

Avaliação in vitro de cepas de bactérias com potencial probiótico isoladas do trato intestinal de tambaquis

João Carlos Nunes de Souza¹, Natalino da Costa Sousa², Márcia Valéria Silva do Couto³, Higo Andrade Abe⁴, Joel Artur Rodrigues Dias⁵, Peterson Emmanuel Guimarães Paixão⁶, Juliana Oliveira Meneses⁷, Fernanda dos Santos Cunha⁸, Jéssica Queiroz Pardo⁹, Estela dos Santos Medeiros¹⁰, Ricardo Coelho de Sousa¹¹, Alexandre Nizio Maria¹², Paulo Cesar Falanghe Carneiro¹³, Rodrigo Yudi Fujimoto¹⁴

Resumo - A intensificação na produção de peixe exige dos produtores novas alternativas para alimentação visando melhorar o desempenho e imunidade desses animais, reduzindo surtos de doenças e consequentes mortalidades, principal causa de prejuízos na produção. Assim, com o presente estudo objetivou-se isolar, selecionar e identificar bactérias do trato intestinal de tambaqui *Colossoma macropomum* com o potencial probiótico por meio de ensaios in vitro. Foram isoladas 31 cepas do intestino de 15 juvenis de *C. macropomum*, sendo realizada análise bioquímica, teste de tolerância à pH (4, 5, 6, 8 e 9), sais biliares (5% p/v), halo de inibição contra *Escherichia coli* (EC), *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED), *Staphylococcus aureus* (StA) e *Micrococcus luteus* (ML), e o teste de viabilidade e inclusão na ração. Das cepas isoladas, quatro obtiveram melhores resultados nos testes in vitro e de viabilidade: *Bacillus cereus* (T12A), *Bacillus thuringiensis* (T3A), *Enterococcus faecalis* (T3AR) e *Enterococcus faecalis*. A cepa T12A foi a de melhor resposta aos testes, tendo apresentado tolerância a pH levemente ácido (pH 6, 8 e 9), maior resistência à sais biliares (91%) e maiores halos de inibição na atividade antibacteriana frente aos patógenos testados. Assim, conclui-se que o *B. cereus* é uma cepa com potencial probiótico ao tambaqui, sendo necessários testes in vivo para avaliar a melhor concentração a ser aplicada nas diferentes fases de produção.

Termos para indexação: aquicultura, probiótico, isolamento, autóctone, tambaqui.

Introdução

A intensificação da produção de pescado proporciona um ambiente estressor para os animais cultivados acarretando no aparecimento de doenças (Marcusso, Salvador; Marinho Neto, 2017). Dentre as principais doenças que representam problemas para a piscicultura, as de origem bacteriana são as que podem causar grandes perdas econômicas na cadeia produtiva em um curto tempo (Leira et al., 2017). Para o controle dessas enfermidades uso de antibióticos vem sendo utilizado de forma indiscriminada, representando um risco ambiental e de saúde coletiva, uma vez que o mau uso de bactericidas pode promover o aparecimento de bactérias resistentes (Amarante et al., 2018). Nesse âmbito, medidas alternativas ao uso de antibióticos são de grande interesse para a piscicultura. Dentre as principais medidas utilizadas atualmente com esse propósito está o uso de probióticos na dieta animal.

Diversos microrganismos podem ser utilizados como probióticos, mas uso de microrganismos da própria espécie aumenta as chances de colonização do probiótico no trato gastrointestinal e por isso deve ser priorizado (Mouriño, et al., 2016). Para selecionar as bactérias probióticas diversas avaliações químicas e físicas devem ser realizadas, simulando as alterações características ao longo do trato digestório, determinando assim as limitações à sobrevivência e a colonização intestinal da bactéria no hospedeiro (Jatobá, et al., 2017).

Apesar da importância que a suplementação com probiótico na dieta de peixe vem representando para a piscicultura a aplicação dessa tecnologia em espécies nativas é escassa, bem como, literatura existente sobre bactérias probióticas autóctones de *C. macropomum*. Desta forma, o presente trabalho objetivou isolar, selecionar e identificar cepas de bactérias com potencial probiótico do trato intestinal de *C. macropomum* através de testes in vitro.

¹Graduando em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

³Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁴Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁵Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁶Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁷Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁸Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

⁹Graduanda em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹⁰Graduanda em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹¹Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹²Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹³Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

¹⁴Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, SE. As cepas foram isoladas do trato digestório de quinze juvenis de *C. macropomum* saudáveis ($0,986 \pm 0,20$ g e $28,32 \pm 2,34$ cm), obtidas do lago da Embrapa, e da Estação de Piscicultura da Universidade Federal Rural do Pará (UFRA). Todos os procedimentos com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo nº 29022016.003.

Para a remoção do intestino, os animais foram anestesiados com eugenol (60 mg/L), eutanasiados por secção medular e desinfetados com álcool 70%. Posteriormente, foi realizada a coleta de fragmentos do intestino com peso de 0,1 g e homogeneizado em gral de porcelana com um ml solução salina estéril (0,65%) (1:10) e semeado em placa de petri com meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) ágar contendo 0,1% de azul de anilina, sendo incubadas por 48 horas a 35 °C. As cepas de interesse foram isoladas por esgotamento em placa de MRS até atingir a pureza do morfotipo isolado (Ramirez et al., 2006; Jatobá et al., 2008).

Para as avaliações *in vitro*, as cepas com potencial probiótico foram inoculadas em tubos contendo MRS caldo com distintas concentrações de pH (4, 5, 6, 8 e 9) e sais biliares a 5% (p/v), sendo então conduzidos para estufa bacteriológica a 35 °C durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura por espectrofotometria a 630 nm de absorbância. Sendo a resposta de cada cepa isolada, definida pelo percentual de redução da absorbância em comparação ao meio de cultura controle com pH (7) e sem adição dos sais biliares (Vieira et al., 2013).

Para o teste de antagonismo foi utilizada a técnica de halo de difusão, sendo retirados quatro discos (\varnothing 0,8 cm) das placas contendo as bactérias probióticas e alocadas em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA), semeadas com *Aeromonas hydrophyla* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus durans* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Micrococcus luteus* (A270), cedidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As placas foram então incubadas a 35 °C por 48 horas.

Para identificação do material genético, as cepas foram ativadas em caldo MRS durante 24 horas a 35°C. O DNA foi extraído seguindo metodologia de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), adaptado por Jin (2006). Em seguida realizada quantificação de quatro μ L da amostra com eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook; Russel, 2001).

Após quantificação do material genético foi realizado a amplificação dos genes selecionados para sequenciamento e identificação. Através da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), o isolado foi amplificado utilizando os primers de *phenylalanyl-tRNAsynthase* (pheS), com os iniciadores: pheS-21-F (5' CAYCCNGCHCGYGAYATGC 3') e pheS-23-R (5' GGRTGRACCATVCCNGCHCC 3') para análise de taxonomia de procariontos (Naser et al., 2007). Para amplificação do fragmento de DNA, as reações foram conduzidas com 2,4 μ L de DNTPs (1,25 mM), 1,5 μ L de tampão (200 Mm Tris-HCl- PH 8, 500 mM KCl), 0,6 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,6 μ L de cada um dos iniciadores (50 ng/ μ L), aproximadamente 25 ng de DNA molde, 0,1 μ L de Taq Polimerase (5 U/ μ L) e adicionado água ultrapura para completar volume final de 15 μ L da reação. O ciclo de temperatura utilizada foi de desnaturação a 95 °C durante cinco minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 58 °C/1,5 minutos, extensão a 72 °C/1,5 minutos, seguido por uma extensão final a 75 °C por 5 minutos. O sequenciamento das cepas foi realizado por eletroforese capilar, com aparelho ABI3730, utilizando-se o polímero POP7 e BigDye v.3.1, e enviados para arquivo individual para cada cepa, em formato FASTA, para leitura no sistema *Basic Local Alignment Search Tool*-BLAST, e identificadas pela comparação de suas sequências depositadas no acervo mundial GenBank¹.

Os dados obtidos foram transformados em raiz quadrada e submetidos ao teste de premissas de normalidade de Shapiro-Wilk e então à análise de variância (ANOVA), sendo o valor de F significativo, as médias foram confrontadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 31 cepas bacterianas dos juvenis de *C. macropomum*. Destas, 22 foram identificadas morfológicamente como Gram-positivas, das quais 8 apontaram afinidade com corante indicador de bactérias ácido lácticas (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas isoladas de juvenis de *Colossoma macropomum* para eventual potencialidade de uso 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	
T4AR	+	C	*	T32A	+	B	
T41AR	+	C		T4A	+	C	*
T42AR	-	C		T41A	-	C	
T43AR	-	C		T42A	-	C	
T5AR	-	B		T5A	-	C	
T4AR	+	C		T6A	-	C	
T6AR	+	B		T62A	+	B	
T1A	+	B		T64A	+	B	
T12A	+	B	*				

B- Morfologia de *Bacillus*; C- *Coccus*; (+): CA: Colônia Azul; (*): Presença.

Os testes de resistência a diferentes concentrações de pH e a ação de sais biliares (SB) são de fundamental importância (Mouriño et al., 2016) pois demonstram a capacidade da cepa isolada em resistir às alterações sofridas pelo alimento durante sua passagem pelo sistema digestório, e para isso, devem ter como resposta a sobrevivência em valores fisiológicos encontrados no animal de interesse (Jatobá et al., 2017). O pH do intestino de *C. macropomum* varia entre 7 e 8, mas o pH do estômago é muito ácido (Almeida, 2010), sendo uma barreira que pode reduzir em até 90% a densidade de células bacterianas e diminuindo a disponibilidade destas bactérias no intestino (Ramesh et al., 2017). Nas faixas de pH estudadas as cepas T3A, T4A e T12A foram as que apresentaram a menor redução de densidade em meios mais ácidos (Tabela 2). Já em relação ao teste de exposição a sais biliares (SB) a 5%, no período de 24 horas mostrou que a cepa T12A apresentou melhor resultado (Tabela 2). Testes de resistência de cepas de *Bacillus licheniformis* e *B. pumilus* isoladas de *Labeo rohita*, realizados por Ramesh et al. (2017) mostraram que a viabilidade celular destas bactérias quando expostas a sais biliares (5%) foi de aproximadamente 75 e 55%, respectivamente, valores menores que os encontrados por Zhou et al. (2018) onde cepas de *Bacillus* sp. mostraram taxa de sobrevivência superiores a 85,3% em bile a 2% durante 12 horas, apresentando resultados inferiores ao do presente estudo.

Tabela 2. Redução em porcentagem de absorvância das cepas de *Colossoma macropomum*, submetidas aos desafios frente a escalas de pH e concentração de sais biliares (SB).

CEPA	pH4 (%)	pH5 (%)	pH6 (%)	pH8 (%)	pH9 (%)	SB* (%)
T3AR	83,5±2,2A	84,5±2,7C	34,3±3,0B	37,6±4,2B	15,8±4,7B	57,8±0,9C
T4AR	86,4±1,2C	86,4±1,5D	37,9±1,4B	39,3±2,1B	29,4±2,3C	58,9±0,0C
T2AR	94,7±0,6D	92,7±0,8F	73,1±0,6E	68,2±1,0D	50,0±1,0E	58,4±1,9C
T1AR	93,8±0,3D	90,8±0,4E	53,8±0,1D	38,8±0,2B	45,0±0,2D	61,8±1,2D
T14A	85,0±1,1B	85,4±0,1C	44,1±0,2C	61,2±0,0C	42,2±0,1D	69,5±0,1E
T3A	85,1±0,0B	69,8±0,0A	8,2±0,3A	39,1±0,3B	56,9±0,1E	52,1±1,2B
T4A	86,6±0,0C	83,6±0,0C	5,7±0,3A	13,2±0,3 ^a	4,5±0,4A	60,8±0,5D
T12A	86,5±0,0C	82,8±0,0B	2,7±0,3A	14,2±0,3 ^a	7,0±0,2A	9,0±0,8A

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos na coluna pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

A atividade antibacteriana das cepas frente ao agente patogênico obteve resultados positivos frente a todos os patógenos desafiados, apresentando halos de inibição de tamanhos superiores a 12 mm (Tabela 3). As cepas T3AR, T4AR, T12A e T2AR se destacaram por apontarem maior ação antagonística frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo a cepa T3AR a cepa com maiores halos de inibição (> 18 mm) para todos os patógenos avaliados. A cepa T12A só apresentou diferença estatística para *Enterococcus durans*, quando comparado a cepa T3AR, já as cepas T4AR e T2AR apresentaram semelhança estatística com a cepa T3AR para as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus durans* e *Micrococcus luteus*. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com cepas de *Lactobacillus* sp. (Kato et al., 2016), *Bacillus* sp. (Zhou et al., 2018) e *Enterococcus faecium* (Gopalakannan; Arul, 2011).

Tabela 3. Avaliação antagonônica in vitro das cepas com potencial probiótico isoladas de juvenis de *Colossoma macropomum*. Halo de inibição (mm) frente à *Escherichia coli* (EC), *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED), *Staphylococcus aureus* (StA) e *Micrococcus luteus* (ML).

CEPA	EC(-)	AH(-)	PA(-)	ED(+)	StA(+)	MC(+)
T3AR	19,9±1,2A	19,5±1,1A	21,1±1,4A	18,1±0,4 ^a	18,3±0,1A	22,1±1,5A
T14A	16,9±0,7B	13,6±0,4D	12,5±0,5C	12,3±0,8C	17,6±2,0AB	19,9±2,0AB
T4A	17,6±0,7B	16,3±0,5B	16,8±0,3B	12,7±1,0C	16,8±0,4B	20,6±1,9A
T4AR	16,3±0,4B	19,5±0,4A	15,0±0,3B	18,7±0,7 ^a	16,5±1,4B	19,5±0,4A
T12A	19,0±0,4A	18,7±0,4AB	21,0±1,8A	14,8±0,9B	18,8±1,6A	21,7±0,4A
T2AR	17,4±0,4B	20,4±2,1A	14,2±0,2BC	18,8±1,8 ^a	17,5±0,7AB	21,5±0,5A
T3A	16,8±0,7B	17,1±0,4B	16,4±0,0B	15,4±0,2B	16,7±0,3B	17,9±0,6B
T1AR	15,5±0,3B	15,5±0,5C	15,9±0,2B	13,9±0,4BC	14,6±0,4C	18,0±0,6B

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos na coluna pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), (-): Bactéria Gram negativa, (+): Bactéria Gram positiva.

As cepas que apresentaram melhores resultados in vitro seguiram para identificação molecular, possibilitando identificar as espécies trabalhadas com nítida leitura no banco de sequências *GenBank* com 98% de similaridade de identidade, sendo identificadas como: *Bacillus cereus* (T12A), *Bacillus thuringiensis* (T3A), *Enterococcus faecalis* (T3AR) e *Enterococcus faecalis* (T4A). Estudos mostram a utilização de *Bacillus* sp. e *Enterococcus* sp. como potenciais probióticos, obtendo resultados benéficos tanto no controle de patógenos, como no desempenho produtivo (Zhou et al., 2018; Garcia-Marengon et al., 2015; Gopalakannan; Arul, 2011).

Conclusões

Com base nos resultados obtidos nos testes in vitro, é possível concluir que a espécie *Bacillus cereus* isolada de *Colossoma macropomum* apresentou melhor capacidade de suportar as condições gastrointestinais do peixe. No entanto, estudos in vivo devem ser realizados para comprovar seu potencial como probiótico, bem como a melhor concentração a ser aplicada nas diferentes fases de produção.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (432622/2016-0 e 305195/2016-6) e bolsa.

Referências

- ALMEIDA, L. C. D. **Desempenho produtivo, eficiência digestiva e perfil metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio.** 2011. 103 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- AMARANTE, J. F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A. I.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; AMARANTE, T. A. B. Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo, **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2018.
- GARCIA-MARENGON, N.; MOURA, M. C. de; OLIVEIRA, N. T. E. de; 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. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 3, 2015.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. **Aquaculture international**, v. 19, n. 5, p. 973- 985, 2011.
- HUANG, J. B.; WU, Y. C.; CHI, S. C. Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity, physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 2, p. 196-205, 2014.

- JATOBÁ, A.; MORAES, A. V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochthone probiotic for *Astyanax bimaculatus*, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1645-1652, 2017.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. D. N.; BUGLIONE NETO, C.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.
- JIN, J. D.; LEE, D. S.; SHIN, E. K.; KIM, S. J.; JUNG, R.; HAHN, T. W. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar *Gallinarum biovar gallinarum*. **Journal of veterinary medical science**, v. 68, n. 12, p. 1321-1326, 2006.
- KATO, C. D.; KAHUMA, C. E.; NAMULAWA, V. T.; KASOZI, N. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp and *Lactococcus* spp Isolated from various Parts of pebbly fish, *Alestes baremoze*. **British Microbiology Research Journal**, v. 17, p. 1-7, 2016.
- LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; DA CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS, N. P.; MELO, C. C. I. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET**, v. 11, p. 538-645, 2017.
- MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; MARINHO-NETO, F. de A. *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.
- MOURIÑO, J. L. P.; PEREIRA, G. V.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A. B.; USHIZIMA, T. T.; DA SILVA, B. C.; SEIFFERT, W. Q.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach, **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 166-171, 2016.
- 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, 2007.
- RAMESH, D.; SOUISSI, S.; AHAMED, T. S. Effects of the potential probiotics *Bacillus aerophilus* KADR3 in inducing immunity and disease resistance in *Labeo rohita*, **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 408-415, 2017.
- RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, G.; CIFFONI, E.; PANCHENIAK, E. F. R.; SOCCOL, C. R. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 264, p. 70-78, 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. A laboratory manual, 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SINGH, S. T.; KAMILYA, D.; KHETI, B.; BORDOLOI, B.; PARHI, J. Paraprobiotic preparation from *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 modulates immune response and immune relevant gene expression in *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Fish & shellfish immunology**, v. 66, p. 35-42, 2017.
- SUBHARANJANI, S.; PREMA, P.; IMMANUEL, G. Supplementation of *B. cereus* as Probiotic in Fish Feed of *Trichogaster Trichopterus* (Blue Gourami) and Calculating its Growth and Survival. **International Journal of Current Microbiology And Applied Science**, v. 4, n. 12, p. 744-751, 2015.
- VIEIRA, F. D. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, E. A.; SOARES, M.; SILVA, B. C. D.; 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, 2013.
- ZHOU, S.; XIA, Y.; ZHU, C.; CHU, W. Isolation of Marine *Bacillus* sp. with Antagonistic and Organic-Substances-Degrading Activities and Its Potential Application as a Fish Probiotic. **Marine drugs**, v. 16, n. 6, 2018.