



Seleção *in vitro* de isolados do trato gastrointestinal de *Collossoma macropomum*, com potencial probiótico

In vitro selection of isolates from the gastrointestinal tract of tambaqui, *Collossoma macropomum*, with probiotics potential

A. C. F. Souza^{1*}; J. F. Souza¹; M. D. N. Garcia Júnior¹; T. C. Rocha²; J. B. Oliveira Júnior³; P. S. Sabbadini⁴; F. N. Costa⁵

¹Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Laboratório de Microbiologia, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, 68903-329, Macapá-Amapá, Brasil

²Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, 65900-000, Imperatriz-Maranhão, Brasil

³Setor de Parasitologia/Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/PE), 50740-465, Recife-Pernambuco, Brasil.

⁴Laboratório de Ciências Biomédicas, Universidade Ceuma, 65075-120, São Luís-Maranhão, Brasil

⁵Centro de Ciências Agrárias/Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Estadual do Maranhão, 65055-310, São Luís-Maranhão, Brasil

*jr_bio2005@yahoo.com.br

(Recebido em 11 de novembro de 2022; aceito em 29 de maio de 2023)

Os probióticos são utilizados há mais de 30 anos na aquicultura, no entanto, melhores resultados têm sido demonstrados usando cepas espécies-específicas, sustentando a premissa da não utilização de probióticos alóctones. Por este motivo, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial probiótico de cepas de bactérias ácido lácticas provenientes da microbiota intestinal de tambaqui. As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com Vieira *et al.* (2013), através da reação de Gram, morfologia, produção de gás, catalase e hemólise, sendo testadas ainda quanto a sua resistência ao pH, a presença de sais biliares e NaCl, além do antagonismo frente à patógenos e perfil de resistência. Foram isoladas 28 cepas bacterianas, onde apenas quatro (CP03, CP08, CP10 e CP20) foram selecionadas na triagem inicial tendo como base as características das bactérias ácido lácticas. As cepas CP20 e CP03 foram as que melhor responderam aos testes de tolerância aos sais biliares, ao pH e à presença de NaCl respectivamente. A CP03 apresentou antagonismo apenas contra o *Staphylococcus aureus* e a CP08 e CP20 apresentaram antagonismo contra *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila*. Apenas a CP03 e CP020 foram sensíveis a todos os antibióticos testados. As cepas bacterianas CP03 e CP020 exibiram propriedades probióticas significativas, apresentando boa viabilidade aos testes de resistência *in vitro*, assim como capacidade inibitória de patógenos. Dessa maneira sendo recomendadas como possível probiótico multiespécie.

Palavras-chave: bactéria intestinal, antagonismo, autóctones.

Probiotics have been used for more than 30 years in aquaculture, however, better results have been demonstrated using species-specific strains, supporting the premise of not using allochthonous probiotics. For this reason, the objective of this study was to evaluate the probiotic potential of strains of lactic acid bacteria from the intestinal microbiota of tambaqui. The isolated bacteria were identified according to Vieira *et al.* (2013), through the Gram reaction, morphology, gas production, catalase and hemolysis, being tested for their resistance to pH, the presence of bile salts and NaCl, in addition to antagonism against pathogens and resistance profile. 28 bacterial strains were isolated, of which only four (CP03, CP08, CP10 and CP20) were selected in the initial screening based on the characteristics of lactic acid bacteria. Strains CP20 and CP03 were the ones that best responded to tolerance tests for bile salts, pH and presence of NaCl respectively. CP03 showed antagonism only against *Staphylococcus aureus* and CP08 and CP20 showed antagonism against *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. Only CP03 and CP020 were sensitive to all tested antibiotics. Bacterial strains CP03 and CP020 exhibited significant probiotic properties, showing good viability to *in vitro* resistance tests, as well as pathogen inhibitory capacity. Thus being recommended as a possible multispecies probiotic.

Keywords: gut bacteria, antagonism, autochthonous.

1. INTRODUÇÃO

O bom funcionamento do trato gastrointestinal (GTI) é essencial para a produção animal sustentável [1], portanto os probióticos podem exercer papel primordial, e já são considerados como promissores desde a sua primeira aplicação na aquicultura [2]. A definição do termo probiótico sofreu alterações no decorrer dos anos, onde Lilly e Stillwell (1965) [3] definiram de maneira equivocada como substâncias que favoreciam o crescimento de micro-organismos, porém, Hill et al. (2014) [4] os definiram da maneira mais aceita até o presente momento, como micro-organismos vivos que administrados em quantidades adequadas, geram benefícios aos hospedeiros.

No decorrer dos anos, diversas publicações foram feitas sobre o uso de probióticos na alimentação de peixes, porém pode-se encontrar muitos resultados contraditórios como afirma Ferreira et al. (2014) [5], dessa forma, várias revisões vem tentando sistematizar as informações que foram publicadas, e vários gêneros já foram utilizados em estudos comprovando o seu potencial probiótico, dentre eles *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Clostridium* entre outros. Mas representando a maioria absoluta, destacam-se as Bactérias Ácido-Láticas (BAL) e o gênero *Bacillus* [1, 6-12].

Para a bactéria ser considerada um probiótico, ela deve atender os principais critérios que foram resumidos pelo trabalho de Chauhan e Singh (2018) [13], destacando-se: Possuir algum efeito benéfico ao hospedeiro, seja no desempenho de crescimento, imunestimulação, redução dos efeitos de estresse ou conferir proteção contra patógenos; não ocasionar nenhum efeito deletério ou prejudicial ao hospedeiro; não ser resistentes à antimicrobianos; devem possuir boas características sensoriais, ação fermentativa, tolerância a liofilização (desejável); e devem exibir características específicas: Tolerância ácida e biliar; resistência às enzimas gástricas; e capacidade de adesão ao GTI.

Normalmente, estes micro-organismos passam por uma triagem in vitro para avaliar o seu potencial probiótico, que inclui caracterização fenotípica, bioquímica, e mais recentemente molecular [14, 15]. Além disso, são necessários testes de antagonismo frente à patógenos, resistência a antimicrobianos, entre outros.

Os probióticos comerciais são utilizados há mais de 30 anos na aquicultura [16] e são utilizados até o presente momento [17, 18]. No entanto, tem crescido o interesse por microrganismos autóctones nos últimos anos [19-21].

Grande parte das bactérias autóctones associadas ao hospedeiro utilizada na aquicultura é proveniente da sua própria microbiota intestinal, principalmente por já estar adaptada aquele ecossistema [20]. Resultados que sustentam a premissa da não utilização de um probiótico de aplicação global (alóctone), baseado em dois princípios básicos: as particularidades fisiológicas de cada espécie bem como a influência de inúmeros fatores ambientais [22, 23].

É importante citar que os benefícios do uso destes micro-organismos autóctones com potencial probiótico na aquicultura não se restringem ao TGI, eles são capazes de melhorar o estado geral de saúde dos organismos aquáticos [24], por intermédio de diversos mecanismos. Por estes motivos, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial probiótico de cepas de bactérias ácido lácticas provenientes da microbiota intestinal de tambaqui.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho recebeu a declaração de autorização de experimento (Protocolo CEEA nº 012/2022) em conformidade com a Lei 11.794/2008. Os peixes da raça tambaqui em idade juvenil com comprimento total médio de 262±24 mm e peso médio de 312,64±86 g, sem sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e parasitárias, foram adquiridos vivos provenientes de uma piscicultura do município de Santana – Amapá (0°03'21.9"N; 51°10'42.8"W), sendo transportados em caixas isotérmicas com oxigenação para o Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Pesquisas Científicas do Estado do Amapá – NUCTAL/IEPA, onde foram colocados em aquário com bomba de oxigênio para serem submetidos ao jejum de 24 h para esvaziamento intestinal, antes de serem eutanasiados por imersão em dose letal de benzocaína (10 mg/L). Os animais foram imersos em álcool 70% (por 30 segundos), para remoção de demais

microrganismos aderidas à superfície corpórea externa, sem afetar as bactérias internas, sendo posteriormente submetidos a uma solução salina estéril a 3% de NaCl. O isolamento das bactérias ácido-lácticas (BAL) foi realizado por meio dos métodos descritos por Gomez-Gil et al (2000) [25].

Os exemplares foram dissecados assepticamente, sendo o trato intestinal removido rapidamente e enxaguado uma única vez com solução salina estéril a 3% externamente e internamente. Foram separadas as regiões: proximal do intestino (IP), intestino distal (ID) e ceco pilórico (CP) para isolamento de bactérias autóctones.

Foram realizadas três tipos de diluições: 1) o fragmento do IP, ID e CP foram colocados em tubo tipo falcon (15 mL) acrescido de solução salina (0,65%) na proporção 1:1 do peso do fragmento para o volume da solução, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em ágar Man, Rogosa e Sharpe (Himedia®) adicionado de 1% de azul de anilina (MRS+AA) e incubados em estufa a 35°C por 48 h; 2) uma alíquota de 50 µL da diluição anterior de 1:1 foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo MRS (Micromed, Brasil) e incubado em estufa a 35°C por 24 h; 3) os fragmentos homogeneizados inicialmente em solução salina 1:1 foram retirados desta solução e colocado em outro tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo MRS e incubados a 35°C por 24 h.

Após 24 h, das diluições 2 e 3 foram retiradas alíquotas de 100 µL que foram plaqueada em ágar MRS+AA e incubadas em estufa a 35°C por 48 h, depois as colônias foram repicadas em ágar MRS novamente para isolamento bacteriano.

Todas as bactérias isoladas foram inicialmente identificadas de acordo Vieira *et al.* (2013) [26], através da reação de Gram, morfologia, afinidade com o corante, produção de gás e catalase. Os isolados ainda passaram pelo teste de hemólise para exclusão de possíveis cepas patogênicas antes da continuação da análise.

Para o padrão de hemólise, os inóculos foram estriados por esgotamento na superfície de ágar Infusão Cérebro Coração (BHI, Acumedia, Brasil) suplementado com 5% de sangue de tambaqui, que foi incubado a 35°C por 48 h. O aparecimento de zona de hemólise em torno das colônias foi o critério para determinar a atividade hemolítica [27].

Para verificar a produção de gás a partir de glicose foi empregado caldo MRS com 5% de glicose e adicionados tubos de Durham. Para determinar a atividade de catalase, foi colocado peróxido de hidrogênio em solução sobre as colônias de bactérias lácticas. A reação de produção de oxigênio é negativa com a ausência de bolhas formadas em torno das colônias, e positiva quando houver formação de microbolhas [28, 29].

As cepas ainda foram avaliadas quanto à tolerância a NaCl, onde as cepas foram incubadas a 35°C por 24 h em tubos contendo 10 mL de caldo MRS adicionado de NaCl (0%, 1,5% e 3%) em triplicata. Posteriormente, foi realizada a leitura de cada cultura em espectrofotômetro à 630 nm. A tolerância de cada cepa de bactéria isolada frente a NaCl foi determinada pela porcentagem de sobrevivência, a partir da diferença da absorbância em relação ao meio de cultura sem adição de NaCl.

Para a tolerância à bile, esta foi coletada diretamente da vesícula biliar de tambaquis saudáveis e armazenada a -20°C para posterior utilização. As cepas foram incubadas a 35°C por 24 h em tubos contendo 10 mL de caldo MRS adicionado de 5% (p/v) e 10% (p/v) de bile e sem bile, em triplicata. Posteriormente, foi realizada a leitura de 100 µL de cada cultura de cada tubo em espectrofotômetro à 630 nm. A tolerância de cada cepa de bactéria isolada frente a sais biliares foi determinada pela porcentagem de sobrevivência, a partir da diferença da absorbância em relação ao meio de cultura sem adição de sais biliares.

Para o estudo de tolerância ao pH, as cepas de bactérias foram semeadas em meio de cultura caldo MRS em diferentes pHs (3, 4, 6, 7, 8 e 9) e colocadas em estufa a 35°C por 24 h em triplicata. Posteriormente foi realizada a leitura de 100 µL de cada cultura de cada tubo em espectrofotômetro à 630 nm. A tolerância de cada cepa de bactéria isolada frente a diferentes pHs foi determinada pela porcentagem de sobrevivência, a partir da diferença da absorbância em relação ao meio de cultura com pH 7.

Para o antagonismo frente aos patógenos, foi utilizada a análise do halo de inibição para verificar a capacidade de inibição das bactérias ácido-lácticas com potencial probiótico frente a patógenos. Este método é utilizado para averiguar o potencial antimicrobiano *in vitro* das cepas probióticas [30].

Cada cepa isolada de bactéria ácido-láctica foi incubada em 10 mL de meio de cultura MRS líquido a 30°C por 48 h. Posteriormente, a cultura foi semeada em placas de petri contendo meio de cultura Ágar MRS, com inóculo de 1×10^8 UFC/mL, e incubado por 48 h a 35°C. Passado este período, foram retirados discos de 1 cm de diâmetro do meio de cultura ágar MRS com as bactérias ácido-láticas e sobrepostas na superfície do meio Ágar Mueller Hinton (MH), recém semeado com 100 μ L de solução contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 e incubadas por 24 h a 35°C. Foi considerada formação de halo de inibição do crescimento distâncias superiores a 10 mm de diâmetro.

A susceptibilidade dos micro-organismos frente aos diferentes antimicrobianos foi realizada em duplicata, de acordo com a técnica de disco-difusão, seguindo-se as normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana, descritas pelo Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (BrCAST, 2017) [31].

Foram feitos inóculos sobre a superfície de placas contendo ágar MRS e foram distribuídos os discos contendo os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, England) nas seguintes concentrações: Enrofloxacin (5 μ g, Cefar, Brasil), Amoxicilina (30 μ g, Laborclin®, Brasil), Ampicilina (10 μ g, Laborclin®, Brasil), Ciprofloxacina (5 μ g, Laborclin®, Brasil), Gentamicina (10 μ g, Laborclin®, Brasil), Sulfazotrim (25 μ g, Laborclin®, Brasil) e Tetraciclina (30 μ g, DME, Brasil). As placas foram incubadas durante 48 horas, a 35°C. Os isolados foram caracterizados como resistentes ou sensíveis a cada antimicrobiano dependendo do diâmetro do halo de inibição.

Utilizando a metodologia proposta por Rajyalakshmi et al. (2016) [32], ainda foi realizado o teste de compatibilidade dos isolados que melhor responderam aos testes anteriores. Os isolados potencialmente probióticos foram inoculados em uma linha vertical na superfície de uma placa de agar MRS com 5 mm de distância, em seguida, foi realizado um inoculado em uma linha perpendicular de 10 mm entre si. As placas foram posteriormente incubadas por 24 h a 35°C em anaerobiose, e a compatibilidade foi avaliada pela observação de zonas de inibição entre os isolados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após inoculação, foi possível constatar que a contagem de micro-organismos foi superior no ID ($3,9 \times 10^7$ bactérias.g⁻¹), quando comparado com o CP ($2,4 \times 10^4$ bactérias.g⁻¹) e IP ($4,8 \times 10^5$ bactérias.g⁻¹).

Essas diferenças da carga microbiana entre as partes avaliadas corroboram com os achados de outros estudos [33-35], que relataram aumento gradativo da carga microbiana ao longo do TGI, onde Llewellyn et al. (2014) [36], Estruch et al. (2015) [37] e Clements et al. (2014) [38] justificam estas diferenças por causa da variação estrutural e fisiológica das diferentes partes do TGI.

A partir destas contagens, foram inicialmente isoladas 28 cepas bacterianas, onde 12 foram classificadas morfológicamente como Gram positivas e apenas oito destas demonstraram afinidade com o azul de anilina, que é o corante indicador de bactérias ácido lácticas (Tabela 1). Após o teste de catalase, apenas seis cepas foram negativas (CP03, CP08, CP10, CP15, CP16 e CP20) e foram selecionadas para continuar a avaliação.

As cepas selecionadas (CP03, CP08, CP10, CP15, CP16 e CP20) foram selecionadas na triagem inicial levando em consideração as características das BAL, que devem ser Gram-positivas, catalase negativas e produtoras de ácido láctico, como o maior ou único produto fermentativo do metabolismo [39]. Porém, as cepas CP15 e CP16, mesmo possuindo estas características, foram excluídas da continuação do estudo, pois apresentaram atividade hemolítica.

Tabela 1: Aspectos morfológicos e bioquímicos da triagem inicial das bactérias isoladas em MRS ágar a partir de TGI de Tambaqui.

Nº	Gram	Morfologia	Azul de anilina	Catalase
CP01	-	Bacilos	-	+
CP02	-	Bacilos	-	+
CP03	+	Bacilos	+	-
CP04	-	Bacilos	-	+
CP05	-	Bacilos	-	+
CP06	-	Cocos	-	+
CP07	-	Cocos	-	+
CP08	+	Bacilos	+	-
CP09	+	Cocos	-	+
CP10	+	Bacilos	+	-
CP11	-	Cocos	-	+
CP12	-	Bacilos	-	+
CP13	-	Cocos	-	+
CP14	-	Bacilos	-	+
CP15	+	Bacilos	+	-
CP16	+	Bacilos	+	-
CP17	-	Cocos	-	+
CP18	-	Bacilos	-	+
CP19	+	Cocos	-	+
CP20	+	Bacilos	+	-
CP21	-	Bacilos	-	+
CP22	-	Bacilos	-	+
CP23	+	Bacilos	-	+
CP24	+	Cocos	-	+
CP25	+	Cocos	-	+
CP26	+	Cocos	-	+
CP27	-	Bacilos	-	+
CP28	-	Bacilos	-	+

As cepas selecionadas (CP03, CP08, CP10, CP15, CP16 e CP20) foram selecionadas na triagem inicial levando em consideração as características das BAL, que devem ser Gram-positivas, catalase negativas e produtoras de ácido láctico, como o maior ou único produto fermentativo do metabolismo [39]. Porém, as cepas CP15 e CP16, mesmo possuindo estas características, foram excluídas da continuação do estudo pois apresentaram atividade hemolítica.

O teste de hemólise é um parâmetro de exclusão pois a produção de hemolisina por bactéria considera-se um fator de virulência comum ocasionando anemia e edema nos hospedeiros infectados [40]. Nesse contexto citado, a análise de hemolisina e uma variável essencial a ser estudada na seleção de cepas com potencial de uso como probióticos para compor os alimentos, onde as cepas hemolíticas não são recomendadas para o uso como aditivos alimentares [41].

As quatro cepas restantes (CP03, CP08, CP10 e CP20) ainda foram testadas quanto a sua resistência ao pH, a presença de sais biliares e NaCl (Tabela 2). A tolerância e sobrevivência aos sais biliares nas concentrações de 5 e 10% foi monitorada e os resultados encontrados demonstraram queda em todos os isolados.

Apesar disso, o isolado CP20 foi o que melhor respondeu ao teste, apresentando maior tolerância, com diferenças significativas, tendo taxa de sobrevivência de $52,24 \pm 2,89\%$ e $44,58 \pm 1,74\%$ para as concentrações 5 e 10%, respectivamente. Tal achado pode estar relacionado com a capacidade da produção de hidrolases de sais biliares, que é descrito por De Smet et al. (1995) [42] como importante mecanismo de defesa de algumas espécies de BAL, favorecendo o seu crescimento.

As BAL são reconhecidas por serem eficientes na rápida colonização do TGI [43], porém Balcázar et al. (2008) [44] em seu estudo relataram que, apesar dessa rápida colonização, a ação

dos sais biliares é deletéria, reduzindo significativamente o crescimento de *Lactobacillus platarum* isolados de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Paixão et al. (2019) [45], também relataram redução do crescimento de *L. platarum* isolados de peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris*) quando exposto a concentração de sais biliares.

Vale ressaltar que os sais biliares funcionam como agentes emulsificantes, aumentando a interface lipídio-água permitindo a solubilização de gorduras e vitaminas lipossolúveis. Porém, essa propriedade afeta também a parede celular dos micro-organismos, tendo ação bactericida [46]. A concentração fisiológica de bile no TGI de peixes é em torno de 0,4 a 1,3% [44], concentrações inferiores às utilizadas neste estudo.

Tabela 2: Média e desvio padrão do percentual de sobrevivência nos testes de resistência aos sais biliares, ao pH e à presença de NaCl aplicados nas cepas selecionadas.

Cepa	SB 5%	SB 10%	pH 3	pH 4	pH 6	pH 8	pH 9	NaCl 1,5%	NaCl 3%
CP03	27,36 ±1,1 ^b	16,54 ±1,39 ^b	70,41 ±0,64 ^a	73,46 ±1,11 ^b	78,45 ±1,81 ^c	79,21 ±1,94 ^c	89,47 ±0,67 ^b	77,85 ±1,66 ^a	60,88 ±1,8 ^b
CP08	15,42 ±0,55 ^c	10,88 ±1,36 ^c	41,36 ±1,91 ^b	64,33 ±0,63 ^c	70,85 ±1,25 ^d	87,25 ±2,41 ^b	90,45 ±1,16 ^b	42,63 ±2,2 ^c	50,37 ±0,93 ^c
CP10	16,54 ±3,3 ^c	12,87 ±2,73 ^{bc}	39,94 ±1,34 ^b	47,44 ±1,23 ^d	90,84 ±1,45 ^b	92,48 ±0,84 ^a	94,16 ±1,13 ^a	57,88 ±0,9 ^b	29,45 ±1,96 ^d
CP20	52,24 ±0,31 ^a	44,58 ±0,52 ^a	73,16 ±1,9 ^a	96,35 ±1,04 ^a	98,34 ±1,35 ^a	88,45 ±1,65 ^{ab}	84,55 ±1,55 ^c	76,4 ±1,16 ^a	86,58 ±1,33 ^a

SB = Sais biliares. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Todas as cepas avaliadas ainda foram capazes de sobreviver às variações de pH testadas, porém, a CP03 e a CP20 apresentaram maior tolerância às condições ácidas e alcalinas, com taxas de sobrevivência acima de 70%. A capacidade de resistir ao pH ácido é uma característica desejável em candidatos à probióticos, pois está atribuída à sobrevivência gástrica das cepas.

No trabalho de Reda et al. (2018) [47], é destacada a boa viabilidade de espécies de BAL em condições ácidas. Dessa forma, apesar da relevância associada à sobrevivência gástrica de cepas probióticas, Conway et al. (1987) [48] e Hung et al. (2003) [49] demonstram a possibilidade de alcançar a viabilidade de cepas ácido-sensíveis no estômago por meio da indução da elevação do pH pela adição de alimentos ou por meio da oferta de mecanismos de proteção física para os micro-organismos (como por exemplo o uso de microencapsulados).

Outro fator importante é a tolerância a NaCl, pois dentre os diversos fatores físico-químicos da água, a salinidade é um parâmetro que pode interferir a viabilidade de probióticos, devido à pressão osmótica exercida [39]. Dessa forma, na presença de NaCl, as cepas CP03 e CP20 foram as que apresentaram maiores taxas de sobrevivência em ambas as concentrações utilizadas neste estudo. Paludan-Muller et al. (2002) [50] afirmam que dentre as BAL, o gênero *Lactobacillus* é um dos mais halotolerantes, com crescimento relatado em até 10% de NaCl.

A colonização e a sobrevivência dos probióticos vão depender das condições ambientais durante a sua aplicação e ingestão pela espécie hospedeira alvo [51-53]. Portanto, atender as premissas da tolerância à bile, ao pH ácido e alcalino e à presença de NaCl, é um conhecimento fundamental para o desenvolvimento de uma cepa para uso comercial [54, 55]. Além disso, ainda é possível afirmar que estes micro-organismos testados conseguiriam colonizar facilmente o TGI, e dessa forma, admite-se maior facilidade na inibição contra patógenos devido à competição de espaço e/ou nutrientes [43, 56].

Todas as cepas candidatas neste estudo apresentaram halo de inibição contra os patógenos testados, porém foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$). As cepas CP08 e CP20 apresentaram os maiores halos de inibição contra *E. coli*, *V. harveyi*, *P. aeruginosa* e *A. hydrophila* (Tabela 3), não apresentando diferenças significativas quando comparadas com os antibióticos utilizados como padrão. Já a CP03 foi a que apresentou o maior halo de inibição apenas em relação ao *S. aureus*.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos halos de inibição das cepas isoladas de tambaqui frente a patógenos elegidos.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. hydrophila</i>
Antibiótico	18,0±1,0 ^a	17,7±0,6 ^a	17,7±0,6 ^a	17,3±0,6 ^a	17,3±1,2 ^a
CP03	18,7±0,6 ^a	8,3±0,6 ^c	8,7±0,6 ^c	8,7±0,6 ^c	8,7±0,6 ^b
CP08	14,7±1,2 ^b	16,0±1,0 ^a	17,3±1,2 ^a	15,7±1,2 ^{ab}	16,7±0,6 ^a
CP10	9,3±0,6 ^c	12,3±0,6 ^b	14,3±1,2 ^b	13,7±1,2 ^b	8,7±0,6 ^b
CP20	13,7±1,5 ^b	17,3±0,6 ^a	16,7±1,2 ^a	16,7±1,2 ^a	18,7±0,6 ^a

O efeito antagônico exercido pelas BAL frente a patógenos normalmente está associado a síntese de compostos antibacterianos (ácido láctico e bacteriocinas). A maioria das bacteriocinas são importantes inibidores de espécies Gram positivas [57], enquanto que a inibição de Gram negativas tem sido relacionada à produção de peróxido de hidrogênio, bem como compostos orgânicos, ácido láctico e pantaricina [58, 59].

A capacidade de inibir o crescimento de patógenos é uma característica importante para a seleção de probióticos no ramo da aquicultura [60-62]. Diversos estudos já demonstraram a capacidade das BAL em inibir micro-organismos patógenos Gram positivos e negativos [15, 19, 21, 63], corroborando com os achados deste trabalho.

As cepas selecionadas ainda foram testadas quanto ao seu perfil de suscetibilidade aos antibióticos (Tabela 4), que demonstrou que o isolado CP08 é resistente à ampicilina, clindamicina e eritromicina; o isolado CP10 foi resistente à ampicilina e gentamicina, e os isolados CP03 e CP20 foram sensíveis a todos os antibióticos testados, corroborando com outros estudos já realizados [47, 64, 65].

Tabela 4: Suscetibilidade das cepas isoladas de tambaqui aos antibióticos frente a oito antibióticos testados.

Antibiótico	µg/disco	Isolados			
		CP03	CP08	CP10	CP20
Ampicilina	10 µg	S	R	R	S
Clindamicina	2 µg	S	R	S	S
Clorafenicol	30 µg	S	S	S	S
Eritromicina	15 µg	S	R	S	S
Gentamicina	10 µg	S	S	R	S
Kanamicina	30 µg	S	S	S	S
Tetraciclina	30 µg	S	S	S	S
Vancomicina	30 µg	S	S	S	S

S = Sensível; R = Resistente.

A sensibilidade dos probióticos a antibióticos comerciais é um dos requisitos dos probióticos, pois quando resistentes, os mesmos podem transferir seus genes para a microbiota intestinal do hospedeiro [66], portanto, a ausência de genes de resistência transmissíveis em micro-organismos potencialmente probióticos garante sua aplicação na aquicultura, bem como para o consumo seguro do pescado [67], dessa forma foram excluídas as cepas CP08 e CP10 do estudo.

Ao final dos testes de seleção *in vitro*, as cepas isoladas foram caracterizadas quanto à sua compatibilidade, não sendo identificado nenhum sinal de supressão entre os isolados, sugerindo compatibilidade, assim como encontrado por Amoah et al. (2021) [68]. Este teste de compatibilidade é realizado para verificar se os isolados podem ser usados como probióticos multiespécies ou não.

4. CONCLUSÃO

Apesar da necessidade de demonstrar *in vivo* a eficácia dos probióticos na espécie alvo, os testes iniciais *in vitro* são essenciais para poupar tempo e recurso na seleção de cepas probióticas. O presente estudo confirmou propriedades probióticas de bactérias autóctones isoladas do trato gastrointestinal de tambaqui. As cepas bacterianas CP03 e CP020 exibiram propriedades probióticas significativas, apresentando boa viabilidade aos testes de resistência *in vitro*, assim como capacidade inibitória de patógenos, sendo recomendadas como possíveis probióticos multiespécie.

O presente estudo constitui uma importante estratégia para a desenvolvimento de probióticos a partir de bactérias autóctones para tambaqui. Porém, ainda é necessária a identificação molecular das cepas selecionadas, assim como estudos de avaliação *in vivo* para determinar sua aplicação na piscicultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ringø E, Hoseinifar SH, Ghosh K, Van Doan H, Beck BR, Song, SK. Lactic acid bacteria in finfish - an update. *Front Microbiol.* 2018;9(1818):1-37. doi: 10.3389/fmicb.2018.01818
2. Kozasa M. Toyocerin *Bacillus toyoi* as growth promotor for animal feeding. *J Appl Microbiol.* 2015 Mar;118(3):727-38.
3. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965 Feb;147(3659):747-8. doi: 10.1126/science.147.3659.747
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Aug;11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
5. Ferreira CM, Antoniassi NAB, Silva FG, Povh JA, Potença A, Moraes TCH, et al. Características histomorfológicas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. *Pesq Vet Bras.* 2014 Dez;34(12):1258-64. doi: 10.1590/S0100-736X2014001200020
6. Ringø E, Gatesoupe FJ. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* 1998 Jan;160:177-203.
7. Hai NV. The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol.* 2015 Oct;119(4):917-35. doi: 10.1111/jam.12886
8. Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RR, Børgwald J, et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture.* 2010 Apr;302:1-18. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.007
9. Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999;180:147-65.
10. Hoseinifar SH, Sun YZ, Wang A, Zhou Z. Probiotic as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Front Microbiol.* 2018 Oct 12;9:2429. doi: 10.3389/fmicb.2018.02429.
11. Ringø E. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries.* 2019;5:1-27.
12. Ringø E, Van Doan H, Lee SH, Soltani M, Hoseinifar SH, Harikrishnan R, et al. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *J Appl Microbiol.* 2020 Jul;129(1):116-36. doi: 10.1111/jam.14628
13. Chauhan A, Singh R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis.* 2018 Feb;77(23):1-15. doi: 10.1007/s13199-018-0580-1
14. Asaduzzaman M, Iehata S, Akter S, Kader MA, Ghosh SK, Khan MNA, et al. Effects of host gut-derived probiotic bacteria on gut morphology, microbiota composition and volatile short chain fatty acids production of Malaysian Mahseer *Tor tambroides*. *Aquaculture Reports.* 2018 Feb;9(C):53-61. doi: 10.1016/j.aqrep.2017.12.003
15. Vale-Pereira G, Pereira SA, Soares A, Mouriño JLP, Merrifield D. Autochthonous probiotic bacteria modulate intestinal microbiota of Pirarucu, *Arapaima gigas*. *J World Aquacult Soc.* 2019;50(6):1152-67. doi: 10.1111/jwas.12638
16. Boyd CE, Hollerman WD, Plumb JA, Saeed MO. Effect of treatment with a commercial bacterial suspension on water quality in channel catfish ponds. *Prog Fish-Culturist.* 1984;46(1):36-40.
17. Dawood MAO, Magouz FI, Salem MFI, Abdel-Daim HA. Modulation of digestive enzyme activity, blood health, oxidative responses and growth-related gene expression in GIFT by heat-killed *Lactobacillus plantarum* (L-137). *Aquaculture.* 2019 Apr;505:127-36. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.053

18. Husain F, Duraisamy S, Balakrishnan S, Ranjith S, Chidambaram P, Kumarasamy A. Phenotypic assessment of safety and probiotic potential of native isolates from marine fish *Moolgarda seheli* towards sustainable aquaculture. *Biologia (Bratisl)*. 2022;77(3):775-90. doi: 10.1007/s11756-021-00957-w
19. Sun Y, He M, Cao Z, Xie Z, Liu C, Wang S, et al. Effects of dietary administration of *Lactococcus lactis* HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Fish Shellfish Immunol*. 2018 Nov;82:296-303. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.039.
20. Van Doan H, Hoseinifar SH, Ringø E, Esteban MA, Dadar M, Dawood MAO, Faggio C. Host-associated probiotic: A key factor in sustainable aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 2019;28(1):16-42. doi: 10.1080/23308249.2019.1643288
21. Feng J, Chang X, Zhang Y, Yan X, Zhang J, Nie G. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. 2019 Oct;93:73-81. doi: 10.1016/j.fsi.2019.07.028
22. Lazado CC, Caipang CMA. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2014 Jul;39(1):78-89. doi: 10.1016/j.fsi.2014.04.015
23. Lazado CC, Caipang CMA, Estante EG. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol*. 2015 Jul;45(1):2-12. doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.023
24. Mehrabi F, Khalesi M, Hazaie K. Effects of pre-and probiotics on growth, survival, body composition, and hematology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry from the Caspian Sea. *Turkish J Fish Aquatic Sci*. 2018;18(4):597-602. doi: 10.4194/1303-2712-v18_4_11
25. Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 2000;191(1):259-70. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00431-2
26. Vieira FN, Jatobá A, Mourinho JLP, Vieira EA, Soares M, Silva BC, et al. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesq Agropec Bras*. 2013 Ago;48(8):998-1004. doi: 10.1590/S0100-204X2013000800027
27. Nayak SK, Mukherjee SC. Partial purification and characterization of inhibitory substance of *Bacillus subtilis* against common bacterial fish pathogens. *Israeli J Aquacult*. 2011 Jan;63:1-5. doi: 10.46989/001c.20595
28. Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*. 1987 Set;46(3):269-80.
29. Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol*. 1989;43(1):164-7.
30. Hjelm M, Bergh O, Riazza A, Nielsen J, Melchiorson J, Jensen S, et al. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst Appl Microbiol*. 2004 May;27(3):360-71. doi: 10.1078/0723-2020-00256.
31. BrCAST. Método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Versão 6.0; 2017 [citado em 03 mar 2022]. Disponível em: <http://brcast.org.br/>
32. Rajyalakshmi K, Roopa B, Saikat DM, Priyanka D, Vadlamudi S, Subramaniam G. Characterization of potential probiotic bacteria isolated from sorghum and pearl millet of the semi-arid tropics. *African J Biotech*. 2016;16(15):613-21. doi: 10.5897/AJB2016.15212
33. Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R, Rosnes JT. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 2007 Nov;272(1-4):581-8. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.045
34. Paula-Silva FC, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ. Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol Ecol*. 2011 Nov;78(2):285-96. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01155.x
35. Das P, Mandal S, Khan A, Manna SK, Ghosh K. Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish J Zool*. 2014;38:79-88.
36. Llewellyn MS, Boutin S, Hoseinifar SH, Derome N. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front Microbiol*. 2014 Jun;5:207. doi: 10.3389/fmicb.2014.00207
37. Estruch G, Collado M, Peñaranda D, Vidal AT, Cerdá MJ, Martínez GP, et al. Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene. *PLoS One*. 2015 Aug;10(8):e0136389. doi: 10.1371/journal.pone.0136389
38. Clements KD, Angert ER, Montgomery WL, Choat JH. Intestinal microbiota in fishes: What's known and what's not. *Mol Ecol*. 2014 Apr;23(8):1891-8. doi: 10.1111/mec.12699

39. Poffo F, Silva MAC. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. Food Sci. Technol. 2011 Jun;31(2):303-7. doi: 10.1590/S0101-20612011000200004
40. Nandi A, Dan SK, Banerjee G, Ghosh P, Ghosh K, Ringø E, et al. Probiotic potential of autochthonous bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts. probiotics antimicrob proteins. 2017 Mar;9(1):12-21. doi: 10.1007/s12602-016-9228-8
41. Ouwehand A, Vankerckhoven V, Goossens H, Huys G, Swings J, Vancanneyt M, et al. The safety of probiotics in foods in Europe and its legislation. In: Goktepe I, Juneja VK, Ahmedna M, editors. Probiotics in food safety and human health. Boca Raton (US): CRC Press; 2005. p. 405-29.
42. De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne M, Cristianes H, Verstraete W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. J Appl Bacteriol. 1995 Sep;79(3):292-301. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03140.x
43. Jatobá A, Pereira MO, Vieira LM, Bitencourt M, Rodrigues E, Fachini FA, et al. Action time and feed frequency of *Lactobacillus plantarum* for Nile tilapia. Arq Bras Med Vet Zootec. 2018 Jan-Fev;70(1):327-32. doi: 10.1590/1678-4162-9870
44. Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Muzquiz JL, Girones O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 2008;278(1-4):188-91. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.014
45. Paixão PEG, Couto MVS, Sousa NC, Abe HA, Dias JAR, Meneses JO, et al. In vitro selection of autochthonous lactic acid bacterium from clownfish *Amphiprion ocellaris*. Aquaculture Res. 2019 Nov;51(3):1-4. doi: 10.1111/are.14396
46. Lambert JM, Bongers RS, de Vos WM, Kleerebezem M. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Appl Environ Microbiol. 2008 Aug;74(15):4719-26. doi: 10.1128/AEM.00137-08
47. Reda RM, Selim KM, El-Sayed HM, El-Hady MA. In vitro selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018 Dec;10(4):692-703. doi: 10.1007/s12602-017-9314-6
48. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J Dairy Sci. 1987 Jan;70(1):1-12. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(87)79974-3
49. Hung TL, Lazard J, Mariojouls C, Moreau Y. Comparison of starch utilization in fingerlings of two Asian catfishes from the Mekong River (*Pangasius bocourti* Sauvage, 1880, *Pangasius hypophthalmus* Sauvage, 1878). Aquaculture Nutrition. 2003 Jul;9(4):215-22. doi: 10.1046/j.1365-2095.2003.00244.x
50. Paludan-Muller C, Madsen M, Sophanodora P, Solitária G, Møller PL. Fermentation and microflora of Plaasom, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. Int J Food Microbiol. 2002 Feb 25;73(1):61-70. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00688-2
51. Dias JAR, Abe HA, Sousa NC, Silva RDF, Cordeiro CAM, Gomes GFE, et al. *Enterococcus faecium* as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, *Pterophyllum scalare* (Schultze, 1823). Aquaculture Internat. 2019;27:1. doi: 10.1007/s10499-019-00339-9
52. Erkkilä S, Petäjä E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Sci. 2000 Jul;55(3):297-300. doi: 10.1016/s0309-1740(99)00156-4
53. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Sci. 2004 Jun;67(2):309-17. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.11.003
54. Martins FS, Barbosa FHF, Penna FJ, Rosa CA, Nardi RMD, Neves MJ, et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. Rev Biol Cienc Terra 2005;5(2):1-14.
55. Nithya V, Halami PM. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. Ann Microbiol. 2013 Apr;63:129-37. doi: 10.1007/s13213-012-0453-4
56. Gatesoupe FJ. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. J Mol Microbiol Biotechnol. 2008;14(1-3):107-14. doi: 10.1159/000106089
57. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti and probiotics. Appl Microbiol Biotechnol. 2008 Dec;81(4):591-606. doi: 10.1007/s00253-008-1726-5
58. Vásquez JA, Gonzalez MP, Murado MA. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture 2005 Mar;245(1-4):149-61. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.12.008
59. Sugita H, Ohta K, Kuruma A, Sagesaka T. An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. Aquac Res. 2007 Jun;38:1002-4. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01765.x
60. Aly SM, Ahmed YAG, Ghareeb AAA, Mohamed MF. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica*

- (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol. 2008 Jul;25(1-2):128-36. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.013
61. Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish Shellfish Immunol. 2008 Feb;24(2):168-72. doi: 10.1016/j.fsi.2007.10.008
 62. Cornélio FHG, Cargin-Ferreira E, de Borba MR, Mouriño JLP, Fernandes VAG, Fracalossi DM. Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nylo alimentada com probióticos. Pesq Agropec Bras. 2013 Ago;48(8):863-70. doi: 10.1590/S0100-204X2013000800008
 63. Kong Y, Gao C, Du X, Zhao J, Li M, Shan X, et al. Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*). Fish Shellfish Immunol. 2020 Jul;102:412-21. doi: 10.1016/j.fsi.2020.05.003
 64. Araújo C, Muñoz-Atienza E, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM, Igrejas G, et al. Evaluation of *Enterococcus* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. Foodborne Pathog Dis. 2015 Apr;12(4):311-22. doi: 10.1089/fpd.2014.1906
 65. López Cazorla A, Sica M, Brugnoli L, Marucci P, Cubitto M. Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). J Applied Ichthyology. 2015 Jul;31(1):88-94. doi: 10.1111/jai.12496
 66. Zheng M, Zhang R, Tian X, Zhou X, Pan X, Wong A. Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. Front Microbiol. 2017 May 19;8:908. doi: 10.3389/fmicb.2017.00908
 67. Panigrahi A, Azad I. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. Fish Physiology and Biochemistry. 2007 Sep;33(4):429-40. doi: 10.1007/s10695-007-9160-7
 68. Amoah K, Dong XH, Tan BP, Zhang S, Kuebutornye FKA, Chi SY, et al. In vitro assessment of the safety and potential probiotic characteristics of three *Bacillus* strains isolated from the intestine of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). Front Vet Sci. 2021 May 28;8:675962. doi: 10.3389/fvets.2021.675962