a alimentação dos animais com o probiótico (BANERJEE *et al.*, 2017). Partindo-se das metodologias laboratoriais, o estudo hematológico se delineia através da inserção de 5% do sangue do animal em um meio denominado Columbia ágar com posterior aplicação por 48 horas em uma temperatura de 30°C. Em seguida é realizado um teste de presença para as enzimas β -hemólise, α -hemólise e γ -hemólise, sendo a primeira responsável por degradar glóbulos vermelho e a hemoglobina, gerando zonas claras ao redor das colônias, a segunda por decompor células vermelhas do sangue apresentando um tom esverdeado ao entorno das colônias, devido a presença de biliverdina, que é um subproduto da quebra da hemoglobina e pôr fim a terceira, no qual não há apresentação de um halo ao redor das colônias, devido ao fato de organismo não produzir hemolisinas, que são exoenzimas que lisam os glóbulos vermelhos e degradam a hemoglobina. (MARAGKOUidakis *et al.*, 2006)

Figura 5: Exemplificações de resultados de plaqueamento para identificar Atividades Hemolíticas em bactérias.



Fonte: BUXTON, (2005).

Com relação aos testes *in vivo* é realizado uma triagem quanto ao peso do animal, taxa de mortalidade após ingestão do probiótico e se houve uma estimulação no desenvolvimento de doenças potencialmente perigosas ao animal observado. Na grande maioria dos casos, por ser um composto que é oriundo do próprio animal ou derivado de algum tecido ou órgão, dificilmente apresenta-se uma possível reação negativa. Farias (2012), utiliza-se da metodologia de estudo zootécnico, que basicamente são dados descritos em planilhas categorizadas, na taxa de sobrevivência, ganho de peso, taxa de conversão alimentar, consumo alimentar diário e no crescimento específico, buscando-se observar os efeitos do probiótico. Os resultados obtidos por essa classificação de dados são determinados por dados estatísticos, que estabelecerão o comportamento dos peixes ao composto biológico adicionado.

3.4.2. Ausência de genes de resistência

Um dos principais agravantes devido ao extensivo de antibióticos nas dietas dos animais é o surgimento de bactérias resistentes a múltiplos medicamentos. Além disso, a especificidade da resposta do hospedeiro depende das espécies de bactérias que colonizam o trato digestivo, caso haja eventuais modificações no microbiota gastrointestinal, devido ao tratamento com antibióticos, podem ocorrer alterações na relação benéfica hospedeiro-parasita. Portanto, entender como os compostos antibacterianos modificam a microbiota gastrointestinal dos peixes, pode ajudar a melhorar a gestão dos sistemas de produção buscando reduzir o uso desses compostos medicamentosos e assim aumentar a segurança alimentar dos peixes de aquicultura (GASTALHO *et al.*, 2014).

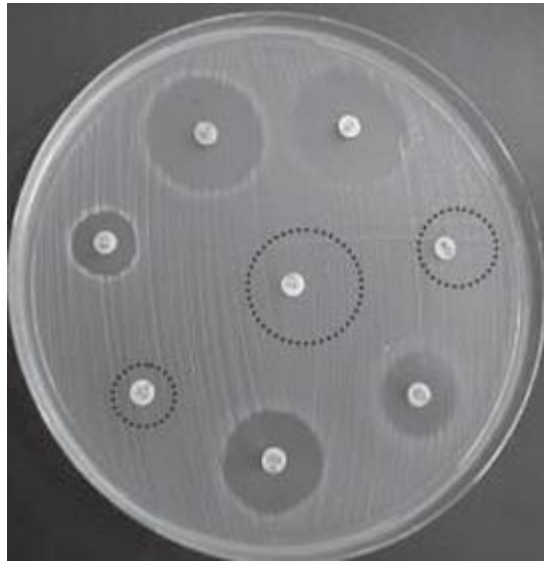
Em geral, a propriedade de resistência a medicamentos vem dos genes codificados em plasmídeos (JACKSON *et al.*, 2011), quanto ao explicitado já foi datado a presença de mecanismos de resistência a antibióticos em espécies do gênero *Bacillus*, sendo os quais o

plasmídeo *erm(C)* oriundo do *Bacillus subtilis*, o gene *tet(L)* codificado pelo plasmídeo de mesma bactéria e o gene *tet(M)*, contido no transposon conjugado Tn5397 do *Incilo subtilis* (GUEIMONDE *et al.*, 2013).

Tendo em vista os aspectos explicitados, a cepa probiótica bem sucedida não deve possuir nenhum gene de resistência a antibióticos codificado por plasmídeos ou aglomerado genético, pois em condição de estresse, neste caso a presença do composto a ser gerado, as bactérias evoluem em demasia devido à sua alta taxa de mutação e esta propriedade única pode ser transferida de uma espécie para outra através do mecanismo lateral de transferência genética. Assim sendo, antes de selecionar um isolado bacteriano como candidato probiótico promissor, é necessário estabelecer a realização de determinadas experimentações, no qual a sensibilidade a antibióticos de amplo espectro e detecção de PCR de genes multi-resistentes a medicamentos, devem estar presentes (BANERJEE *et al.*, 2017).

Com relação as metodologias de amplo espectro, umas das mais tradicionais é a de difusão em disco, em que um disco de papel contendo os antibióticos de análise são colocados em uma placa contendo ágar Muller-Hinton, suplementado com NaCl 2% (Figura 6). Com relação ao PCR de genes multi-resistentes, parte-se dos estudos dos integrons que são elementos funcionais do DNA, que podem adquirir genes exógenos, como genes cassetes, e reorganizá-los para que sejam expressos corretamente, além disso a partir desse aspecto genético é possível detectar diferentes plasmídeos de multirresistência. De forma geral são divididos em três partes: (i) o gene integrase (*intI*) que codifica um membro da família de tirosina recombinase, (ii) um primário adjacente local de recombinação (*attI*), e (iii) promotores “embutidos” para expressar genes capturados (ISHIKAWA, 2011).

Figura 6: Exemplo de teste com difusão em disco em placa de petri, contendo antimicrobianos ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, rifampicina e evancomicina.



Fonte: SEJAS et al., (2003).

Ishikawa (2011), delinea a construção de um *primer* para posterior aplicação na técnica de PCR, partindo-se dos oligonucleotídeos designados intCiF3a (50-GTCAAGGAT (C/G) TGGATTTCGA), intCiF3b (50-GTCAAAGAT (A /T) TCGATTTTGA), intCiiiR3a (50 - ACATGCGTGTA (A/ G) ATCATCGT) e intCiiiR3b (50-ACATGCGTGTA (A/G) ATCTGCGT) que foram projetados e usados para amplificar uma sequência parcial comum a todos os integrons classes de genes da integrase. Pares de primer intI1F (50-GTTCGGTCAAGGTTCTGG) e intI1R (50-CGTAGAGACGTCGGAATG); intI2F (50-CAAGCATCTCTAGGCGTA) e intI2R (50-AGAAGCATCAGTCCATCC); e intI3F(50-CATCAAGCTGCTCGATCA) e intI3R (50-ACAACCTCTTGCACCGTTC), foram estabelecidos pelo autor para realizar a amplificação de individual das classes 1, 2 e 3 dos genes da integrase, de forma respectiva e com relação à amplificação, o mesmo utilizou-se da polimerase *AmpliTaq Gold DNA*, seguida por uma etapa de desnaturação a 95°C em um tempo de 7 minutos, com 33 ciclos de amplificação. Por fim, os produtos resultantes da metodologia citada, foram separados pela técnica de eletroforese horizontal através de 2% (p/v) de gel de agarose e subsequentemente visualizado utilizando-se de *GelRed™* (Nucleic Acid Gel Stain reagente).

3.4.3. Tolerância ao pH e aos sais de bile

Devido ao fato do candidato a probiótico ser administrado em conjunto com a alimentação, o mesmo enfrenta uma mudança no ambiente no intestino em termos de nível de pH, fazendo com que a cepa probiótica deva ser capaz de resistir aos mais diferentes espaços que permeia a região. Além disso, durante o metabolismo, diferentes tipos de sais biliares também são secretados, sendo assim, os candidatos probióticos devem obter uma certa capacidade de tolerância frente a uma ampla gama de pH's (baixos e ácidos a altos e alcalinos) e altas concentrações (>2,5%) de sais biliares. Em termos de estudos as bactérias da espécie de gênero *Bacillus*, conseguem tolerar no que tange valores de pH que variam de 2 a 3 e com relação aos sais biliares uma porcentagem de 0,3% (NITHYA e HALAMI, 2013, HONG *et al.*, 2005, GUO, *et al.*, 2016).

Visando identificar a resistência aos parâmetros e como a cepa de estudo se comporta nessas condições, metodologias devem ser tomadas e executadas. Com relação ao estudo de pH, um teste de acidez tolerável é realizado centrifugando a suspensão bacteriana e o material sedimentado, no qual é lavado com tampão PBS e resuspendido com o mesmo componente químico, dessa vez encontrando-se com um pH de valor três. O material após esses processos, é plaqueado em Ágar LB e a taxa de sobrevivência, advém da quantidade de colônias presentes na placa de testes. Para o caso das resistências aos sais biliares, o uso de um Caldo LB em diferentes concentrações em conjunto com monitoramento da densidade óptica (OD) a 650 nm auxilia a determinação do crescimento de culturas em diferentes concentrações biliares, indicando se positivo, que a bactéria de estudo tem capacidade de resistir as ações químicas desse componente (NITHYA e HALAMI, 2013).

3.4.4. Capacidade Antagônica

A capacidade antagônica ou inibição do candidato probiótico contra uma variedade de patógenos é a propriedade mais importante ao se determinar substâncias produzidas por bactérias que podem ser geradas através do metabolismo secundário ou primário e geralmente apresentam-se tóxicas ou ocasionam inibição contra outros organismos. Os microrganismos são chaves para que os probióticos gerem substâncias químicas que possuam efeitos bacteriostáticos ou bactericidas, que podem vir a alterar a relação interpopulacional e afetar a competição por compostos bioquímicos oriundos do espaço digestivo, além da energia disponível naquele local. De forma geral esses efeitos inibitórios podem atuar de forma singular

ou em combinação, isso inclui a produção de antibióticos, bacteriocinas (agentes proteicos produzidos por uma bactéria afim de inibir ou matar outro patógeno), lisoenzimas, proteases e ainda estabelecer limites de pH para produzir ácidos orgânicos (SIHAG e SHARMA, 2012).

Com relação aos procedimentos de ensaio para testar a capacidade antagônica, partem-se por meio dos métodos *in vitro* de difusão de poços e ensaio discal. Na parte *in vivo*, onde os peixes são expostos a uma ampla gama de patógenos e o candidato probiótico bem sucedido é aquele que demonstrar uma atividade antagônica de amplo espectro (BANERJEE *et al.*, 2017). Partindo-se das técnicas *in vitro*, a primeira técnica consiste na utilização de placas com camada dupla (camada base e camada *seed* de meios adequados ao microrganismo testado). A camada base é obtida através do meio de cultura Agar Mueller-Hinton (AMH), que após esterilizado e resfriado a cerca de 50 °C, passa a ser distribuído em uma quantidade de 25 mL em placas de Petri de 25 x 150 mm esterilizadas. Com relação a camada *seed*, obtêm-se a mesma, colocando-se em um tubo de 12,5 mL de meio de cultura AMH esterilizado e resfriado a 50 °C, ao qual é incorporado 2,5 mL de Caldo Mueller-Hinton. Com o inóculo já preparado e de forma imediata verte-se o mesmo sobre a camada base. Após a solidificação da camada *seed*, os poços são confeccionados com um dispositivo contendo cilindros metálicos esterilizados de 4,0 mm de diâmetro, 40 µL dos extratos a serem testados, além das substâncias puras e o controle negativo. Por fim, aloca-se os papéis filtros esterilizados na tampa de cada placa para reter a água de condensação e após um período de pré-incubação de 2 h à temperatura ambiente, no qual permite-se a difusão dos extratos antes do início do desenvolvimento dos microrganismos e as placas finalizadas passam por um processo de incubação por aerobiose a uma temperatura de 36°C por 18 horas (ALVES, 2008).

A segunda metodologia, datada como ensaio discal, parte-se inicialmente na preparação do meio de cultura AMH e posterior resfriamento a uma temperatura de 50°C. Após esse processo, transfere-se um volume de 50 mL do meio liquefeito para placas de Petri esterilizadas de 25 x 150 mm, até atingir a espessura de 4 mm e com um *swab* esterilizado, distribui-se o inóculo uniformemente sobre a superfície do ágar, no qual deve ser deixado em repouso à temperatura ambiente durante 3 minutos. Com relação ao discos, acrescenta-se 16 µL dos extratos, das substâncias puras e do controle negativo, sobre os mesmos e após um intervalo de 15 min, as placas contendo as amostras inoculadas devem ser incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 18 h (ALVES, 2008).

Ao se tratar da parte *in vivo*, um exemplo a ser tomado para delinear a importância da adesão desse procedimento, advém de umas das doenças mais graves na piscicultura, que é a infecção por *Aeromonas hydrophila*, onde há o ocasionamento de septicemia nos animais que são acometidos pela mesma. Os probióticos tem sido estudado, visando mitigar essa contaminação nos viveiros, fato esse atribuído por Newaj-Fyzul (2007), extraindo amostras de colônias bacterianas de intestinos das trutas arco-íris e também por Vijayabaskar e Somasundaram (2008), buscando isolar bacteriocinas de bactérias ácido lácticas que atuam como um composto inibitório ao patógeno. Ambos os autores, através de análises estatísticas de um determinado período de alimentação, conseguiram observar a atuação do possível probiótico através das taxas de mortalidade e também de peixes contaminados que foram curados e indicando em ambos os resultados a presença de um decaimento considerável na atuação do patógeno no interior do espaço de confinamento dos animais, indicando que os compostos estudados possuem uma capacidade antagônica validada e podem ser abordados como possíveis soluções para combater casos de contaminações nos espaços específicos.

3.4.5. Produção extracelular de enzimas

Bem como a capacidade antagônica, as enzimas extracelulares (protease, amilase, celulose, fitose, lipase, fitase etc...) indicam um sinal positivo de um candidato probiótico bem sucedido. Com relação as vitaminas, no geral, nenhum peixe as produz, os responsáveis por essa geração advêm dos probióticos, pois são os principais produtores de vitaminas e com isso as disponibilizam ao hospedeiro. Conforme o especificado, o candidato a se tornar um probiótico deve fornecer uma quantidade suficiente de enzimas e vitaminas para o apoio nutricional do hospedeiro (BANERJEE e RAY, 2017).

Um dos benefícios da produção de enzimas em probióticos de espécies do gênero *Bacillus* é a geração de antioxidantes, SOD (Superóxido dismutase) e glutatona tendo como objetivo eliminar os radicais livres efetivamente. O processo fagocítico, bem como o metabolismo celular, resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion de superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($\cdot OH$). O estresse oxidativo ocorre quando oxidantes como ROS, espécies de nitrogênio (RNS) e a produção de peroxidação lipídica (LPO), superam a capacidade antioxidante de células ou tecidos. Os danos induzidos por estes ROS são conhecidos por serem neutralizados por enzimas antioxidantes, protegendo o hospedeiro do estresse oxidativo. As enzimas antioxidantes tem um papel

importante do que tange a indicação do estado antioxidante de um organismo aquático e refletem ansiedade oxidativa. (KUEBUTORNYE et al., 2019)

Recentemente, foram realizadas tentativas de identificação de bactérias intestinais produtoras de enzimas, por meio sequenciamento genético de rRNA 16S e posterior comparação com o banco de dados NCBI *GenBank* ou RDP, somados a isso por meio também de reações em cadeia de polimerase (PCR), DNA polimórfico amplificado aleatório, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), Hibridização fluorescente *in situ* (FISH), microscopia confocal e Espectrometria de massas, também agregaram nessa pesquisa e desenvolvimento. As metodologias apresentadas, geram informações mais confiáveis com relação a microbiota intestinal dos peixes, em confronto as técnicas que se utilizavam de inoculações em meios de cultura (BANERJEE & RAY, 2017).

DAS et al., (2014), explicita que para especificar a capacidade de produção enzimática de um organismo, necessita-se a partir da metodologia que amplifique e codifique o gene por meio da técnica de 16S rRNA no qual será possível identificar o microrganismo de estudo e em posterior aplicá-lo em meios de cultivo que o estimulem a produzir as enzimas necessárias. Conforme realizada a identificação e especificados a espécie de estudo., aplica-se a metodologia qualitativa buscando identificar o potencial de geração enzimática do probiótico estudado. O mesmo detalhamento foi destacado por Ghosh *et al.*, (2017), que se utilizou dos mesmos princípios para analisar cepas oriundas do intestino de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com capacidade de gerar enzimas digestivas extracelulares (amilase, protease e lipase) e de degradação (celulase, fitase e xilanase), afim de inibir os patógenos e garantir uma biossegurança ao peixe estudado.

Partindo-se do assimilado, ambos os autores para identificar a produção de amilase e protease, aplicam-se em placas ST e PG (30°C, 24 h) os organismos de estudo e a confirmação, advém do desenvolvimento de uma zona clara de halo, inundada com 1% de iodo de Lugol nas placas de ST ou uma solução de 15% de HgCl₂ nas placas PG. Já com relação a atividade celulolítica, a determinação ocorre por meio de placas CMC inundadas com corante vermelho do Congo, que se liga seletivamente ao CMC não hidrolisado, caso haja o aparecimento de um halo é devido à presença de CMC hidrolisado em torno da colônia bacteriana, indicando a produção de celulase no meio 0,7% de agarose. No que tange a geração de lipases, há a formação de um halo em torno de sua colônia em placas de 1 % de tributirina.

A determinação das atividades enzimáticas extracelulares qualitativas tem por base na medição dos halos (diâmetro em mm) ao redor da colônia. As pontuações são divididas partindo-se do número 0, que nos indica a não presença de microrganismo produtor, devido a

não formação do halo, 1 para baixa possibilidade e halos com diâmetro de 6 a 10 mm, 2 para moderada geração e halos de 11 a 15 mm, 3 boa formação e halos de 16 a 25 mm, 4 alto e halos de 26 a 35 mm e por fim o número 5 com halos de valores maiores ou iguais a 35 mm, confirmando que o microrganismo de estudo possui substancial capacidade de produzir os compostos de interesse. (GHOSH *et al.*, 2017)

3.4.6. Natureza indígena

A microbiota no trato gastrointestinal de peixes pode ser dividida em dois grandes grupos, bactérias autóctones ou bactérias alóctones. O primeiro termo é frequentemente utilizado com sinônimo do termo flora normal de animais endotérmicos, enquanto o segundo refere-se a microrganismos que são visitantes incidentais do trato gastrointestinal e que são rejeitados após algum tempo (RINGØ, 1995). Uma maioria significativa dos probióticos usados na aquicultura não se origina do próprio organismo hospedeiro aquático, mas de fontes terrestres ou de ambientes diferentes. Algumas evidências sugerem que probióticos nativos, denominados como autóctones, quando associados ao hospedeiro revelam um desempenho maior do que os alóctones isolados de outras fontes. Uma possível explicação é que os probióticos autóctones são melhor adaptados ao seu habitat natural, o intestino, do que probióticos alóctonea, sendo assim, espera-se que os organismos melhores adaptados sejam prontamente capazes de colonizar o trato gastrointestinal do hospedeiro e apresentar melhores efetividades nas tarefas que lhe forem impostas (WUERTZ, 2021). Em geral, os candidatos probióticos são selecionados e isolados do intestino para evitar as dificuldades de colonização e outros problemas imunológicos relacionados.

Com base nos critérios para testar a autoctonia dos microrganismos relatados no trato gastrointestinal de animais endotérmicos, Birkbeck e Ringø (2005), propuseram critérios específicos para testar microrganismos de origem indígena em peixes: (i) as bactérias devem ser detectadas em indivíduos saudáveis, (ii) serem capazes de colonizar em estágios iniciais e persistir ao longo dos ciclos de vida, (iii) demonstrar resultados tanto em animais livres quanto em incubatórios, (iv) ter capacidade de crescer anaerobicamente e (v) ser detectado associado à mucosa epitelial no estômago, intestino proximal ou distal. Além disso, vários fatores como (i) acidez gástrica, (ii) sais biliares, (iii) peristalase, (iv) enzimas digestivas, (v) resposta imune e (vi) bactérias indígenas e (vi) compostos antibacterianos que produzem são sugeridos para influenciar a adesão e colonização da microbiota dentro do trato digestivo.

Em uma investigação utilizando-se da microbiota de *Salvelinus fontinalis* (Truta das fontes), como estudo de caso, Boutin *et al.* 2013, afirmaram que os candidatos a probióticos indígenas são escolhas mais garantidas do que fontes exógenas, em resposta às comunidades de microbiota intestinal, o mesmo pode ser denotado no trabalho de Bolívar-Ramírez *et al.*, (2021), em que espécies de camarões brancos do pacífico, ao serem alimentadas por bactérias indígenas, obtiveram melhores prospecções, do que um probiótico produzido de forma industrial.

Um dos fatores que ao se adentrar no estudo de um probiótico indígena é a sua capacidade de colonização, tendo em vista que uma bactéria em consonância com a microflora da espécie de estudo tende a se adaptar e crescer como consequência a boa adesão ao espaço. As espécies autóctones são capazes de se colonizar, em contrapartida as alóctones não apresentam essa especificidade (RINGØ *et al.*, 1995). Para identificar esses prospectos há uma ampla gama de instrumentos sofisticados como microscópio eletrônico de varredura e transmissão, microscópio de fluorescência, microscópio confocal e também o uso de PCR e qPCR, a fim de verificar essa capacidade de colonização bacteriana (BANERJEE e RAY, 2017).

3.5. Probióticos bacterianos e as doenças ligadas aos peixes

O desenvolvimento de doenças na aquicultura tem sido uma das maiores dificuldades no que se trata ao cultivar os animais, devido as fazendas de produção criarem condições favoráveis para a ocorrência dessas situações, sobretudo pela piscicultura ser uma prática intensiva. De maneira geral, altas densidades de estocagem e um excesso de alimentação disposta nas lagoas de cultivo que causam poluição nas águas onde são efetuados os cultivos, gerando uma suscetibilidade de vários tipos de doenças, sendo elas: bacterianas, doenças virais, doenças protozoárias, doenças fúngicas e doenças crustáceas (BANERJEE e RAY, 2017). Essas patologias associadas geralmente adentram-se no interior do animal por meio de três barreiras importantes, que são as brânquias, a pele e o trato gastrointestinal e ambas representam para o cultivar uma barreira imunológica e física contra os patógenos (SIHAG e SHARMA, 2012).

As doenças bacterianas em peixes são classificadas pela presença de superfícies ulcerosas, inflamações crônicas nos gânglios e pane sistêmica do organismo. O primeiro aspecto citado, ocasiona-se o surgimento no trato intestinal dos animais, de superfícies hemorrágicas ulcerosas que são causadas pelas bactérias *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrios*, *Flexibacter* e *Myxobacter*. As infecções causadas pela ação desses patógenos levam a uma desordem aguda nos sistemas corporais do animal, ocasionadas pela proliferação das bactérias nos órgãos internos, como pulmões, coração, sangue, baço e outros órgãos viscerais. Essas doenças geram necroses hemorrágicas, septicemia e quando localizadas nos órgãos podem ser fatais. Nas inflamações crônicas dos gânglios, ocorrem a formação de granulomas, onde a bactéria se aloca no centro dos mesmos e ali se desenvolve, para posterior proliferar-se (SIHAG e SHARMA, 2012).

Estudos sobre os efeitos de microrganismos nos peixes têm sido constante ao longo dos anos, visando mitigar essas ações e melhorar os cultivos, sem que os mesmos sejam afetados. Um dos casos é apresentado com relação as bactérias do gênero *Aeromonas*, o autor Claudiano, *et al.* 2019, ao inocular *Aeromonas hydrophila*, em um tanque com peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus*, observou-se um processo de sepse, somados ao colapso total dos sistemas do animal, ocasionado no momento em que a bactéria se adentra no corpo dos peixes de estudo. Este fato foi evidenciado de forma mais conclusiva, no momento em que o autor por meio de testes visando identificar possíveis alterações hematológicas e imunológicas, e a presença de cultura sanguínea positiva no sangue, observou-se que o efeito cumulativo dessas mudanças no cultivar geradas pelo avanço da proliferação bacteriana, levou-se a obter sinais clínicos de

contaminação e a crescente diminuição da sobrevivência dos peixes. Outro caso dessa vez gerado pela *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa*, Ferreira *et al.*, (2019), delineia um surto decorrente no município de Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul, em que 200 peixes da espécie *Piaractus Mesopotamicus* vieram a óbito, com sintomatologia de letargia, anorexia, nado desordenado, produção de muco e busca da superfície da água. Os autores por meio da coleta de tecidos dos animais e introdução em meios de cultivo contendo bactérias não fermentadoras e fermentadoras, identificaram e positivaram a presença desses microrganismos na água do local.

Tendo em vista essas situações, o correto manejo das espécies cultivadas é um fator muito importante para o desenvolvimento sustentável da indústria, tendo em vista que o animal saudável e alojado em condições apropriadas, não repassa ao consumidor final suas possíveis doenças associadas ao cultivo incorreto e sem estudos de parâmetros, devido à falta de análises constantes dos cultivares e do espaço onde os mesmos estão alojados. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) (2008), uma manutenção higiênica periódica, é a parte mais importante no que se tange prevenção de doenças na piscicultura. Uma das principais medidas de higienização que embarga a geração de organismos indesejáveis nas lagoas de cultivo, provém da secagem das lagoas e posteriormente reenchida com água de boa qualidade, para evitar assoreamento, criação de ervas daninhas não controláveis, altas densidades populacionais, alimentação excessiva e poluição. Somados a boa higiene das lagoas de cultivo, o uso de probióticos vem sendo uma das principais soluções pois apresentam benefícios na balança de microrganismos que se encontram no intestino dos cultivares, obtendo um biocontrole e uma biorremediação do local de adesão dos mesmos, somados a isso auxiliam na barreira imunológica e produzir metabólitos que inibam a colonização que possam a vir competir consigo mesmos (SIHAG e SHARMA, 2012).

3.6. Antibióticos e seu uso em excesso na aquicultura

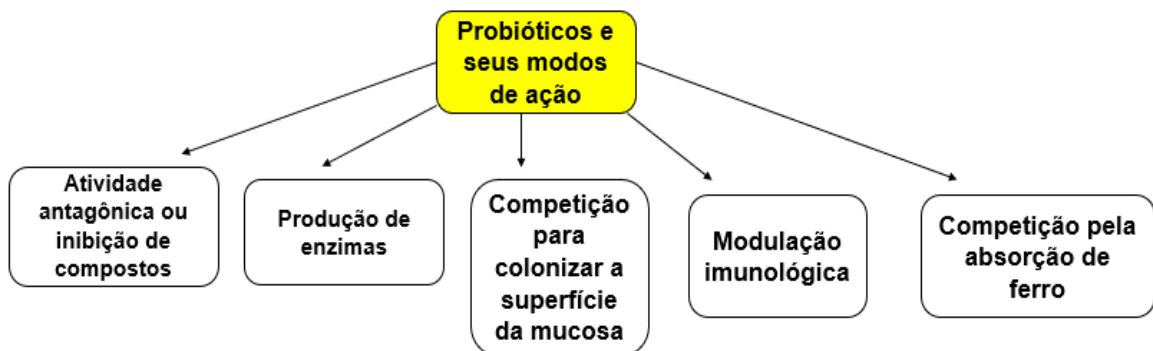
A indústria de produção de peixes abrange uma ampla gama de espécies e métodos, desde sistemas simples tradicionais, nos quais peixes ou outros animais aquáticos são criados em pequenos lagos para consumo doméstico, até sistemas intensivos de produção em escala industrial. Visando o controle de doenças infecciosas, estratégias como vacinação e uso de agentes antimicrobianos são amplamente empregadas na aquicultura, como é decorrido em outras áreas de produção animal. O uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos resultou no surgimento de reservatórios de bactérias resistentes em peixes e outros animais aquáticos, bem como no ambiente em que o animal reside, além disso acaba por fornecer uma pressão seletiva, criando reservatórios de bactérias resistentes a medicamentos e genes de resistência transferíveis em patógenos de peixes e outras bactérias no ambiente aquático. A partir disso, os genes de resistência têm facilidade em se disseminar por meio da transferência horizontal de genes, no qual ocorre no ambiente da aquicultura, na cadeia alimentar dos viveiros ou no trato gastrointestinal humano e com isso alcançar patógenos humanos, ou atingir os humanos diretamente (RASUL e MAJUMDAR, 2017).

É essencial que o antibiótico natural ou sintético deve ser seguro para o hospedeiro, permitindo seu uso como agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças bacterianas infecciosas. Tendo em vista esse aspecto, os compostos de proteção imunitária, ampliam a faixa de proteção contra patógenos nos animais devido ao fato de que os mesmos possuem baixa eficiência, no que tange os seus sistemas imunológicos, o que em si aumenta-se o uso, buscando-se acelerar os processos de proteção a ataques de microrganismos. O contato dos animais a esses compostos se dá por meio de alimentação, em banhos e injeções e são por meio dessas vias que se constrói uma problemática, no qual os alimentos não consumidos e as fezes dos peixes contendo antibióticos, espalham-se por sedimentação no fundo das lagoas, exercendo pressão seletiva e alterando assim a composição da microflora do sedimento e com isso gerando um processo de seleção de bactérias que sejam resistentes aos antibióticos aplicados (RASUL e MAJUMDAR, 2017).

3.7. Modo de ação dos probióticos

Construíram-se várias hipóteses afim de determinar e estabelecer os modos de ações dos probióticos no hospedeiro no qual está se trabalhando, em que grande parte foram observadas durante experiências *in vitro*, todavia, há de se enfatizar a necessidade que a eficiência de um probiótico selecionado pode mudar significativamente quando administrado ao hospedeiro em seu ambiente natural, os organismos probióticos são influenciados por fatores mais complexos entre os quais a ingestão seletiva, a manipulação no trato intestinal e as interações microbianas mais complexas e o ambiente nutricional são de suma importância. A partir dos fatores acima mencionados, podemos estabelecer se haverá sucesso ou fracasso do probiótico na manutenção de sua fisiologia, quando se trata do hospedeiro *in vivo*. De maneira geral, ainda há uma ligação incompleta entre as experiências *in vitro* e *in vivo* para explorar os mecanismos expostos nas ações probióticas (IBRAHEM, 2015). Para especificar os modos, estabeleceu-se critérios específicos para construir e utilizar-se dos benefícios de um probiótico, essas propriedades são: atividade antagônica, produção de enzimas extracelulares, competição para colonização na superfície da mucosa intestinal, modulação imunológica e competição para captação de ferro. (BANERJEE *et al.*, 2017)

Figura 7: Modo de Ação dos probióticos



Fonte: Autoria própria.

3.7.1. Atividade antagônica ou inibição de compostos

Compostos antagonistas são descritos como substâncias químicas produzidas pela bactéria, nos quais são tóxicos ou inibitórios para outros microrganismos. Essas substâncias podem ser geradas por metabolismos primários ou secundários e ter diferentes modos de inibição. Populações microbianas, possuem a capacidade de fomentar a prospecção de substâncias químicas, nas quais podem ser de características bactericidas ou de efeito bacteriostático, em outros grupos patogênicos (SIHAG e SHARMA, 2012). De forma geral um dos mecanismos antagônicos mais estudados tem sido as bacteriocinas, pois tem como principal características inibir ou matar outras bactérias competidoras e também podem atuar como peptídeos de sinalização, por meio de sensoriamento de *quorum* e *sensing* cruzada bacteriana dentro de comunidades microbianas ou sinalizando células do sistema imunológico hospedeiro. Essas ações permitem que populações de bactérias sincronizem o comportamento do grupo e assim facilitam a funcionalidade multicelular coordenada. Em bactérias gram-negativas, (N-acyl) a lactona homoserina normalmente serve como uma molécula de sinal, enquanto em bactérias Gram-positivas, peptídeos no caso as bacteriocinas, frequentemente servem como agentes de sinalização. (DOBSON *et al.*, 2012)

Em geral como os *Bacillus* são bactérias gram-positivas, um dos métodos mais utilizados para a geração de bacteriocinas é a detecção de quórum à base de peptídeos em bactérias envolvendo um sistema de transdução de sinal regulatório de dois componentes, compostos por uma quinase de proteína histidina (HPK) localizada na membrana celular e um regulador de resposta intracelular (RR). Estes são responsáveis por detectar o peptídeo de sinalização e induzir uma resposta celular apropriada. No caso dos sistemas de auto indutores, acredita-se que o peptídeo de sinalização é produzido em um nível baixo durante o crescimento normal, mas quando presente acima de um certo limiar de concentração, o peptídeo auto indutor se liga ao domínio n-terminal do HPK, resultando em auto fosforilação e ativação

Em consonância a atuação desses compostos, Kim *et al.* (2014), realizou uma experimentação no qual isolou-se *Bacillus* sp. SW1-1 e através de teste visando estabelecer a capacidade de geração de bacteriocinas, mostrou-se obter atividades antibacteriana significativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas envolvidas em doenças de peixes, incluindo *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *S. parauberis*, *Vibrio anguillarum* e *V. harveyi*.

3.7.2. Produção de enzimas

Bactérias probióticas produzem vários tipos de enzimas extracelulares para suportar o processo de metabolismo hospedeiro. Os peixes produzem uma ampla gama de enzimas endógenas como, protease, amilase, lipase, celulase, fitase e entre outras. Lee *et al.*, (2012), buscando descrever novas propriedades probióticas potenciais *in vitro* da bactéria da espécie de gênero *Bacillus* descreveu que a mesma possui atividades enzimáticas extracelulares, especialmente no que se trata na produção de proteases e amilases, além disso outras cepas diferenciadas por grupos, o autor suscita em conjunto ao assimilado a produção de carboidrases adicionais, como celulase e xilanase, que podem degradar polissacarídeos não amilásicos, o mesmo ainda sugerem que a combinação entre cepas de *Bacillus* sp produzindo diferentes enzimas extracelulares podem gerar uma melhoria sinérgica mediada no desempenho da produção e digestibilidade de nutrientes de animais monogástricos. Em consonância ao destacado Zokaeifar *et al.*, 2012, utilizando-se de probióticos constituídos de *Bacillus subtilis*, identificou que a indução de crescimento nos animais e cultivo, se conectaram a atividades enzimáticas induzidas pela ingestão do probiótico aderido, sendo a amilase e a protease, os dois compostos de maior presença no local.

3.7.3. Competição para colonizar a superfície da mucosa

Os patógenos para exercer o efeito nocivo, precisam ser anexados a superfície da mucosa do intestino, as bactérias probióticas tem sido estudadas não só para inibirem diretamente os patógenos, mas também para bloquear os locais de adesão dos organismos intrusos e assim reduzir o efeito dos mesmos. Além disso candidatos probióticos devem possuir sobre tudo, capacidade de colonizar o intestino do animal em que o ingere e com isso facilitar sua ação no hospedeiro em que o consomem (BANERJEE *et al.*, 2017). Sugere-se ainda que o mecanismo de colonização esteja associado a determinadas espécies dentro da microflora que podem influenciar a expressão de conjugados de glicol em células epiteliais nas quais servem como receptores para a adesão de bactérias. Uma das maneiras de identificar a presença de genes segregativos de proteínas de ligação no muco, pode ser confirmada usando a técnica de reação em cadeia de polimerase, que indiretamente apoiará a propriedade de colonização do candidato probiótico (YIRGA, 2015).

Essas relações de adesão a mucosa nos seres de estudo podem ser destacadas em experimentações, como decorre com os autores Zhang *et al.*, (2021), buscando analisar a capacidade de atuação do *Bacillus subtilis* em combate as bactérias *Shewanella sp.* e *Pseudomonas sp.*, encontradas no intestino de *Larimichthys crocea* (corvina amarela), os autores comparam em conjunto, a maior incidência dos patógenos no intestino dos animais, visando delinear como o probiótico acrescido possui uma alta eficiência em combater os invasores. Neste caso a *Shewanella sp.*, apresentou altos índices de povoamento na mucosa em comparação a *Pseudomonas spp.*, e mesmo tendo uma vantagem em se distribuir melhor na região, sofreu forte inibição pelo *Bacillus subtilis*.

Em consonância, Kong *et al.*, (2017), buscando explicitar a capacidade de ação dos probióticos em animais contaminados (*Ctenopharyngodon idella*, carpa-do-limo) por *Aeromonas hydrophila*, realizou uma intubação oral de *Bacillus subtilis*, em peixes que passaram por contágio induzido do patógeno. Para realizar as aferições a mucosa intestinal foi examinada ultra estruturalmente com microscópio eletrônico de transmissão e sua permeabilidade foi determinada usando *Evans Blue* (EB) e ácido D-láctico. Com isso especificado, distribuiu-se as análises em um grupo de controle, um contendo a presença somente de *Aeromonas hydrophila* e outro contendo a junção entre o patógeno e o *Bacillus subtilis*. Os autores observam que a quantidade de EB que permeia a parede intestinal e a concentração de ácido D-láctico sérico foram afetadas pela cepa da bactéria patogênica, fato esse não identificado no grupo de controle e também no que se encontra a junção dos dois microrganismos, que mesmo apresentando uma leve alteração, com o decorrer do tempo, houve um decréscimo muito próximo ao controle, o que nos indica possivelmente a ação do probiótico frente a cepa que decorre os sintomas nos animais.

3.7.4. Modulação imunológica

O sistema imunológico é fundamental para a sobrevivência e a aptidão dos organismos vivos, permitindo distinguir se o patógeno é potencialmente seguro ou se possui características que o colocam fora desse espectro de qualidade. Os princípios gerais desse sistema partem-se da (i) combinação de respostas específicas, (ii) divisão de tarefas entre populações das células imunológicas, tanto residentes como migratórias, (iii) comunicação intensiva e sinalização entre os vários componentes do sistema imunológico, (iv) um equilíbrio de forças, por exemplo, entre sinais pró e anti-inflamatórios, e (v) extensa variabilidade e inovação contínua para ser capaz de lidar com a diversidade antigênica, por exemplo, por polimorfismo e poligenia. Em

suma, o mesmo deve estar em constante estado de preparação mesmo na ausência de qualquer competição antigênica, devido a isso, é importante que o mesmo se distribua em locais estratégicos dentro do organismo para sensoriar e comunicar informações sobre possíveis invasões, além disso também deve possuir capacidade de repor de forma imediata células imunes para possíveis ataques. (SEGNER *et al.*, 2012)

Os peixes apresentam um sistema imunológico considerado primitivo em comparação com os vertebrados superiores e este fato pode estar relacionado a duas importantes observações, sendo a primeira especificada em questão aos vertebrados superiores terem dois compartimentos separados para gerar tipos de células imunes mieloides (medula óssea) e linfoides (linfonodos, timo, baço), os peixes não possuem medula óssea ou nódulos linfáticos e produzem ambas as células nos mesmos compartimentos. Em segundo lugar, a resposta imune adaptativa desses animais apresenta lentidão aos patógenos infecciosos, levando semanas em vez de dias como nos mamíferos (URIBE *et al.*, 2011). Apesar de apresentar esses critérios primitivos, o sistema imunológico dos peixes é eficiente o suficiente para suportar o sucesso ecológico de uma ampla variedade de ambientes e contra uma infinidade de patógenos infecciosos.

Partindo-se de maneira organizacional, os animais apresentam um sistema imunológico subdividido em três categorias que se diferem na velocidade e especificidade da resposta que lhe é atribuída. A primeira categoria é uma linha de defesa coordenada através das barreiras externas que separam os peixes do seu ambiente, isto é, o epitélio da pele, brânquias e o canal de alimentação, agindo como barreiras mecânicas contra invasores de patógenos, mas também como uma defesa química (anticorpos, lisozima, etc.) e celular (células do sistema imunológico) (SEGNER *et al.*, 2012). A mucosa desses animais possuem lectinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas complementares, peptídeos antibacterianos e imunoglobulina M (*IgM*), que têm um papel importante na inibição da entrada de patógenos. Além disso, a epiderme é capaz de reagir a diferentes ataques (espessamento e hiperplasia celular), e sua integridade é essencial para o equilíbrio osmótico e impedir a entrada de agentes estrangeiros, também é possível identificar nessas localidades externas a presença de células de defesa, como linfócitos, macrófagos e células granulares eosinofílicas (URIBE *et al.*, 2011).

A segunda categoria é formada pelo sistema imune inato que impõe uma resposta rápida a patógenos invasores, o mesmo fornece de forma não específica soluções que são ativadas por padrões associados a patógenos (PAMPs), que são comuns a muitos patógenos, tido como exemplo, os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Em contrapartida, observando-se o lado do patógeno, há a presença de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que em contato

com o hospedeiro reconhecem sinais estranhos ou moléculas de alarme endógenas provenientes de quem o mesmo invadiu. A maioria dos elementos efetores do sistema imunológico inato dos peixes incluem, fatores humorais, como lisozimas ou fatores complementares, bem como células fagocíticas como granulócitos, monócitos/ macrófagos e natural killers, dentre as várias funções atribuídas a principal é fagocitar microrganismos e restos de tecidos, além de secretar uma resposta imune para gerar fatores de regulação e unir as respostas imunes inata e adaptativas (SEGNER *et al.*, 2012).

Somados ao suscitado, é importante realçar a atuação das células que compõem essa segunda categoria imune, como é o caso da fagocitose em que as principais células envolvidas em seu processo são neutrófilos e macrófagos que removem bactérias principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio durante uma explosão respiratória. Além disso, os neutrófilos possuem mieloperoxidases em seus grânulos citoplasmados, que na presença de haletos e do peróxido de hidrogênio acaba matando as bactérias por halogenação da parede celular bacteriana. Além do referido é válido lembrar também das lisozimas, em que a ação bactericida atuada por essa enzima envolve a hidrólise do peptidoglicanos que constituem as paredes celulares bacterianas, resultando na lise celular (URIBE *et al.*, 2011).

A terceira linha de defesa, parte-se do sistema imunológico adaptativo ou adquirido, que é um conjunto de componentes humorais e celulares permitindo uma resposta mais específica ao patógeno que se adentrou ao corpo, além de fornecer aos organismos um mecanismo para derivar uma variação quase ilimitada de pouquíssimos genes, o que representa uma vantagem maior na luta contra invasores geneticamente modificados. Os componentes celulares envolvidos nesta resposta, são os linfócitos T e B, que intermedeiam as atuações tanto da parte humoral como a celular, os mesmos possuem antígenos com receptores específicos que são ativados por peptídeos antigênicos em com proteínas denominadas MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), divididas em MHC classe 1 responsáveis por exibir compostos proteicos das células hospedeiras infectadas e MHC classe 2, que apresentam os antígenos (SEGNER *et al.*, 2012).

Uma parte corporal dos animais em estudo no qual é bastante importante ressaltar a imunologia que a envolve é do intestino, pois é nesta região em que o probiótico se estabiliza e realiza sua função de atividade imunoestimulatória, é válido ressaltar também que o sistema imunológico que constitui esse órgão é referido como tecido linfoide associado ao intestino (GALT). Em detrimento aos mamíferos, os peixes não têm manchas de Peyer, que secretam *IgA* e transportadores de antígeno M no intestino e essa tarefa acaba sendo realizada por células linfóides difusamente organizadas, macrófagos, granulócitos e *IgMs* localizados na mucosa.

Somados ao suscitado, acredita-se que a atuação dos probióticos e seus componentes partem-se da interação com a GALT para induzir a resposta imune, fazendo com que as bactérias “saudáveis” não se conectem através das células epiteliais por possuir apenas as partículas antigênicas ou produtos degradados (NAYAK, 2010).

3.7.5. Competição pela absorção de ferro

Todos os organismos, incluindo bactérias, requerem uma fonte contínua de nutrientes para sobrevivência, crescimento e proliferação, sendo o ferro como o mais importante, pois é um elemento necessário para a replicação de DNA, transporte de oxigênio, proteção contra estresse oxidativo, atividade enzimática e geração de energia. É válido ressaltar que uma das primeiras linhas de defesa contra infecções bacterianas, advém da retenção de nutrientes com intuito de prevenir o crescimento bacteriano, através de em um processo denominado imunidade nutricional, em que a forma mais significativa de sua atuação é o sequestro de ferro nutriente. Além disso, grande parte do ferro dos vertebrados é intracelular, sequestrado dentro da proteína de armazenamento de ferro ferritinas ou complexada dentro do anel de porfirina da heme como um cofator de hemoglobina ou mioglobina. Somados a isso, o ambiente aeróbico e o pH neutro do soro sanguíneo garantem que o ferro extracelular seja insolúvel e, portanto, de difícil acesso por meio de patógenos invasores, essa barreira é reforçada por meio da proteína sérica transferrina, que atua unindo o ferro em uma constante de associação. Juntando, esses fatores garantem-se que a quantidade de ferro livre disponível para bactérias invasoras seja muito menor do que o necessário para se replicar e causar doenças (SKAAR, 2010).

Para prosperar dentro dos vertebrados, as bactérias devem possuir mecanismos para evitar a imunidade nutricional, visando contornar essa situação a maioria dos microrganismos através de mecanismos de absorção de ferro de alta afinidade que competem contra o sequestro mediado pelo hospedeiro. Esses sistemas de absorção podem ser divididos em três categorias principais: sideróforos, sistemas de aquisição de heme e receptores transferrina/lactoferrina (SKAAR, 2010). No caso dos probióticos, a maior delineação, advém dos sideróforos, que são produtos bacterianos, que possuem afinidade para captar e transportar íons de ferro, além de serem importantes na comunicação química de bactérias, somados a isso, são agentes de quelatação de íons férricos específicos que podem dissolver o metal precipitado e torná-lo aproveitado para o crescimento microbiano. Presumiu-se ainda que durante a competição final por ferro, as bactérias podem agravar a biossíntese dos sideróforos e utilizar o maquinário para superar a pirataria dos mesmos ou permitir o uso para comunicação química específica entre

cepas. Em suma, o valor biológico dos sideróforos reside em sua capacidade de capturar o essencial do meio ambiente e privar os concorrentes dele e assim competir com sucesso pelo ferro no ambiente (IBRAHEM, 2015).

3.8. Probióticos e sua influência na qualidade da água

Há um interesse considerável no uso de probióticos para melhorar as condições de produção nas lagoas de aquicultura, nos quais os mecanismos de ações visam agregar maior qualidade na água e a auxiliar na remoção de materiais tóxicos da água (IBRAHEM, 2015). Parâmetros de qualidade da água como acidez, alcalinidade, oxigênio dissolvido (DO), dióxido de carbono, nitrato, fósforo, amônia e dureza desempenham papel vital na produção de peixes nas indústrias de aquicultura, sendo que uma baixa qualidade de água (baixa DO, alta amônia, nitrato alto etc.) auxiliam a aumentar a porcentagem de suscetibilidade de doenças nas indústrias de piscicultura que estão fortemente ligadas a composição da água no qual se localizam os cultivares. Com relação a aplicação do *Bacillus* sp, por ser uma bactéria gram-positiva, possui maior eficiência do que espécies de bactérias gram-negativas, no que se tange na conversão de matéria orgânica a CO₂, resultando na conversão de uma maior porcentagem de carbono orgânico para biomassa bacteriana ou mais conhecida como lodo (TUAN, DUC e HATAI, 2013).

Por base no suscitado, Dalmin *et al.*, (2001), buscando analisar a influência da espécie de gênero *Bacillus*. em lagoas de cultivo de *Penacus monodon* (camarão), acrescentou aos locais de produção o microrganismo, os resultados obtidos foram que houve uma diminuição na presença de *vibrios*, o que auxilia na diminuição de doenças ocasionais no espaço, devido ao fato de que os *Bacillus* secretam enzimas que degradam as camadas de limo contendo esses patógenos.

3.9. Probióticos e as tecnologias de encapsulação

A tecnologia de encapsulamento de probióticos (PET) é uma tecnologia de imobilização de microrganismos, em materiais semipermeáveis e compatíveis que modulam a liberação de células. É válido ressaltar que os termos imobilização, aprisionamento e encapsulação têm sido destacados de forma indistintamente em grande parte da literatura relatada. Partindo-se do exposto, define-se que o encapsulamento é o processo de formação de um revestimento contínuo em torno de uma matriz interna que está totalmente contida dentro da parede da cápsula como um núcleo de material encapsulado, a imobilização se refere ao aprisionamento de material dentro ou através de uma matriz. O primeiro método destacado, tende a estabilizar as células, potencializando sua viabilidade e estabilidade durante a produção, armazenamento e manuseio, bem como acontece com o segundo que confere proteção adicional às células probióticas durante a reidratação. À medida que a técnica de imobilização ou aprisionamento se tornou refinada, a tecnologia de imobilização celular evoluiu para a tecnologia de encapsulamento celular, também denominada como PET (GBASSI e VANDAMME, 2012).

A microencapsulação tem sido utilizada com a finalidade de proteger as bactérias probióticas das condições adversas do trato digestivo, como os meios ácidos, os sais biliares, oxigênio, altas temperaturas, e no tempo de armazenamento. Para fornecer a devida proteção e a sobrevivência das bactérias probióticas durante armazenamento e na digestão, desenvolveu-se diferentes métodos de microencapsulação, que são: extrusão, emulsão, secagem por pulverização e entre outros, o objetivo é que os probióticos sejam retidos numa matriz reconhecida como segura (GRAS), que pode ser construída por meio de alginato, carragena, gomas, pectina, quitosana, inulina, proteínas do soro do leite e insolúveis afim de garantir a integridade do microrganismo, tanto no alimento como na parte superior do trato gastrointestinal (DE ARAÚJO ETCHEPARE, 2015). Vale-se ressaltar que os solventes envolvidos na tecnologia de encapsulamento devem ser atóxicos, além disso, deve-se avaliar as condições de liberação do probiótico encapsulado por meio de um modelo do trato gastrointestinal, o que delinearía uma possível ideia do comportamento das células ao serem ingeridas e degradadas (GBASSI e VANDAMME, 2012).

Com relação aos materiais do encapsulamento, deve se levar em conta fatores para sua aplicação partindo-se das propriedades físico-químicas (composição química, morfologia, resistência mecânica, estabilidade em fluidos gástricos e intestinais), ensaio de toxicologia, processos de fabricação e esterilização. Tomada essas questões, os biomateriais tem sido uma

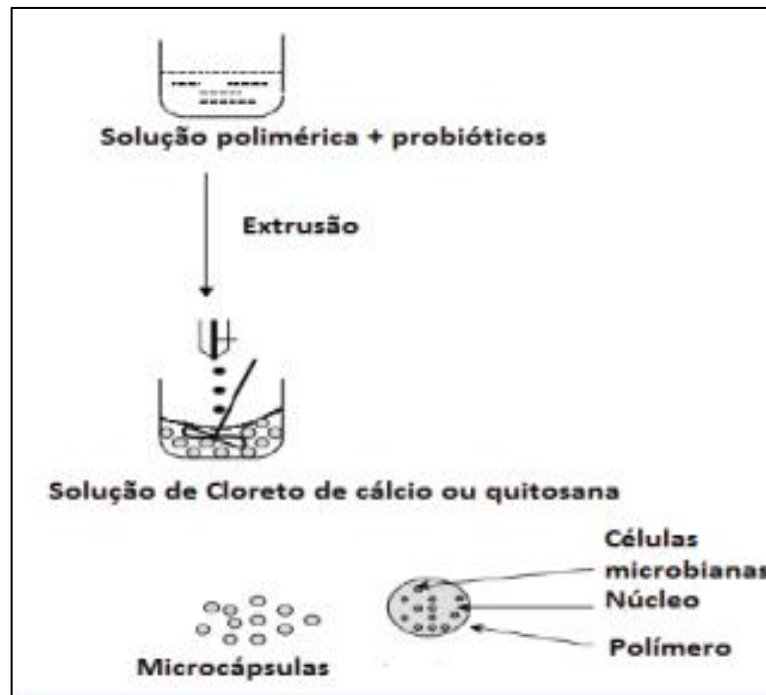
boa opção, por serem macromoléculas orgânicas de fácil absorção e tem-se como principal composto de utilização o alginato, um polímero de estrutura heterogênea, composto por duas unidades de monossacarídeos o ácido α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M) ligados por ligações glicosídicas β (1-4). O aparecimento desses monômeros G e M nas cadeias de alginato ocorrem em blocos de sequências alternadas, não aleatoriamente determinando a funcionalidade dos mesmos. A força do gel é particularmente importante porque a proporção do bloco G é alta, tornando-o resistente a temperaturas consideravelmente mais elevadas, no qual sua dissolução em água só ocorre em uma faixa de 60 °C a 80 °C. Somando a condição especificada, os géis de alginato também são conhecidos por serem insolúveis em meio ácido e por esse fator apresentam uma proteção básica contra a acidez às células encapsuladas (GBASSI & VANDAMME, 2012).

Além do alginato existem outros compostos, que estão sendo estudados para serem aderidos, como a carragena, quitosana e o ftalato de acetato de celulose (CAP). Todavia existem entraves, o que os tornam menos atrativos que o alginato, partindo-se do primeiro citado, o empecilho advém da necessidade de aquecimento antes de seu uso em temperaturas que variam de 40°C a 45°C caso contrário, o gel endurece à temperatura ambiente. Com relação ao segundo material, a resistência a pH's superiores a 5 e 4, interferem fortemente na solubilidade, impedindo a liberação completa desse biomaterial no intestino, caso o pH no local ultrapasse a faixa limiar estipulada para sua atuação. Por fim, o ftalato de acetato de celulose, apresenta como uma barreira para seu uso e a não formação de grânulos de gel por gelificação ionotrópica, gerando apenas cápsulas para obter a emulsificação com este biomaterial (GBASSI e VANDAMME, 2012).

Para selecionar a melhor tecnologia de microencapsulação, deve ser levado em conta técnicas suaves e não agressivas com as células. As primeiras técnicas de encapsulamento desenvolvidas para melhorar a vida de prateleira dos probióticos foram transformar culturas de células em pó seco concentrado, como é o caso das técnicas de secagem por spray, liofilização ou secagem em leite fluidizado. No entanto apresentam limitações, pois as células encapsuladas por essas técnicas são completamente liberadas no produto deixando as células desprotegidas em relação ao ambiente da matriz alimentar e na presença de fluido gástrico ou bile. Observado essas presentes metodologias, a extrusão tem sido a que mais se encaixa nas características dos probióticos, por ser um biomaterial, que gera um grânulo de gel, que protege o material de interesse (GBASSI e VANDAMME, 2012). Esse método físico se baseia na gelificação externa do alginato, capturando o material nessa solução, para depois sofrer extrusão gota a gota, através de uma pipeta de calibre reduzido ou de uma seringa, para uma solução de cloreto de

cálcio (CaCl_2), as partículas devem permanecer por cerca de 20 minutos em contato com o composto iônico, para atingir estabilidade e resistência mecânica, além de que quanto o maior o tempo de contato das partículas com a solução, maior a parede criada ao redor da cápsula e assim como consonância, maior resistência a rupturas mecânicas. (ETCHEPARE *et al.*, 2015)

Figura 8: Método de Extrusão



Fonte: (ETCHEPARE *et al.*, 2015)

Buscando-se identificar a capacidade de sobrevivência em processos de extrusão para microrganismos da espécie de gênero *Bacillus*, vários autores, identificaram a capacidade das espécies em sobreviver a esses procedimentos sem que afete as principais contribuições dos probióticos ao meio em que lhe foi designado. Conforme suscitado, NIU *et al.*, (2018), utilizando-se de cepas indígenas oriundas do intestino de *Paralichthys olivaceus*, identificadas e selecionadas através da técnica de rRNA 16s, obtiveram o microrganismo de estudo, *Bacillus licheniformis*. Os autores identificaram a não susceptibilidade aos antibióticos oxacilina e clindamicina, com relação as enzimas, obtiveram-se produção de fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, fosfatase ácida e naftol-as-bi-fosfo-hidrolase, em questão a adesão a mucosa intestinal apresentou formação de biofilmes, que auxiliam na conexão com a mucosa e em conjunto uma alta taxa de esporulação, por fim os autores delegam a capacidade de sobreviver a baixos pH's e que mesmo com o processo de extrusão, a bactéria foi capaz de se desenvolver.

Em consonância Guo *et al.*, (2016), partindo-se dos mesmos princípios de isolamento de amostras do trato gastrointestinal de *Ctenopharynodon idellus*, por meio de técnicas de isolamento e identificação, buscou-se estudar o comportamento de *Bacillus subtilis*, em que atribuiu-se resistência a compostos de classe antibiótica como: estreptomicina, ampicilina e clindamicina, altas taxas de esporulação, o que lhe garante um maior espalhamento na microbiota e melhor índice de atuação, fato também designado no que tange a produção de biofilmes de proteção, que apresentaram índices favoráveis e por fim o fator mais importante, uma boa resistência a pH's baixos, que são bases para a constituição dos locais de adesão e trabalho dos probióticos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse trabalho, foi possível denotar que os probióticos constituídos principalmente por bactérias da espécie de gênero *Bacillus*, e associados a alimentação de peixes da espécie *Piaractus mesopotamicus*, possuem grande potencial de implantação e transformação das relações entre os animais e os viveiros da piscicultura. Observou-se também a gama de benefícios transmitidos ao animal, dentre os quais a imunidade e o combate a patógenos, são os pontos-chaves para aderir cada vez mais o produto. É válido ressaltar em consonância, que o uso mitiga a adesão de antibióticos na cultura de peixes, evitando a transferência cruzada de genes de resistência ao consumidor e aos patógenos.

Com relação aos microrganismos oriundos do gênero *Bacillus*, sublinha-se sobretudo a sua capacidade de esporulação, que proporciona uma atuação mais efetiva, devido a proteção que esses esporos geram, fazendo com que os métodos de ação, concebam os benefícios esperados. Outro fator a ressaltar é a extrusão que acrescenta a esse arcabouço uma segunda proteção, garantindo ainda mais a capacidade de atuação, ao adentrar no trato gastrointestinal dos peixes.

A comercialização desses candidatos é importante para a prática de aquicultura sustentável, em que os animais tenham um local de vivência que proporcione um bom desenvolvimento, tendo em vista que o bem-estar dos mesmos, afeta sobretudo ao produto final, em questão de palatabilidade e textura. Os probióticos são uma excelente maneira de contornar um setor explorativista, apresentando uma tecnologia mais sustentável, para isso é necessário ampliar-se as pesquisas para elucidar partes ainda tomadas pela incógnita, como é o caso da defesa imunológica, método de atuação no combate contra diferentes tipos de patógenos, produção de enzimas extracelulares e atuação no trato gastrointestinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, Hikmate *et al.* Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*, v. 35, n. 1, p. 201-232, 2011

ALVES, Everton Giovanni *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

BAGHERI, T *et al.*, 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 8:43-48.

BALCÁZAR, José Luis *et al.* The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

BANERJEE, Goutam; RAY, Arun Kumar. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in veterinary science**, v. 115, p. 66-77, 2017.

BARBOSA, Teresa M. *et al.* Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 968-978, 2005.

BARTH, S. *et al.* *Escherichia coli* Nissle 1917 for probiotic use in piglets: evidence for intestinal colonization. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1697-1710, 2009.

BAYLEY, Peter B.; PETRERE JR, Miguel. Amazon fisheries: assessment methods, current status and management options. **Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences/Publication speciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques**. 1989., 1989.

BERNARDEAU, M. *et al.* Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 8, p. 2570-2584, 2017.

BICUDO, Álvaro José de Almeida. Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BIRKBECK, T. H.; RINGØ, E. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: **Biology of Growing Animals**. Elsevier, 2005. p. 208-234.

BLAIN KENNEDY, Sarah *et al.* Bacterial management strategies for stock enhancement of warmwater marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). **Bulletin of Marine Science**, v. 62, n. 2, p. 573-588, 1998.

BOLÍVAR-RAMÍREZ, Norha Constanza *et al.* Performance of pacific white shrimp fed probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus spp.* in a biofloc system. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, 2021.

BOUTIN, Sébastien; AUDET, Céline; DEROME, Nicolas. Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 662-670, 2013.

CASTAGNOLLI, Newton; CYRINO, Jose Eurico Possebon. Piscicultura nos trópicos. 1986.

CHERIF, Ameer *et al.* Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1. 7, a new strain isolated from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 243-247, 2001.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 251-256, 2004.

CLAUDIANO, Gustavo S. *et al.* Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, v. 88, p. 259-265, 2019.

COSTA, Gerlane Medeiros *et al.* DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS DO PACU (*Piaractusmesopotamicus*).

DALMIN, G.; KATHIRESAN, K.; PURUSHOTHAMAN, A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. 2001.

DAS, Paramita *et al.* Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. **Turkish Journal of Zoology**, v. 38, n. 1, p. 79-88, 2014.

DE ARAÚJO ETCHEPARE, Mariana *et al.* Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. *Ciência e Natura*, v. 37, n. 5, p. 75-86, 2015.

DIAS, D. C. *et al.* Uso de probióticos em ração de rã-touro (*Rana catesbeiana*): desempenho produtivo. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 220, p. 449-455, 2008.

DOBSON, Alleson *et al.* Bacteriocin production: a probiotic trait? **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2012.

DRIKS, Adam. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1249-1251, 2004.

DUC, LE H. *et al.* Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 4, p. 2161-2171, 2004.

FAO/WHO, 2018. The State of world fisheries and aquaculture. Disponível em: https://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html#chapter-1_1. Acesso em: 02 de dezembro de 2021.

FARIAS, Thaís Heloísa Vaz *et al.* Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 137-144, 2016.

- FARIAS, Thaís Heloísa Vaz. Probiótico na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*): avaliação hematológica, bioquímica, imunológica e desempenho produtivo. 2012.
- FERNANDES, João Batista Kochenborger; CARNEIRO, Dalton José; SAKOMURA, Nilva Kazue. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 617-626, 2001.
- FERREIRA, Milena Wolff *et al.* Mortalidade em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) ocasionada por *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa* em tanque escavado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, p. 379, 2019.
- FULLER, Roy. History and development of probiotics. In: **Probiotics**. Springer, Dordrecht, 1992. p. 1-8.
- GASTALHO, Soraia; SILVA, Gabriela; RAMOS, Fernando. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.
- GATLIN III, Delbert M. Nutrition and fish health. In: **Fish nutrition**. Academic Press, 2003. p. 671-702.
- GBASSI, Gildas K.; VANDAMME, Thierry. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 149-163, 2012.
- GHOSH, Koushik *et al.* Evaluation of gut associated extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory microbial community as potential probiotics in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Aquaculture**, v. 7, 2017.
- GUEIMONDE, Miguel *et al.* Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 202, 2013.
- GUNASEKARA, RAYS Asanka *et al.* Evaluation of probiotic effect of *Aeromonas hydrophila* on the development of the digestive tract of germ-free *Artemia franciscana* nauplii. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 393, n. 1-2, p. 78-82, 2010.
- GUO, Xia *et al.* Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 52, p. 74-84, 2016.
- HONG, Huynh A.; DUC, Le Hong; CUTTING, Simon M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 813-835, 2005.
- HOTEL, Amerian Córdoba Park; CORDOBA, A. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Prevention**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2001.

- HUANG, JEN-MIN *et al.* Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 195-203, 2008.
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal de 2019. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf. Acesso em: 2 de dezembro de 2021.
- IBRAHEM, Mai D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 765-791, 2015.
- ISHIKAWA, Shu. Simultaneous PCR detection of multiple classes of integron integrase genes for determining the presence of multidrug-resistant bacteria in environmental samples. **Current microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1677-1681, 2011.
- JACKSON, Robert W. *et al.* The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile genetic elements*, v. 1, n. 1, p. 55-65, 2011.
- JOMORI, Rosângela Kiyoko *et al.* Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.
- JR, Miguel Petrere. River fisheries in Brazil: a review. **Regulated Rivers: Research & Management**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 1989.
- KESARCODI-WATSON, Aditya *et al.* Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1-14, 2008.
- KIM, Young-Ok *et al.* Identification and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus* sp. SW1-1 that exhibits antibacterial activity against fish pathogens. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 605-612, 2014.
- KONG, Weiguang *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal mucosal barrier function damage and inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- KUEBUTORNYE, Felix KA; ABARIKE, Emmanuel Delwin; LU, Yishan. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 820-828, 2019.
- LEE, Jaekoo *et al.* *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 25, n. 4, p. 577-585, 2012.
- LILLY, Daniel M.; STILLWELL, Rosalie H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.
- MARAGKOUidakis, Petros A. *et al.* Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 3, p. 189-199, 2006.

MEERAN, Mohideen *et al.* Effect of probiotic on microbiological and haematological responsiveness of cat fish (*Heteropneustes fossilis*) challenged with bacteria *Aeromonas hydrophila* and fungi *Aphanomyces invadans*. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 6, n. 12, 2015.

MERRIFIELD, Daniel L. *et al.* The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1-18, 2010.

MERRIFIELD, Daniel L. *et al.* Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 8, p. 1268-1272, 2010.

MOHAPATRA, S. *et al.* Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 97, n. 3, p. 405-430, 2013.

MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 351-358, 1998.

NAYAK, Sukanta Kumar. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & shellfish immunology*, v. 29, n. 1, p. 2-14, 2010.

NEWAJ-FYZUL, Aweeda *et al.* *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1699-1706, 2007.

NITHYA, Vadakedath; HALAMI, Prakash M. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 129-137, 2013.

NIU, Kai-Min *et al.* Autochthonous *Bacillus licheniformis*: Probiotic potential and survival ability in low-fishmeal extruded pellet aquafeed. **Microbiology Open**, v. 8, n. 6, p. e00767, 2019.

OLMOS, Jorge *et al.* *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *J MicrobBiochem Technol*, v. 6, n. 7, p. 361-365, 2014.

OSHIRO, ELIANA. Prebiótico e probiótico na dieta de tilápia-do-Nilo: perfil hematológico, resposta imune inata e desempenho zootécnico. 2015.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim Nutr Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

RASUL, M. G.; MAJUMDAR, B. C. Abuse of antibiotics in aquaculture and its effects on human, aquatic animal and environment. **The Saudi Journal of Life Sciences**, v. 2, n. 3, p. 81-88, 2017.

RINGØ, Einar; GATESOUBE, François-Joël. Lactic acid bacteria in fish: a review. **Aquaculture**, v. 160, n. 3-4, p. 177-203, 1998.

RINGØ, E.; STRØM, E.; TABACHEK, J.-A. Intestinal microflora of salmonids: a review. **Aquaculture Research**, v. 26, n. 10, p. 773-789, 1995.

ROMERO J, FEIJOÓ C, NAVARRETE P. Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives; In: Carvalho E, editor. **Health and Environment in Aquaculture**. 2012.

ROTTA, Mauricio Aurélio. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa Pantanal-Documents (INFOTECA-E)**, 2003.

SADO, Ricardo Yuji. **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SCHREZENMEIR, Jürgen; DE VRESE, Michael. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 361s-364s, 2001.

SEGNER, Helmut *et al.* Fish immunotoxicology: research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology. 2012.

SEJAS, Lilian M. *et al.* Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 27-35, 2003.

SIHAG, Ram C.; SHARMA, Parvati. Probiotics: the new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 7, n. 2, p. 72-103, 2012.

SKAAR, Eric P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 8, p. e1000949, 2010.

SMITH, Peter R. *et al.* Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. **Guide to antimicrobial use in animals**, v. 207, 2008.

TUAN, Tran Ngoc; DUC, Pham Minh; HATAI, Kishio. Overview of the use of probiotics in aquaculture. **International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture**, v. 3, n. 3, p. 89-97, 2013.

URIBE, C. *et al.* Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **VeterinariMedicina**, v. 56, n. 10, p. 486, 2011.

VENDRELL, Daniel *et al.* Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from *lactococcosis* by probiotic bacteria. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 337-345, 2008.

VERSCHUERE, Laurent *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

VIJAYABASKAR, P.; SOMASUNDARAM, S. T. Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2008.

WEBSTER, Carl D.; LIM, Chhorn (Ed.). **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. Cabi, 2002.

WUERTZ, Sven; SCHROEDER, Arne; WANKA, Konrad M. Probiotics in Fish Nutrition—Long-Standing Household Remedy or Native Nutraceuticals? **Water**, v. 13, n. 10, p. 1348, 2021.

YI, Yanglei *et al.* Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 78, p. 322-330, 2018.

YIRGA, Hiruta. The use of probiotics in animal nutrition. *J. Prob. Health*, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2015.

ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. *Informe Agropecuário*, v. 21, n. 203, p. 69-77, 2000.

ZIAEI-NEJAD, Saeed *et al.* The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 516-524, 2006.

ZHANG, Wen *et al.* The spoilage and adhesion inhibitory effects of *Bacillus subtilis* against *Shewanella* and *Pseudomonas* in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Food Science and Technology**, 2021.

ZOKAEIFAR, Hadi *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 33, n. 4, p. 683-689, 2012.