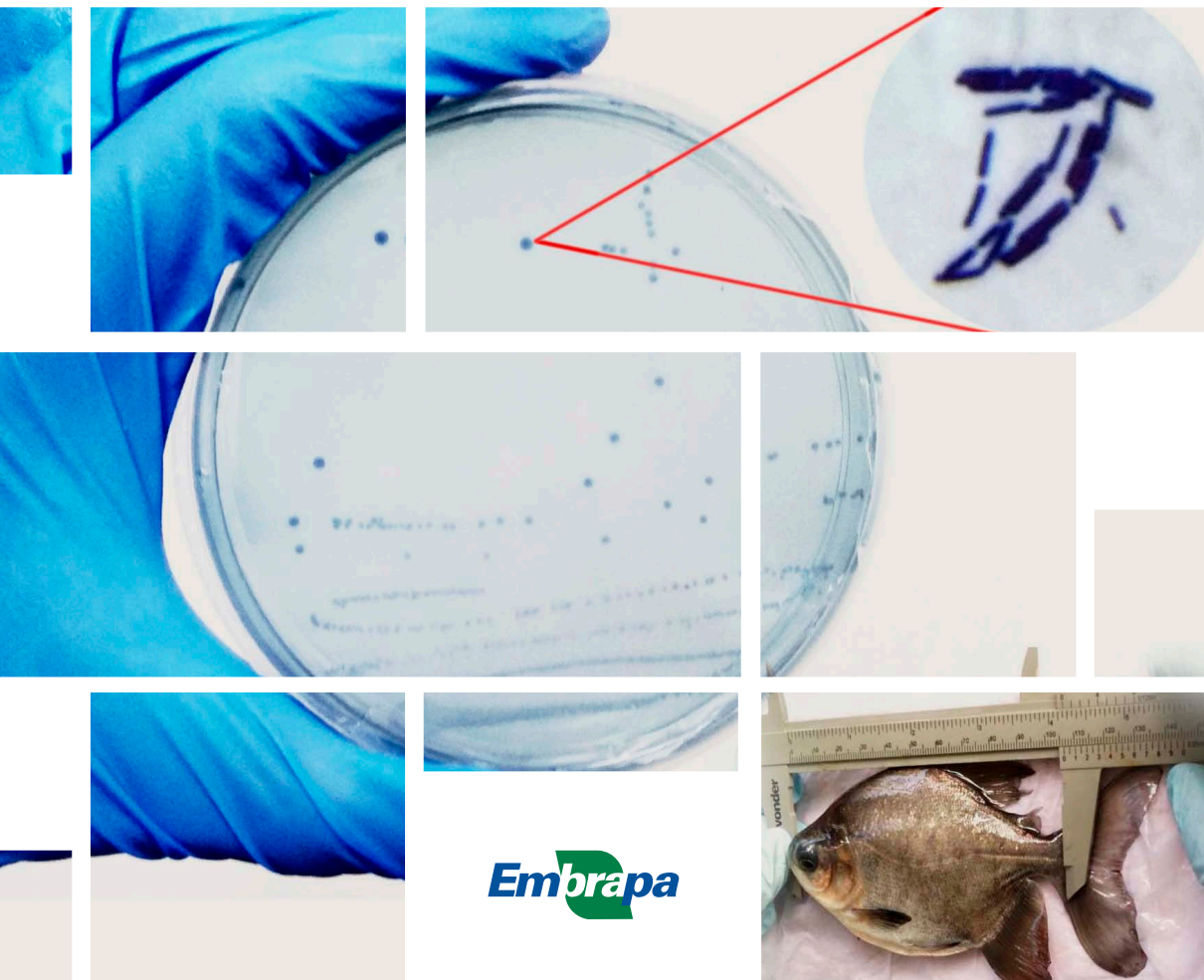


# DOCUMENTOS

217

## Seleção de bactéria espécie-específica com potencial probiótico para o tambaqui



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Tabuleiros Costeiros  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **DOCUMENTOS 217**

# Seleção de bactéria espécie-específica com potencial probiótico para o tabaqui

*Joel Artur Rodrigues Dias  
Higo Andrade Abe  
Natalino da Costa Sousa  
Marcia Valéria Silva do Couto  
Daniele Sousa da Silveira  
Carlos Alberto Martins Cordeiro  
Juliana Oliveira Meneses  
Fernanda Santos Cunha  
Peterson Emmanuel Guimarães Paixão  
Any Eduarda Nanes de Oliveira Farias  
Thays Brito Reis Santos  
Ricardo Coelho de Sousa  
Paulo Cesar Falanghe Carneiro  
Alexandre Nizio Maria  
José Luiz Pedreira Mourão  
Mauricio Laterça Martins  
Rodrigo Yudi Fujimoto*

**Embrapa Tabuleiros Costeiros**  
Aracaju, SE  
2018

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

**Embrapa Tabuleiros Costeiros**  
Av. Beira Mar, 3250  
CEP 49025-040, Aracaju, SE  
Fone: (79) 4009-1300  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente  
*Ronaldo Souza Resende*

Secretário-Executivo  
*Marcus Aurélio Soares Cruz*

Membros  
*Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva Lédo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim, Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas, Viviane Talamini*

Supervisão editorial  
*Flaviana Barbosa Sales*

Normalização bibliográfica  
*Josete Cunha Melo*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Beatriz Ferreira da Cruz*

Foto da capa  
*Joel Artur Rodrigues Dias*

**1ª edição**  
On-line (2018)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Tabuleiros Costeiros

---

Seleção de bactéria espécie-específica com potencial probiótico para o tambaqui / Joel Artur Rodrigues Dias... [et al.]. – Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018.  
16 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 217).

1. Piscicultura. 2. Tambaqui. 3. *Colossoma macropomum*. 4. Peixe. 5. Aquicultura.  
I. Dias, Joel Artur Rodrigues. II. Abe, Higo Andrade. III. Sousa, Natalino da Costa. IV. Couto, Marcia Valéria Silva do. V. Silveira, Daniele Sousa da. VI. Cordeiro, Carlos Alberto Martins. VII. Meneses, Juliana Oliveira. VII. Cunha, Fernanda Santos. IX. Paixão, Peterson Emmanuel Guimarães. X. Farias, Any Eduarda Nanes de Oliveira. XI. Santos, Thays Brito Reis. XII. Sousa, Ricardo Coelho de. XIII. Carneiro, Paulo Cesar Falanghe. XIV. Maria, Alexandre Nizio. XV. Mourinho, José Luiz Pedreira. XVI. Martins, Mauricio Laterça. XVII. Fujimoto, Rodrigo Yudi. XVIII. Série.

CDD 639.375 Ed. 21

## Autores

### **Joel Artur Rodrigues Dias**

Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, bolsista Capes, Castanhal, PA

### **Higo Andrade Abe**

Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, bolsista Capes, Castanhal, PA

### **Natalino da Costa Sousa**

Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, bolsista Capes/Embrapa, Castanhal, PA

### **Marcia Valéria Silva do Couto**

Engenheira de Pesca, mestre em Ciência Animal, bolsista Capes, Castanhal, PA

### **Daniele Sousa da Silveira**

Engenheira de Pesca, Bragança, PA

### **Carlos Alberto Martins Cordeiro**

Engenheiro Químico, doutor em Produção Vegetal, professor da Universidade Federal do Pará, Bragança, PA

### **Juliana Oliveira Meneses**

Engenheira de Pesca, mestre em Saúde e Meio Ambiente, bolsista Capes, Aracaju, SE

### **Fernanda Santos Cunha**

Engenheira de Pesca, mestre em Saúde e Meio Ambiente, bolsista Capes, Aracaju, SE

**Peterson Emmanuel Guimarães Paixão**

Engenheiro de Pesca, mestrando em Saúde e Meio Ambiente, bolsista Capes/Fapitec, Aracaju, SE

**Any Eduarda Nanes de Oliveira Farias**

Graduanda em Biomedicina, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Thays Brito Reis Santos**

Bióloga, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Ricardo Coelho de Sousa**

Engenheiro-mecânico, mestre em Engenharia Mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Paulo Cesar Falanghe Carneiro**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Alexandre Nizio Maria**

Zootecnista, doutor em Produção Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**José Luiz Pedreira Mouriño**

Zootecnista, doutor em Aquicultura, professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

**Mauricio Laterça Martins**

Biólogo, doutor em Aquicultura, professor da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

**Rodrigo Yudi Fujimoto**

Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001.

## Apresentação

A produção de organismos aquáticos cultiváveis é o setor da criação animal que mais cresce nos últimos anos, se destacando como um dos principais contribuintes para o abastecimento mundial de alimentos. Neste cenário, o Brasil ocupa a 14<sup>a</sup> posição no ranking global, e a segunda colocação na América do Sul.

Dentre as espécies dulcícolas de grande potencialidade piscícola destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Todavia, a intensificação do seu sistema de produção com altas densidades de estocagem e manejos operacionais e nutricionais inadequados tornam a sua cadeia produtiva vulnerável a ocorrência e disseminação de doenças. Consequentemente, as taxas de mortalidade durante o ciclo de criação do animal são elevadas o que compromete diretamente o êxito desta atividade.

Como medida alternativa a esta situação, nos últimos anos o uso de rações funcionais suplementadas com prebióticos e/ou probióticos, que têm como finalidade melhorar o sistema imunológico do hospedeiro e auxiliar em seu desempenho produtivo vem sendo pesquisado pela Embrapa. Porém para o tambaqui, ainda não há registros de bactérias espécie-específicas com função probiótica para a sua produção.

Sendo assim, os pesquisadores de aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em parceria com a Universidade Federal do Pará e Universidade Federal de Santa Catarina, prospectaram bactérias espécie-específicas com potencial de uso probiótico para aplicação em diferentes fases da criação animal. As cepas probióticas selecionadas neste estudo expressaram resistência a testes *in vitro* que simularam as condições encontradas na fisiologia dos animais. Os resultados aqui abordados representam um avanço científico na produção rural nacional, apresentando um probiótico autóctone aplicável à criação de tambaquis.

*Marcelo Ferreira Fernandes*

Chefe-Geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

## Sumário

Introdução .....	8
Prospecção, Isolamento e Avaliação das Bactérias .....	9
Testes in vitro.....	10
Identificação Molecular da Cepa .....	13
Considerações finais .....	14
Referências .....	14



## Introdução

A criação de organismos aquáticos apresenta um expressivo crescimento de 6,8% ano<sup>-1</sup>, com produção média de 63,6 milhões de toneladas de animais provenientes desta atividade. O maior produtor é a China com 47,8 milhões de toneladas (FAO, 2016), e na América do Sul, o Brasil contribui com 479.399 de toneladas de pescado, ocupando a 14<sup>a</sup> colocação no ranking mundial e o segundo maior produtor das Américas, com crescimento produtivo linear com taxa de 30% ao ano, desde 2013 (FAO, 2016).

Como espécies de maior relevância econômica produzidas pelo país destacam-se a tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), carpa (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz, 1822), pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), Surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann e Eigenmann, 1889) e o tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816).

O tambaqui é o segundo maior peixe de escama do continente Sul Americano, ficando atrás apenas do pirarucu. A espécie possui grande potencialidade nos sistemas produtivos aquícolas, pela sua fácil adaptação aos alimentos formulados, elevadas taxas de produção de alevinos, acentuado desempenho produtivo, fácil manejo, tolerância a valores críticos de oxigênio dissolvido, bom rendimento de carcaça (45%), e boa demanda de mercado, que o torna uma espécie de grande interesse empresarial (Cyrino et al., 2010; Silva; Fujimoto, 2015).

Entretanto, o crescimento da produção piscícola, com o uso de altas densidades de estocagem, podem comprometer a qualidade da água e o estado fisiológico do animal, influenciando negativamente na saúde e bem estar dos espécimes em confinamento, que os tornam vulneráveis a agentes infecciosos. Para controle desses agentes são utilizados produtos químicos e antibióticos, que quando administrados de forma errônea podem selecionar bactérias resistentes aos antimicrobianos aplicados, causar alteração no balanço microbiano animal, além de elevar a poluição ambiental (Dias et al., 2011; Pinheiro et al., 2015).

Neste cenário, nos últimos anos vêm crescendo os estudos sobre o uso de probióticos incorporados na alimentação de espécies piscícolas, para

melhorar o desempenho produtivo, aproveitamento de nutrientes, além de resistência ao estresse de manejo e ação imunestimulante. Os probióticos são classificados como microrganismos vivos que ao serem inseridos na via de alimentação do hospedeiro colonizam a sua microbiota intestinal beneficiando-o na melhor absorção de nutrientes, e assim beneficiá-los em maior desempenho produtivo, estimulação imunológica e equilíbrio homeostático às condições de confinamento (Oliveira et al., 2002; Vieira et al., 2013; Araújo et al., 2018).

Como medida natural e segura ao uso de probióticos, a utilização de microrganismos espécie-específicos (autóctones) podem apresentar maior eficácia no esforço de inibir a ocorrência de agentes patogênicos, tolerar a ação dos ácidos gástricos intestinais, melhor colonização do trato intestinal e maior atuação como imunoestimulante alimentar (Araújo et al., 2018; Jatobá et al., 2018).

Neste documento é apresentada a seleção de cepas autóctones com potencial uso probiótico na criação da espécie nativa tambaqui, bem como, a viabilização da inclusão na ração como suplemento alimentar.

## Prospecção, isolamento e avaliação das bactérias

Todos os procedimentos experimentais de uso animal foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal – Embrapa Tabuleiros Costeiros (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/TABULEIROS COSTEIROS-29022016-0003) e cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A885493.

As cepas com potencial de uso probiótico foram isoladas do trato intestinal de dez juvenis de tambaqui, aparentemente saudáveis, com peso médio de  $987 \text{ g} \pm 0,20 \text{ g}$  e comprimento total de  $28,32 \text{ cm} \pm 2,34 \text{ cm}$ , obtidos do lago da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Para o isolamento das bactérias, foi realizada a insensibilização dos espécimes com solução de eugenol a  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ , desinfecção externa com solução de

álcool (70%), para posterior eutanásia pelo aprofundamento do plano anestésico e secção da medula espinhal. No qual os animais foram eviscerados, para coleta de um grama de intestino, em ambiente estéril. Os fragmentos intestinais foram macerados pela relação peso/volume (p/v) em solução salina estéril a 0,65%, utilizando gral e pistilo, posteriormente transferidos para tubos coletores totalizando 10 ml de meio de cultura caldo Man Rogosa Sharpe (MRS broth), homogeneizados e incubados durante 24 horas a 35 °C (Jatobá et al., 2008; Jatobá et al., 2018).

Após crescimento microbiológico em caldo as soluções foram novamente homogeneizadas e diluídas em fator 1:10, em cinco diluições e posteriormente semeadas (100 µl) em meio de cultura sólido, contendo 15 ml de Agar Man Rogosa Sharpe (MRSa), incubadas durante 48 horas a 35 °C. A partir desse método, as colônias de interesse (bacilos e cocos Gram-positivos) foram isolados por esgotamento em estrias em um novo meio MRSa (Jatobá et al., 2008; Mouriño et al., 2012).

A partir desta técnica, um total de 31 cepas foram isoladas e submetidas aos testes bioquímicos *in vitro* para avaliação da potencialidade probiótica. Os testes realizados foram os seguintes: absorção ao indicador de célula probiótica, produção de catalase, resistência aos sais biliares bovino, potencialidade antagonista patogênica e viabilidade de crescimento na ração.

## Testes *in vitro*

As 31 cepas selecionadas foram negativas para a produção de catalase, 22 foram Gram-positivas, das quais 8 apresentaram afinidade para o indicador de bactérias probióticas, azul de anilina (Tabela 1). Esses testes preliminares são pré-requisitos para diferenciar as bactérias benéficas (probióticas), das bactérias patogênicas na piscicultura, que em sua maioria são produtoras de catalase, são Gram-negativas e não reagem com o azul de anilina, por não produzirem peróxido de hidrogênio, e os ácidos orgânicos, ácido acético e ácido láctico (Giraud, 1992).

**Tabela 1.** Cepas isoladas de juvenis de *Colossoma macropomum* para potencial uso como probiótico.

Cepas	Gram	Morfologia	CA	Cepas	Gram	Morfologia	CA
T1AR	+	B	*	T1A	-	C	
T12AR	+	C		T14A	+	C	*
T2AR	+	C	*	T2A	+	B	
T22AR	+	C		T22A	+	B	
T3AR	+	C	*	T23A	+	C	
T31AR	+	B		T3A	+	B	*
T32AR	-	C		T31A	+	B	
T4A	+	C	*	T32A	+	B	
T41AR	+	C		T4A	+	C	*
T42AR	-	C		T41A	-	C	
T43AR	-	C		T42A	-	C	
T5AR	-	B		T5A	-	C	
T14AR	+	C		T6A	-	C	
T6AR	+	B		T62A	+	B	
T1A	+	B		T64A	+	B	
T12A	+	B	*				

B- Morfologia de Bastonete; C- Morfologia cocos; CA: Colônia azul.

Para as culturas probióticas atuarem no aparelho gastrointestinal do hospedeiro devem tolerar as condições de acidez e alcalinidade digestivas e sais biliares locais. Considerando os testes empregados para avaliação destas características, a cepa T12A foi a que apresentou menor perda logarítmica de crescimento após a exposição a pH levemente ácidos e alcalinos, durante 24 horas, e manteve bom desempenho mesmo quando exposta aos sais biliares na concentração de 5% durante 24 horas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados dos testes in vitro para seleção de bactéria probiótica para o tambaqui a partir de cepas que resistiram ao crescimento em meio de cultura em laboratório e que foram negativas para a produção de catalase.

Teste in vitro	Cepas de bactérias probióticas								
	T12A	T1AR	T3A	T2AR	T3AR	T14A	T4AR	T4A	
Resistência ao pH	X								
Resistência aos sais biliares	X								
Potencial antagônico frente a patógenos	X				X		X	X	
Viabilidade de produção na ração	X		X						

As bactérias com potencial de uso probiótico isoladas de *C. macropomum* também foram submetidas ao desafio antagônico diante de seis patógenos de ampla ocorrência como: *Aeromonas hydrophyla* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Enterococcus durans* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Micrococcus luteus* (A270). As cepas apresentaram halos de inibição na presença de todos os patógenos desafiados, com média em diâmetro superior a 12 mm. Foram classificadas como bom inibidor bacteriológico, com destaque para as cepas T3AR, T4AR, T12A e T4A, que exibiram maior ação antagônica contra as bactérias infecciosas. Esse teste é de grande relevância na prevenção e controle de surtos bacteriológicos na piscicultura, pois as bactérias probióticas se caracterizam por inibir o crescimento dos patógenos no aparelho digestivo do hospedeiro, produzindo compostos antimicrobianos como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que tem a função de inibir o crescimento microbiológico invasivo (Vieira et al., 2013).

Outro teste fundamental é o de viabilidade da cepa durante o processo de armazenamento. Para tanto, foram realizados ensaios de crescimento e estabilidade dos microrganismos em armazenamento em meio de cultura durante sete dias para eventual viabilidade de produção em escala experimental e comercial. As cepas T3A, T12A, T3AR e T4A apresentaram maiores densidades logarítmicas (UFC.ml<sup>-1</sup>, Unidades Formadoras de Colônias por ml) após armazenamento, prosseguindo assim, para a inoculação na ração dos animais.

As cepas apresentaram crescimento e viabilidade estacionária em densidade bacteriológica até o 7º dia de inoculação na ração, sendo que a partir do 9º dia foi observada perda de densidade bacteriológica até o 13º dia de armazenamento da ração. As melhores respostas foram das cepas T3A e T12A, que mantiveram as suas concentrações logarítmicas de  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de ração, até o 11º dia armazenadas em ambiente refrigerado.

Isso é importante, pois as taxas mínimas de cepas probióticas para efeito terapêutico dependem de sua concentração na ração, da colonização intestinal, sendo que são indicadas concentrações na dieta de  $10^5$  a  $10^8$  UFC. ml<sup>-1</sup> ou por grama (g) na suplementação para uso animal.

## Identificação molecular da cepa

Cinco das cepas isoladas de *C. macropomum* com potencial de uso probiótico, T12A, T3A, T3AR, T4AR e T4A selecionadas após os resultados das análises in vitro, foram identificadas por métodos moleculares. O DNA das bactérias foi extraído, de acordo com o protocolo de Jin (2006), e posteriormente quantificado, pela técnica de fluorescência (Sambrook; Russel, 2001). Após a quantificação do DNA, foi realizada a amplificação por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), do gene fenilalanil-tRNA sintetase (pheS), com uso dos iniciadores pheS-21-F (5' CAYCCNGCHCGYGAYATGC 3') e pheS-23-R (5' GGRTGRACCATVCCNGCHCC 3'), eficazes para análise taxonômica de bactérias probióticas (Naser et al., 2007). Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método dideoxiterminal (Sanger et al., 1977), com o auxílio do sequenciador automático ABI 3500 XL, utilizando dos reagentes kit *BigDye* (ABI Prism TM Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – PE Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As sequências foram alinhadas e editadas no programa BioEsit (Hall, 1999), enviadas a um arquivo individual no formato FASTA, para leitura no programa *Basic Local Alignment Search Tool-Blast*. A identificação das bactérias foi realizada pela comparação de sequências depositadas no acervo do GenBank<sup>1</sup> com o uso do algoritmo MEGABLAST. Os microrganismos foram identificados com similaridade de

---

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

identidade igual a 98% como *Bacillus cereus* (T12A), *Bacillus thuringiensis* (T3A) e *Enterococcus faecalis* (T3AR, T4AR e T4A).

Apesar de poucos registros para finalidade de uso probiótico de bactérias destes gêneros, há estudos que relataram o uso de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *E. faecalis* com efeito benéficos para a produção animal. Assim considerando as respostas ao teste de potencial hidrogeniônico, resistência a sais biliares, antagonismo a patógenos e crescimento e persistência na ração, a cepa *B. cereus* (T12A) apresentou-se com maior potencial probiótico in vitro.

## Considerações finais

A cepa *Bacillus cereus* tem sido notada na piscicultura continental com grande potencialidade probiótica atuando no desempenho produtivo, avaliação de carcaça, taxa de sobrevivência e produção de células calciformes no intestino de espécies cultiváveis (Mello et al., 2013; Garcia Marengoni, et al., 2015).

O microrganismo T12A identificado molecularmente como *Bacillus cereus* isolado do tambaqui, apresentou viabilidade para uso probiótico in vitro, com resistência às condições físico-químicas que simulam a fisiologia digestiva animal. Porém, demais estudos são necessários para verificar a susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias selecionadas e o potencial enterotoxigênico das espécies de *Bacillus*. Assim como as análises in vivo são necessárias para verificar sua adaptabilidade ao trato intestinal dos animais, efetividade e definição da concentração adequada para o melhor desenvolvimento do tambaqui nas diferentes fases de criação.

## Referências

ARAÚJO, E. R. L.; BARBAS, L. A. L.; ISHIKAWA, C. M.; DIAS, D. C.; SUSSEL, F. R.; MARQUES, H. L. A.; TACHIBANA, L. Prebiotic, probiotic, and synbiotic in the diet of Nile tilapia post-larvae during the sex reversal phase. **Aquaculture International**, v. 26, n. 1, p. 85-97, 2018.

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

- DIAS, D. C.; CORRÊA, C. F.; LEONARDO, A. F. G.; TACHIBANA, L.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, p. 365-368, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture: contributing to food security and nutrition for all**. Rome, 2016. 204p.
- GARCIA MARENGONI, N.; MOURA M. C.; OLIVEIRA, N. T. E.; BOMBARDELLI R. A.; MENEZES ALBUQUERQUE, D. Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. **Latim American Journal of Aquatic Research**, v. 43, p. 601-606, 2015.
- GIRAUD, E. **Contribution a l'étude physiologique et ezimologique d'une nouvelle souche de *Lactobacillus plantarum* amyolytique isolée du mandioc fermenté**. 1992. 139 f. Thèse (Doctorat) - Université de Provence aix-Marseille, Marseille, 1992.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 1, p. 95-98, 1999.
- JATOBÁ, A.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, E.; FACHINI, F. A.; MORAES, A. V. Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 327-332, 2018.
- JATOBA, A.; VIEIRA, F. D.; BUGLIONE NETO, C. ; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilapia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, set. 2008.
- JIN, J. D. Molecular Typing Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Detection of Virulence Genes of *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* Biovar *Gallinarum*. **The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 68, p. 1321-1326, 2006.
- MELLO, H.; MORAES, J. R. E.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R. O. A.; SHIMADA, M. T.; ENGRACIA FILHO, J. R.; CLAUDIANO, G. S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 724-730, 2013.
- MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. D.; JATOBÁ, A. B.; SILVA, B. C. da; JESUS, G. F. A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on hemato immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 73-80, Fev. 2012.



NASER, S. M.; DAWYNDT, P.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT M.; SWINGS, J. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2777–2789, Dec. 2007.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p.1-2, 2002.

PINHEIRO, R. E. E.; RODRIGUES, A. M. D.; RIBEIRO, M. N.; CAVALCANTE, D. H.; PEREYRA, C. M.; MURATORI, M. C. S. Agentes biológicos no controle de aflatoxinas em piscicultura. **Nutri Time**, v. 12, n. 5, p. 4268-4279, set./out. 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SANGER, F.; NIICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SILVA, C. A.; FUJIMOTO, R.Y. Crescimento de tabaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 3, p. 323-332, 2015.

VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, E. A.; SOARES, M.; SILVA, B. C.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L.; VINATEA, L. A. *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 998-1004, ago. 2013.



---

*Tabuleiros Costeiros*



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

