

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E
ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*) COMO PROBIÓTICO EM PEIXES

Luciana Yuri Sato

Orientador: Prof^o Dr. Leonardo Tachibana

Co-orientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do
Instituto Pesca - APTA - SAA, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Aquicultura e Pesca**

São Paulo
Setembro 2019

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E
ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*) COMO PROBIÓTICO EM PEIXES

Luciana Yuri Sato

Orientador: Prof^a. Dr. Leonardo Tachibana

Co-orientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo
Setembro 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio.

Aos amigos e colegas de laboratório Dra. Mariene Natori, Mateus Cardoso Guimarães, Pamela Garbim, Camila Aya Tanaka Kato, Sabrina França Lopes, Diego de Souza Vicente, Said Ben Hamed, Claudio Cirineu Ciola, Gabriel Bueno da Silva, Cláudio Batista de Oliveira.

A amiga e co-orientadora Danielle de Carla Dias, por sempre estar presente em todos os momentos importantes.

Ao amigo e orientador Leonardo Tachibana pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos amigos Dra. Neuza Sumico Takahashi, Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Dr. Carlos Massatoshi Ishikawa por me ensinarem tantas coisas.

A Silvana Tapia Paniagua.

Ao Ocimar Pedro, secretário da Pós-Graduação.

Aos funcionários Raquel e Sr. Orlando pelas risadas e companheirismo com os alunos do laboratório.

As instituições FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Processo 2014/15390-1) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio e bolsa concedida para a realização do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS	2
Artigo científico 1	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1 Parâmetro de qualidade da água	11
2.2 Ensaio de desempenho zootécnico	11
2.3 Microbiologia - DGGE.....	11
2.4 Análises hematológicas	13
2.5 Atividade da lisozima.....	13
2.6 Atividade do <i>burst</i> respiratório dos fagócitos	14
2.7 Lactato enzimático.....	14
2.8 Composição química corporal.....	14
2.9 Estatística	15
3. RESULTADOS	15
3.1 Parâmetros de qualidade da água.....	15
3.2 Ensaio de desempenho zootécnico de crescimento	15
3.3 <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> (DGGE).....	17
3.4 Hemograma, glicemia, lactato <i>burst</i> respiratório, lisozima	22
3.5 Composição química dos peixes	25
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO.....	29
6. AGRADECIMENTOS.....	29
7. REFERÊNCIAS	29
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35

UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) COMO PROBIÓTICO EM PEIXES

RESUMO GERAL

O uso de sistemas intensivos de produção na piscicultura faz-se necessário para atender a demanda crescente por pescado, e como consequência negativa, possibilita o surgimento de surtos de doenças bacterianas, afetando a produtividade, a sobrevivência e o bem-estar dos animais, assim como a sua qualidade. A utilização de aditivos como os probióticos pode ser uma alternativa viável para a prevenção de agentes patogênicos, além de melhorar o crescimento dos animais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar bactérias previamente testadas *in vitro* com potencial probiótico no desempenho zootécnico e o sistema imunológico inato de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), equilíbrio homeostático, fisiológico e microbiológico. Para esta finalidade, foi realizado um ensaio de desempenho de crescimento (duração de 81 dias), seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com sete tratamentos e três repetições (21 unidades experimentais), sendo: T0 - controle, T1 - *Bacillus velezensis* na ração, T2 - *Bacillus pumilus* na ração, T3 - *Bacillus subtilis* na ração, T4 - Probiótico *Enterococcus hirae* na ração, T5 - *Enterococcus faecium* na ração e T6 - Mix de todas as bactérias dos outros tratamentos na ração. Ao final do período experimental, as variáveis de desempenho zootécnico de crescimento, DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), hematologia, lactato, lisozima e *burst* respiratório de fagócitos foram avaliadas. A inclusão das bactérias *B. pumilus* (T2) e o mix (T6), em dietas para a tilápia-do-nilo, proporcionaram o aumento da biomassa total final de peixes em relação ao controle e aos outros tratamentos. O uso destes microrganismos não afetou a saúde e o bem-estar dos peixes, sendo que os índices hematológicos, exceto basófilos e trombócitos, níveis glicêmicos e de lactato foram semelhantes com o grupo controle. As análises de DGGE demonstraram a odulação dos microrganismos presentes no intestino dos peixes. Conclui-se que as bactérias isoladas e pré-selecionadas do intestino e muco de tilápias-do-nilo do grupo T2 (*B. pumilus*) e T6 (*B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*), melhoram o desempenho de crescimento, além de modular a microbiota intestinal e podem ser usadas como probióticos para tilápia.

Palavras chave: imunologia; desempenho zootécnico; nutrição; microbiologia, hematologia

USE OF ISOLATED NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) MICROORGANISMS AS PROBIOTIC IN FISH

GENERAL ABSTRACT

The use of intensive production system in fish farming is necessary to supply the increased demand for fish products, and consequently, enable the emergence bacterial diseases outbreaks, and negatively affect the productivity, survival rates and well-fare animals, and the flesh quality. The probiotics use may be a viable alternative to prevent the diseases and improves the animal growth performance. The development of specific probiotics for Nile tilapia could be interesting since may also promotes weight gain and other performance variables. This project aimed to evaluate the capacity of potential probiotic microorganisms, in diets, to improve the performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), promote equilibrium balance of homeostasis, physiology, microbiology and upgrade the innate immunology system of the host. For this purpose, the growth performance assay (81 days of duration) was done, following the randomized experiment design with seven treatments and three replicates (21 experimental units): T0 – control group, T1 – *Bacillus velezensis*, T2 – *Bacillus pumilus*, T3 – *Bacillus subtilis*, T4 – *Enterococcus hirae* T5 – *Enterococcus faecium* and T6 – Mix of bacteria strains belonged to other treatments. The following variables were analyzed: growth performance, DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), respiratory burst activity from phagocytes, hematology and histology. As relevant result, the bacteria strains *B. pumilus* (T2) and mix (T6), included in diet for Nile tilapia, promoted better biomass values, with similar feed conversion rate of control group. Apparently, the use of these microorganisms does not affect the health and well-fare of the fish, since the hematology indices, except for basophils and thrombocytes, glycemia and lactate level were similar to control group. We concluded that the isolated and pre-selected bacteria from the intestine and mucus of group T2 (*B. pumilus*) and T6 (*B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* and *E. faecium*), improve growth performance and can be used as probiotics for tilapia.

Keywords: *immunology, growth performance, nutrition, microbiology, hematology.*

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de pescado para o consumo humano encontra-se em fase de ascensão nestas últimas cinco décadas, resultando-se em aumento nos índices de disponibilidade *per capita*. O consumo mundial aparente de organismos aquáticos aumentou de 9,90 kg na década de 1960 para 19,70 kg em 2013, podendo ultrapassar valores médios de 20 kg em 2014 e 2015. Em 2014, a aquicultura contribuiu com 44,10% da produção total de pescado, e em termos de fornecimento de alimento, esta atividade transpôs pela primeira vez a atividade pesqueira (FAO, 2016).

No Brasil, dados apresentados pela PeixeBR (2019) demonstraram que produziu-se cerca de 722,560 mil toneladas de peixes de cultivo em 2018. E dentre as espécies de peixe cultivadas, a produção da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) atingiu cerca de 400 mil toneladas (55,4% da produção total de peixes), mostrando que o Brasil é o 4º maior produtor de tilápia-do-nilo do mundo, após a China, Indonésia e Egito.

Em sistemas intensivos de produção, manter um manejo sanitário e utilizar medidas profiláticas, a fim de reduzir ou eliminar a exposição dos peixes a possíveis agentes patogênicos, envolve a utilização de protocolos sanitários adequados. (Conte, 2004).

Os antibióticos como método profilático, pode selecionar as bactérias patogênicas mais resistentes e acumulando os resíduos desses compostos no sistema de cultivo. A rápida reprodução assexuada e a troca interespecífica e intraespecífica de DNA feita pelos plasmídeos, faz com que essas bactérias patogênicas criem resistência aos antibióticos utilizados, gerando um aumento no potencial de transmissão desses patógenos de peixes ao consumidor (Gauthier, 2015, Haygood e Jha, 2016).

O uso de microrganismos como os probióticos, assim como outros aditivos como prébióticos, podem ser uma alternativa viável, como profilaxia contra agentes estressores como bactérias patogênicas, além de promover melhora no desempenho zootécnico dos animais (Hai, 2015). Para Irianto and Austin (2002), o termo probiótico foi modificado ao longo do tempo para abranger diversos pontos de vista de pesquisadores que convergem a uma definição, sendo microrganismos que possuem efeitos benéficos que possam manter a saúde de hospedeiros, sendo capazes de modificar a flora intestinal e conseqüentemente promover equilíbrio no balanço microbiano.

Os microrganismos probióticos devem possuir algumas características como: origem do hospedeiro, segurança da cepa, produção de substâncias antimicrobianas, capacidade em modular a resposta imune do hospedeiro ou competir por nutrientes com patógenos em locais

de adesão na mucosa intestinal, além de possuir capacidade de sobreviver à condições adversas do trato gastrointestinal como: ser resistente ao baixo pH, sais biliares e a enzimas (Pérez-Sánchez et al., 2014).

Uma vasta gama de espécies de microrganismos gram-negativos e gram-positivos estão sendo usados na aquicultura como probióticos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Saccharomyces*, encontrados normalmente no intestino dos hospedeiros. Os microrganismos com potencial probiótico para tilápia-do-nilo foram encontrados em intestino de mesma espécie ou em sistemas de cultivo (água e sedimentos) ou em gônadas. Como exemplo, *Bacillus amyloliquefacens* foi isolado de microflora intestinal e utilizado como probiótico em tilápia-do-nilo (Hai, 2015).

Em estudos recentes realizados por Liu et al (2017), a administração oral de *Bacillus subtilis* HAINUP40 (concentração de 10^8 UFC.g⁻¹) em tilápia-do-nilo, promoveu o aumento no ganho de peso e na atividade de enzimas digestivas, e melhorou a resposta imune contra o patógeno *Streptococcus agalactiae*. De acordo com estes autores, esta bactéria, encontrada em ambiente natural, possui características probióticas como habilidade de secretar enzimas extracelulares e resistir às condições adversas do trato gastrointestinal.

As bactérias normalmente encontradas na microbiota intestinal do hospedeiro possuem maior chance de competir com microrganismos residentes, em parte, devido a sua capacidade adaptativa frente às condições fisiológicas do hospedeiro. No entanto, estes microrganismos devem resistir a processos industriais necessários para a sua produção comercial, permanecer viáveis durante o armazenamento e ativos para promover efeitos benéficos (Etyemez and Balcazar, 2016; Pérez-Sánchez et al., 2014).

2. REFERÊNCIAS

Conte, F., 2004. *Stress and the welfare of cultured fish*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>

Etyemez, M., Balcazar, J.L., 2016. *Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Res. Vet. Sci.* 105, 62–64.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.01.019>

FAO, 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome.

- Hai, N. Van, 2015. *Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
- IBGE, 2015. *Produção pecuária municipal 2015*. Rio de Janeiro.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. *Probiotics in aquaculture*. *J. Fish Dis.* 25, 633–642. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x>
- Kumar, G., Engle, C.R., 2016. *Technological Advances that Led to Growth of Shrimp, Salmon, and Tilapia Farming*. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 24, 136–152. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1112357>
- Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W., Zhou, Y., 2017. *Dietary administration of Bacillus subtilis HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Balcázar, J.L., 2014. *Probiotics in aquaculture: a current assessment*. *Rev. Aquac.* 6, 133–146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Wang, M., Lu, M., 2016. *Tilapia polyculture: a global review*. *Aquac. Res.* 47, 2363–2374. <https://doi.org/10.1111/are.12708>
- Watanabe, W.O., Losordo, T.M., Fitzsimmons, K., Hanley, F., 2002. *Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges*. *Rev. Fish. Sci.* 10, 465–498. <https://doi.org/10.1080/20026491051758>

Capítulo 1

Artigo científico 1

**BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ISOLADAS E TESTADAS EM TILÁPIAS-DO-NILO,
*Oreochromis niloticus***

BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ISOLADAS E TESTADAS EM TILÁPIAS-DO-NILO,

Oreochromis niloticus

Luciana Yuri Sato¹, Danielle de Carla Dias², Mariene Miyoko Natori², Miguel Frederico Fernandez Alarcon², Maria José Tavares Ranzani de Paiva², Luara Lucena Cassiano³, Ana Matria Cristina P. F. Martins³, Ricardo Harakawa³, Silvana Tapia Paniagua⁴, Carlos Massatoshi Ishikawa², Mateus Cardoso Guimarães¹ e Leonardo Tachibana²

¹ Pós-graduação do Instituto de Pesca - Av. Francisco Matarazzo, 455 - Água Branca, São Paulo - SP - Brasil. CEP 05001-900

² Centro de Pesquisa em Aquicultura (CPA), Instituto de Pesca, APTA, SAA-SP. Av. Francisco Matarazzo, 455 - São Paulo, SP

³ Instituto Biológico

⁴ Universidade de Málaga

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho testar as bactérias isoladas e pré-selecionadas do intestino e muco de tilápias-do-nilo, provenientes de pisciculturas comerciais do Brasil, para sua aplicação como possíveis probióticos, adicionando-as na ração, por meio de avaliação do desempenho zootécnico, hematologia e imunologia. As bactérias utilizadas neste estudo, foram testadas previamente *in vitro*, e aprovadas nas análises de pH, bile, inibição de bactérias patogênicas e antibiograma. Foram identificadas por PCR e sequenciamento comparando-se no *software* BLAST. O experimento foi realizado no Instituto de Pesca, com duração de 81 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e três repetições, sendo: T0 - controle, T1 - *Bacillus velezensis*, T2 - *Bacillus pumilus*, T3 - *Bacillus subtilis*, T4 - *Enterococcus hirae*, T5 - *Enterococcus faecium* e T6 - Mix dos tratamentos. As variáveis analisadas foram: desempenho zootécnico, DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), *burst* respiratório de fagócitos, lisozima e hematologia. Como resultado, verificou-se que os tratamentos T2 e o T6, proporcionaram o aumento da biomassa total final de peixes, com os valores similares de conversão alimentar do grupo controle ($p < 0,05$). O uso destes microrganismos alterou a contagem sanguínea apenas de basófilos e trombócitos. Os níveis glicêmicos, lactato, *burst* respiratório e lisozima não foram diferentes entre os tratamentos. Conclui-se que as bactérias isoladas e pré-selecionadas do intestino e muco de tilápias-do-nilo do grupo T2 (*B. pumilus*) e T6 (mix - *B. velesensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E.*

faecium), melhoram o desempenho de crescimento, além de modular a microbiota intestinal e podem ser usadas como probióticos para tilápia.

Palavras chave: imunologia; desempenho zootécnico; nutrição; microbiologia, hematologia

ABSTRACT

The objective of this project was to test isolated and pre-selected bacteria strains from Nile tilapia intestine and mucus, collected in Brazilian commercial fish farming, in order to apply as probiotics, by evaluating the growth performance, hematology and immunology. These strains were submitted to *in vitro* tests of pH, bile, inhibition of pathogenic bacteria and antibiogram. Then, they were identified by PCR and sequencing, comparing using the BLAST software. The experiment was carried out in the Fisheries Institute of Sao Paulo, for 81 days, following the randomized experiment design with seven treatments and three replicates (21 experimental units): T0 - control group, T1 - *Bacillus velezensis*, T2 - *Bacillus pumilus*, T3 - *Bacillus subtilis*, T4 - *Enterococcus hirae*, T5 - *Enterococcus faecium* and T6 - Mix of bacteria strains belonged to other treatments. The variables were analyzed: growth performance, DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), respiratory burst activity from phagocytes, hematology and histology. As relevant result, the bacteria strains *B. pumilus* (T2) and mix (T6), included in diet for Nile tilapia, promoted better biomass values, with similar feed conversion rate of control group ($p < 0,05$). Apparently, the use of these microorganisms does not affect the health and well-fare of the fish, since the hematology indices, except for basophils and thrombocytes, glycemia and lactate level were similar to control group. The application of these microorganisms only altered the basophils and thrombocytes counts. The glycaemia, lactate level, respiratory burst and lysozyme activities were not different among the treatments. In conclusion, the isolated and pre-selected bacteria from intestine and mucus of Nile tilapia, *B. pumilus* (T2) and mix (T6 - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* and *E. faecium*) improve the growth performance and may be used as probiotics for Nile tilapia.

Keywords: immunology, growth performance, nutrition, microbiology, hematology.

INTRODUÇÃO

A produção brasileira de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) atingiu aproximadamente 400 mil toneladas, em 2018, apresentando um crescimento de 11,9% em relação ao ano anterior (357.639 t). Com esse desempenho, a espécie representa 55,4% da produção total de peixes de criação (PeixeBr, 2019), sendo uma espécie de grande importância nacional. Esta espécie possui a capacidade de adaptação a diversos tipos de sistemas de criações intensivas (Watanabe et al., 2002), converte alimentos como as algas e detritos (filtradores) em proteína de alta qualidade (Wang and Lu, 2016; Watanabe et al., 2002).

Em sistemas intensivos de produção, a habilidade em manter a saúde animal envolve planejamento e geração de protocolos adequados para reduzir ou eliminar a exposição de peixes a perigos que possam prejudicar a produtividade e o bem-estar animal. O uso excessivo e contínuo de medicamentos, são condutas que demonstram falhas no sistema de manejo e de produção (Conte, 2004).

A utilização de microrganismos como os probióticos, assim como outros aditivos, pode ser uma alternativa viável para prevenção contra agentes estressores e patogênicos, além de promover melhora no desempenho zootécnico dos animais (Hai, 2015).

Para Irianto e Austin (2002), o termo probiótico evoluiu ao longo do tempo e abrange diversos pontos de vista de pesquisadores que convergem a uma definição, sendo microrganismos que possuem efeitos benéficos que possam manter a saúde de hospedeiros, sendo capazes de modificar a flora intestinal e conseqüentemente promover equilíbrio no balanço microbiano.

Os probióticos comerciais, desenvolvidos para outras espécies não aquáticas, têm demonstrado pouca eficiência quando testados em peixes de cultivo com relação ao desempenho produtivo. No entanto, em experimentos realizados por Dias et al. (2012), estes aditivos proporcionaram a melhora no sistema imunológico e otimizaram os índices reprodutivos (taxa de fêmeas maduras, fecundidade e taxa de larvas sobreviventes) em matrinxã, *Brycon amazonicus*.

Outra problemática encontrada nos probióticos comerciais seria a introdução de espécies exóticas ou estirpes de bactérias em ambientes aquáticos que foram isoladas de animais e/ou ambientes terrestres, o que justifica a necessidade de obter uma bactéria probiótica, selecionada a partir dos organismos ou do ambiente onde são produzidos (Aly et al., 2008; Del'Duca et al., 2013; Jatobá et al., 2008).

Os probióticos de origem autóctone podem ser mais competitivos com os microrganismos residentes, em parte, devido a sua capacidade adaptativa frente às condições fisiológicas do hospedeiro. No entanto, estes microrganismos devem resistir a processos industriais necessários para a sua produção comercial, permanecer viáveis durante o armazenamento e ativos para promover efeitos benéficos (Etyemez and Balcazar, 2016; Pérez-Sánchez et al., 2014).

Os efeitos benéficos dos probióticos estão relacionados com a produção de substâncias inibitórias, competição por locais de adesão e facilitar a absorção de nutrientes, o que torna ambientes hostis contra os patógenos (Balcázar et al., 2006). Já em termos morfológicos, estudos tem demonstrado a eficácia de diferentes probióticos no intestino, em promover o aumento do número de células de defesa (Picchiatti et al., 2009; Pirarat et al., 2011), além de aumentar e conservar a integridade das vilosidades intestinais (Gisbert et al., 2013; Picchiatti et al., 2007; Pirarat et al., 2011).

Portanto, é importante testar novas cepas com potencial probiótico, pré-selecionadas a partir de coletas de amostras em tilápia-do-nilo, de diferentes regiões do Brasil, com intuito de verificar a sua capacidade de melhorar o desempenho zootécnico e a imunidade dos peixes.

Objetivou-se com este trabalho testar as bactérias isoladas e pré-selecionadas do intestino e muco de tilápias-do-nilo, provenientes de pisciculturas comerciais de diversas regiões do Brasil, para sua aplicação como possíveis probióticos em tilápia-do-nilo, por meio da avaliação de parâmetros hematológicos, imunológicos e desempenho zootécnico.

1. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na unidade de pesquisa e desenvolvimento de Pirassununga (UPD/Centro de Aquicultura/Instituto de Pesca/APTA/SAA). O ensaio de desempenho foi executado conforme as normas e recomendações da Resolução nº 592 de junho de 1992, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e preceitos de Princípios Éticos da Experimentação Animal. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesca (nº de protocolo 02/2015).

A ração referência (RF) foi formulada com 36% de proteína bruta (PB), 3.100 kcal.kg⁻¹ de energia digestível (ED), 30,93% de proteína digestível (PD) (Tabela 1).

Tabela 1. Formulação e composição química estimada das dietas experimentais de tilápia-do-nylo, *O. niloticus*.

Ingredientes (%)	
Farinha de Trigo	14,18
Milho moído	21,79
Farinha de vísceras de frango	14,11
Hemoglobina	13,00
Farinha de carne e ossos	12,00
Farinha de soja	10,00
Quirera de arroz	6,00
Farelo de arroz	4,00
Glúten de milho	1,66
Óleo de frango	1,50
Premix	0,50
Sal (NaCl)	0,50
DL-Metionina	0,20
Vitamina C (35%)	0,20
Absorvente de micotoxina (Mycifix® FUM)	0,10
Antifúngico (MOLD-NIL™ MC DRY)	0,10
Cloreto de colina (70%)	0,10
Antioxidante (OXY-NIL™ RX DRY)	0,05
Composição química calculada* (%)	
Umidade	9,36
Proteína bruta	36,00
Lipídio total	9,18
Fibra	3,02
Amido	25,00
Cinzas	8,97
Cálcio	2,36
Fósforo	1,40
Energia digestível (kcal.kg ⁻¹)	3.100,00
Proteína digestível	30,93
Lisina total	2,70
Metionina + Cisteína total	0,95
Triptofano	0,39
Treonina	1,35

¹Premix: vit A 12,000 IU; vit D₃ 3000 IU; vit E 150 mg; vit K₃ 15 mg; vit B₁ 20 mg; vit B₂ 20 mg; vitB₆ 17,50 mg; vit B₁₂ 40 mg; vit C 300 mg; nicotinic acid 100 mg; pantothenic acid 50 mg; biotin 1 mg; folic acid 6 mg; antioxidant 25 mg; Cu 17,50 mg; Fe 100 mg; Mn 50 mg; Zn 120 mg; I 0,80 mg; Se 0,50 mg; Co 0,40 mg; inositol 125 mg; choline 500 mg. (Furuya et al., 2001)

As bactérias probióticas selecionadas a partir do muco e intestino de tilápias-do-nylo foram isoladas e identificadas por amplificação com o primer 16S (PCR) e sequenciamento comparando-se no software BLAST, e posteriormente liofilizadas em solução de maltodextrose por período de 48 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e três repetições (21 unidades experimentais), sendo: T0 – controle, T1 – *Bacillus velezensis* na ração, T2 – *B. pumilus* na ração, T3 – *B. subtilis* na ração, T4 – *Enterococcus hirae* na ração, T5 – *E. faecium* na ração e T6 –mix (*B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*) (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos utilizados no teste com tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*

Tratamentos	Bactérias	UFC.g ⁻¹	Dose na ração
T0	Ração referência (RF) + 2% óleo de soja	-	-
T1	RF +2% óleo de soja + <i>Bacillus velezensis</i>	10 ¹¹	1g.kg ⁻¹
T2	RF +2% óleo de soja + <i>Bacillus pumilus</i>	3x10 ⁹	1g.kg ⁻¹
T3	RF +2% óleo de soja + <i>Bacillus subtilis</i>	1,5x10 ¹²	1g.kg ⁻¹
T4	RF +2% óleo de soja + <i>Enterococcus hirae</i>	3x10 ¹²	1g.kg ⁻¹
T5	RF +2% óleo de soja + <i>Enterococcus faecium</i>	7x10 ¹²	1g.kg ⁻¹
T6	RF +2% óleo de soja + (<i>B. velezensis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. hirae</i> e <i>E. faecium</i>)		1g.kg ⁻¹

Os probióticos foram adicionados à ração referência extrusada (Tabela 1), a fim de avaliar a sobrevivência e eficiência das bactérias probióticas (Dias et al., 2012). O probiótico foi homogeneizado em óleo de soja (2,0% do peso da ração) e aspergido sobre a ração. A dieta controle recebeu a mesma quantidade de óleo de soja. As dietas experimentais foram estocadas em temperatura de 4°C e fornecida três vezes ao dia *ad libitum* por 81 dias.

O experimento foi realizado com 1.680 tilápias-do-nylo (Tilápia Aquabel Premium, da empresa Piscicultura Aquabel Ltda., de Porto Ferreira) com peso médio de 2,71g ± 0,53 e comprimento de 5,66 cm ± 0,35, revertidas para macho. Foram estocados 80 peixes por hapa, num total de 21 hapas (gaiolas) com volume útil de 0,7 m³ (1,0 x 1,0 x 1,0 m) cada, confeccionados em fio de poliamida recoberto com PVC e com abertura da malha de 5,0 mm. As hapas foram instaladas em um viveiro escavado de 200 m² e 1,20m de profundidade, com o fundo de terra e com paredes de alvenaria e revestidas de concreto e com renovação de 5% do volume de água por dia. O sistema de aeração e renovação da água da hapa era composto

de bomba de água (1,0 cv) e tubulação de PVC perfurada (diâmetro de 2,0mm) acima de cada hapa.

2.1 Parâmetro de qualidade da água

Semanalmente, foram analisados os parâmetros da água: oxigênio dissolvido e temperatura através de oxímetro; pH com pHmetro e amônia total (Kit Labcon™).

2.2 Ensaio de desempenho zootécnico

Durante o período experimental, as variáveis de desempenho zootécnico foram avaliadas por meio de biometrias a cada 21 dias. Com as biometrias, foram calculadas as seguintes variáveis: Ganho de peso GP = [(peso final) - (peso inicial)]; Sobrevivência S = [(100 x número de animais final) / número de animais inicial]; Conversão Alimentar Aparente CAA = [(consumo de ração) / (ganho de peso)]; Taxa de crescimento específico: TCE = {100 x [(ln peso final - ln peso inicial) / período]}; Taxa de eficiência proteica: TEP=GP/ (consumo diário (CD)x%PB da dieta) e Biomassa: peso total dos peixes.

2.3 Microbiologia - DGGE

Oito peixes de cada tratamento foram anestesiados com eugenol (100 mg/L) e mortos por secção medular. Foi borrifado álcool 70° na superfície do peixe para descontaminação, foi coletado o intestino mediano sendo armazenados em criotubos de 2,0 mL, e conservados em nitrogênio líquido. No laboratório, os intestinos foram armazenados a -80°C.

O DNA total dos microrganismos do muco intestinal de tilápia-do-nylo (n=8) foram extraídos de acordo com as especificações do kit Trisure (Bioline, Espanha) e purificado por precipitação com acetato de sódio (20 µl de DNA foi precipitado com 2 µl de acetato de sódio 3 M e 46 µl de isopropanol). Em seguida, o DNA foi centrifugado por 3 min a 12.000 g, 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os peletes foram lavados com etanol 70% e centrifugados por 15 minutos a 12.000 g, 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados novamente e os peletes de DNA foram ressuspensos em água. A qualidade e integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% corados com GelRed Nucleic Acid Stain 20000x (InTRON Biotecnologia, Seul, Coréia). A concentração e pureza foi determinada

usando o fluorômetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). O DNA foi armazenado a -20 °C, foram utilizados para análises subsequentes.

O DNA foi amplificado, utilizando primers 16S rDNA bacteriano 677R-GC (5'CGGGGCGGGGGCACGGGGGGATMTCTACGCATTTACCGCTAC-3') e 309-F (5'ACTCCTACGGGAGGCWGCAG-3') e submetidos ao qPCR "Real-time" usando o corante de detecção SYBR GREEN (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada em placa de 96 poços de 20µL de volume contendo 2µL da amostra e 8 µL da solução para PCR (2µL de água purificada, 10µL de 2xSYBR Green supermix, 4µL de primer específico de bactérias).

Os produtos de PCR obtidos foram separados por DGGE, utilizando o equipamento DCode TM System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Um gel de 8% de poliacrilamida (37,5:1 bisacrilamida com dimensão de 18 cm x 18 cm x 0,01 cm) foi confeccionado, contendo um gradiente desnaturante de 30 a 55% de ureia e formamida em direção à eletroforese. A solução 100% desnaturante foi preparada com 7M ureia e 40% v/v de formamida deionizada. Um total de 4 µL de produto de PCR e 2 µL de tampão de corrida foram aplicados nos poços do gel e submetidos à eletroforese durante 16 h, a 85V, em tampão TAE 0,5X (20mM Tris base, 10mM de ácido acético, 0,5mM de EDTA [pH 8,0]), a temperatura constante de 60°C. Os marcadores utilizados foram DNA ladder 1kb e 100 bp.

Os géis foram submetidos ao fotodocumentador (BioRad) para análise de imagens. As bandas foram recortadas do gel e enviadas para sequenciamento e identificação. As bibliotecas foram construídas pela Chunlab, Inc (Seul, Coreia do Sul) usando a plataforma ilumina MiSeq. Resumidamente, o sequenciamento dos pares de bases de cada amostra foi realizado utilizando os primers 341F CCTACGGGNGGCWGCAG e 805R GACTACHVGGGTATCTAATCC (ChunLab), para segmentação das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA.

Uma matriz de semelhanças de curvas densitométricas dos padrões de bandas foi calculada utilizando o coeficiente de similaridade de Pearson, que considera a localização das bandas e suas intensidades. O agrupamento dos padrões de bandas do DGGE foi representado com a construção de um dendograma como algoritmo de aglomeração, usando o *Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Averages* (UPGMA). Utilizando as intensidades das bandas, uma análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) foi realizada para se observar as distâncias entre as amostras representadas por pontos de diferentes cores para cada cidade de amostragem. Para verificar quais Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) eram os principais responsáveis pela diferença entre os três grupos de amostras, uma análise

SIMPER foi utilizada, a partir dos valores relativos das intensidades das bandas obtidos pela imagem do gel do DGGE

Para análise dos padrões de bandas dos géis (DGGE), foram calculados os seguintes parâmetros ecológicos: 1. Índice de diversidade de Shannon (H)- $H = -\sum P_i \ln P_i$ onde, $P_i = n_i / N$, n_i = número de cópias de cada espécie, N = número total de cópias de todas as espécies (Uramoto et al., 2005). 2. Riqueza de espécies (R)- $R = \sum b$ onde b = cada uma das bandas presentes no gel DGGE (Uramoto et al., 2005). 3. Habitabilidade (Rr) - $Rr = N^2 \times Dg$ onde, N = número total de bandas em cada coluna, Dg = gradiente desnaturante entre a primeira e a última banda da referida coluna. (Marzorati et al., 2008).

2.4 Análises hematológicas

Para as análises hematológicas, ao final do experimento, foram coletados nove peixes de cada tratamento, anestesiados com eugenol (75 mg.L^{-1}) e retiradas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas heparinizadas, para as determinações de: a) número total de células (RBC), contado em câmara de Neubauer; b) contagem diferencial e total dos leucócitos (Lc) e contagem de trombócitos (Tr) pelo método indireto em extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa (RANZANI-PAIVA et al., 2013); c) hematócrito (Ht), pelo método do microhematócrito; d) taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina e glicose, medida através de glicosímetro portátil Accu-Chek® Performa. Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do hematócrito (Ht) e do número de eritrócitos (Er), foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

2.5 Atividade da lisozima

No final do experimento, foi retirado sangue de nove peixes por tratamento, com seringa sem anticoagulante e após centrifugação do sangue, foram retiradas alíquotas de soro para análise de lisozima determinada segundo Kim e Austin (2006) modificado. Para a determinação da atividade de lisozima foi preparado um solução de *Micrococcus* [1 mg.ml^{-1} *Micrococcus lysodeketicus* liofilizado em $0,05 \text{ M}$ tampão fosfato de sódio ($\text{pH} = 6,3$)]. O ensaio foi

realizado em microplacas de 96 poços de fundo plano. A cada poço, foi adicionado 200 µL de solução de *Micrococcus* e 10 µl de soro. As placas foram incubadas a 20°C, sob agitação e a densidade ótica foi medida a 540 nm nos tempos entre 0 e 5 minutos. Uma unidade de lisozima foi considerada como a quantidade necessária para reduzir a absorbância em 0,001 min⁻¹. Os cálculos foram obtidos através da equação: $\Delta\text{ABS} \times 1.000 / \text{minutos} / \text{mL}$ (Lie et al., 1989).

2.6 Atividade do *burst* respiratório dos fagócitos

Após os 81 dias de experimento, foi coletado sangue de nove peixes por tratamento, para a avaliação da atividade do *burst* respiratório dos fagócitos, que foi determinada pelo teste de “nitroblue tetrazolium” (NBT), seguindo o método descrito por Aly et al. (2008), modificado. Foram adicionados 50 µL de sangue e 50 µl de NBT (0,2%) em tubos de ensaio de vidro. Os tubos foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado, a cada tubo, 1,0 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) e então os tubos foram centrifugados (3.000 g) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubetas e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (620 nm).

2.7 Lactato enzimático

O lactato enzimático foi determinado por kit da Labtest, pela metodologia enzimático – Trinder. O sistema utiliza a enzima lactato oxidase na determinação da concentração de lactato presente em uma amostra.

2.8 Composição química corporal

Para a análise bromatológicas, nove peixes de cada tratamento foram enviados ao Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Pirassununga, para realização das análises da composição corporal. As amostras coletadas foram congeladas, moídas, homogeneizadas e liofilizadas para determinação de extrato etéreo (Soxlet), proteína bruta (micro Kjeldahl - Nx6,25) e cinza (mufla a 550°C por 12h) de acordo com os métodos propostos pela AOAC (2012).

2.9 Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados, quanto ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homocedasticidade das variâncias (teste de Levene), e após a verificação foram definidos os testes empregados (paramétrico ou não paramétrico): análise de variância (ANOVA) e Tukey, para dados paramétricos; Kruskal-wallis e de Post Dunn Hoc, para dados não paramétricos; ao nível de significância de 5%, por meio do software Past.

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros de qualidade da água

Na Tabela 3, estão apresentados os parâmetros de qualidade da água do viveiro, onde realizou-se o experimento por 81 dias. Esses parâmetros mostraram que não houve diferenças que pudessem interferir nos resultados obtidos, pois eles permaneceram dentro do limite estabelecido para conservação da vida aquática (Sipaúba-Tavares, 1995).

Tabela 3 - Parâmetros de qualidade da água de tilápias-do-nilo, *O. niloticus*, alimentadas com probióticos durante 81 dias.

Parâmetros de qualidade da água				
	21° dia	42° dia	63° dia	81° dia
Oxigênio	5,90±0,365	6,11±0,737	6,60±2,60	4,13±0,115
pH	7,25±0,071	7,61±0,127	7,49±0,820	7,24±0,064
Temperatura	26,43±1,150	28,05±0,810	30,57±1,250	32,67±0,577
Amônia	0,25±0	0,25±0	0±0	1±0

4.2 Ensaio de desempenho zootécnico de crescimento

De acordo com os resultados de desempenho zootécnico (Tabela 4), a aplicação de probióticos via oral influenciou de forma positiva na variável de biomassa total final, sendo que os tratamentos T1 (*B. velezensis*), T2 (*B. pumilus*), T3 (*B. subtilis*) e T6 (mistura de todos os probióticos) proporcionaram médias superiores em relação ao controle (Figura 1). A conversão

alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência proteica (TEP) de peixes alimentados com os probióticos T2 (*B. pumilus*) e T6 (mistura de todos os probióticos) foram semelhantes com o T0 (grupo controle). No entanto, para os grupos alimentados com os tratamentos T1 (*B. velezensis*), T3 (*B. subtilis*) e T5 (*E. faecium*), estes índices foram menores. Não houve diferenças significativas para as demais variáveis, entre os tratamentos.

Tabela 4 - Ganho de peso (GP), taxa de sobrevivência (TS), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência proteica (TEP) e biomassa total de peixes, com os respectivos coeficientes de variação (CV) do experimento com tilápia-do-nylo, *O. niloticus*, após 81 dias de tratamento.

Variáveis	T0 controle	T1 <i>B. velezensis</i>	T2 <i>B. pumilus</i>	T3 <i>B. subtilis</i>	T4 <i>E. hirae</i>	T5 <i>E. faecium</i>	T6 mix	CV (%)	P-value
GP (g)	88,57 ±3,33	92,66 ±3,06	94,30 ±2,64	91,91 ±1,35	88,92 ±5,78	90,99 ±4,08	92,71 ±2,76	3,85	0,43
TS (%)	90,80 ±0,72	92,90 ±1,44	94,60 ±2,60	93,30 ±1,91	89,60 ±5,77	90,80 ±1,91	96,30 ±2,17	4,40	0,1243
CAA	1,10 ^c ±0,01	1,14 ^{ab} ±0,01	1,10 ^c ±0,02	1,13 ^b ±0,02	1,16 ^a ±0,01	1,13 ^b ±0,01	1,11 ^c ±0,02	1,08	0,0004
TCE (%.dia⁻¹)	4,37 ±0,06	4,43 ±0,03	4,42 ±0,01	4,36 ±0,01	4,37 ±0,08	4,40 ±0,05	4,43 ±0,06	0,53	0,2854
TEP (%)	2,45 ^a ±0,01	2,38 ^b ±0,02	2,46 ^a ±0,05	2,39 ^b ±0,04	2,34 ^c ±0,01	2,39 ^b ±0,01	2,44 ^a ±0,03	0,56	0,0006
Biomassa (g)	6.628,33 ^c ±220,25	7.081,67 ^{ab} ±131,56	7.336,67 ^a ±162,89	7.063,33 ^{ab} ±213,38	6.551,67 ^c ±323,51	6.801,67 ^{bc} ±208,95	7.338,33 ^a ±79,74	2,92	0,001

^{abc}Letras diferentes em uma mesma linha demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos valores pelo teste de Duncan.

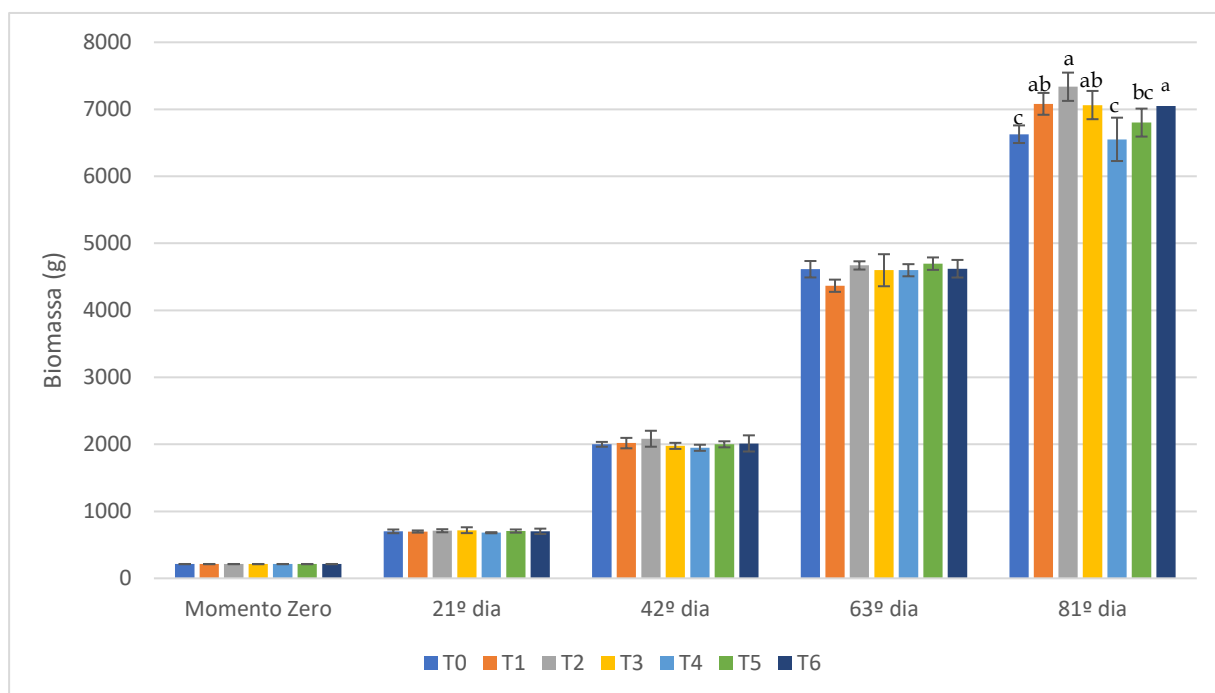


Figura 1 – Médias e desvios-padrão da biomassa total das tilápias-do-nylo (*O. niloticus*) (g), alimentadas com diferentes bactérias probióticas e em diferentes tempos. (T0 – controle, T1 – *Bacillus velezensis* na ração, T2 – *Bacillus pumilus* na ração, T3 – *Bacillus subtilis* na ração, T4 – Probiótico *Enterococcus hirae* na ração, T5 – *Enterococcus faecium* na ração e T6 – mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*).

*Letras diferentes em uma mesma linha demonstra diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos valores pelo teste de Duncan.

3.3 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

O dendograma elaborado (Figura 2) demonstra o grau de similaridade do perfil microbiológico do intestino de peixes alimentados com dietas controle (T0) e experimentais (T1, T2, T3, T4, T5 e T6). Os grupos controle, T1, T2 e T3 apresentaram similaridade acima de 0,80 entre réplicas. No entanto, a mesma tendência não foi verificada em T4, T5 e T6, apontando resultados distintos para o mesmo tratamento. As bactérias *E. hirae* (T4), *E. faecium* (T5) ou o mix (T6) proporcionaram efeitos divergentes sobre a microbiota intestinal, entre os indivíduos da espécie tilápia-do-nylo.

Ao comparar o controle(T0) com os demais, os peixes do grupo T3 (*B. subtilis*), T4 (*E. hirae*), T5 (*E. faecium*) e T6 (mistura de todos os probióticos) apresentaram perfis

microbiológicos diferentes, valores abaixo de 0,2. O grau de similaridade foi maior para T1, com 0,6 , seguido por T2, com 0,4.

Com base no número de bandas obtidas, os parâmetros ecológicos calculados demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 8), para índice de Shannon (H) (Figura 3), riqueza (R) (Figura 4) e de habitabilidade (Rr) (Figura 5).

Neste estudo, o valor de H (Índice de diversidade de Shannon) referente ao T4 foi superior ao T1 e T5, sendo este último, inferior a T2. O grupo controle apresentou índice semelhante em comparação aos demais tratamentos (Figura 3). Para riqueza de espécies (R), os peixes alimentados com dietas T0 e T1 apresentaram n° de espécies inferiores aos demais tratamentos. Para os grupos T3 e T4, estes obtiveram valores superiores a T2, T5 e T6 (Figura 4).

Os índices de habitabilidade (Rr) mostraram que os tratamentos T3 (*B. subtilis*) e T4 (*E. faecium*) foram superiores aos demais. Os grupos T0 (controle) e T1 (*B. velezensis*) apresentaram valores semelhantes ao T5 (*E. faecium*) e T6 (mistura de todos os probióticos), porém, inferior ao T2. (Figura 5).

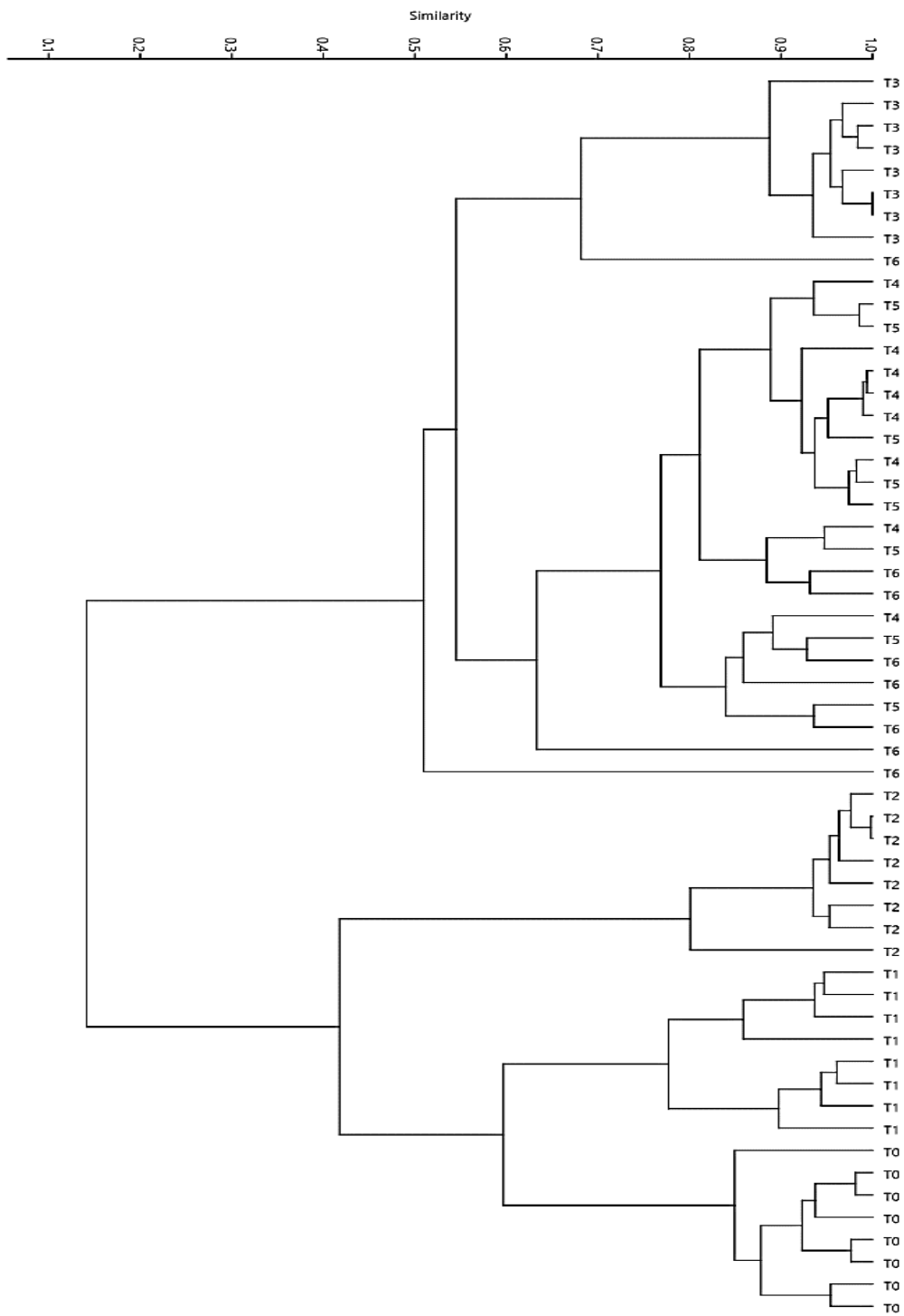


Figura 2. Dendrograma da análise da microbiota intestinal de tilápias-do-nylo alimentadas com dietas contendo probióticos por 81 dias (T0 - controle, T1 - *Bacillus velezensis* na ração, T2 - *Bacillus pumilus* na ração, T3 - *Bacillus subtilis* na ração, T4 - *Enterococcus hirae* na ração, T5 - *Enterococcus faecium* na ração e T6 - mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*).

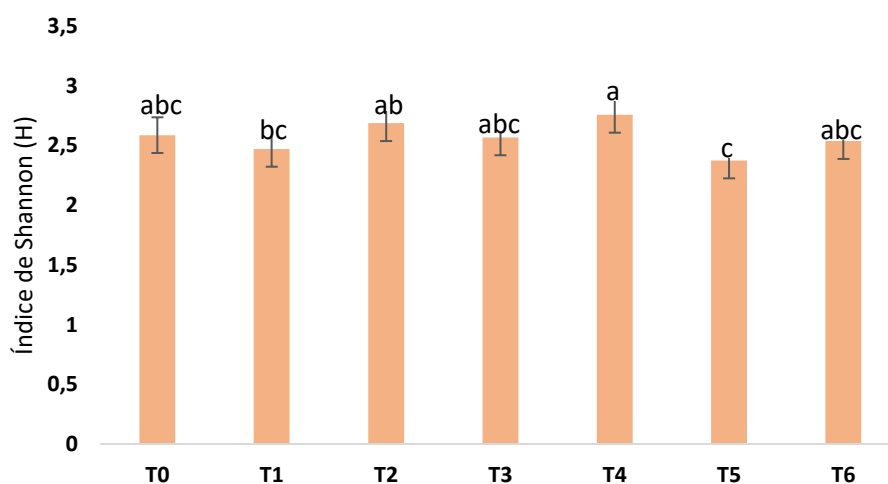


Figura 3. Índice de diversidade de *Shannon* (H) da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas contendo probióticos por 81 dias (T0 – controle, T1 – *Bacillus velezensis* na ração, T2 – *Bacillus pumilus* na ração, T3 – *Bacillus subtilis* na ração, T4 – *Enterococcus hirae* na ração, T5 – *Enterococcus faecium* na ração e T6 – mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*).

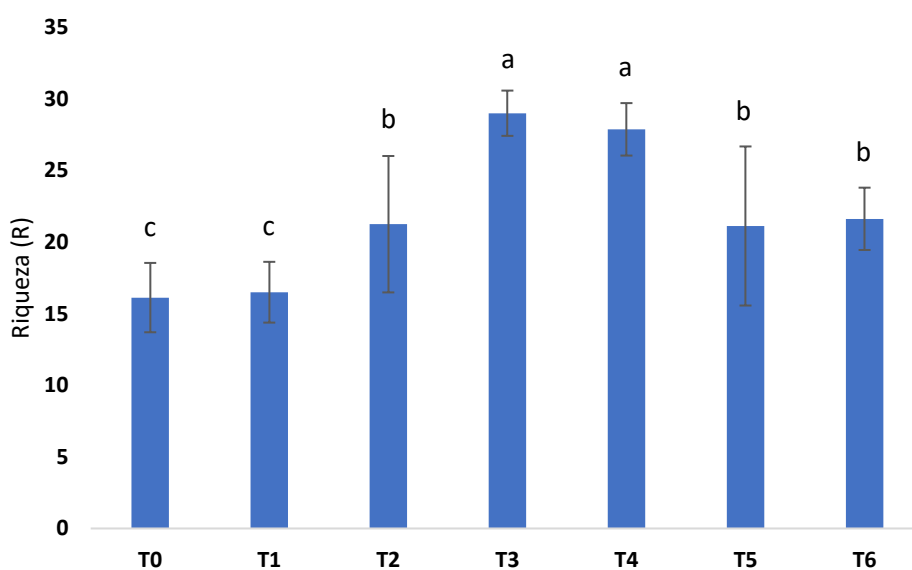


Figura 4. Riqueza de espécies (R) da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas contendo probióticos por 81 dias (T0 – controle, T1 – *Bacillus velezensis* na ração, T2 – *Bacillus pumilus* na ração, T3 – *Bacillus subtilis* na ração, T4 – *Enterococcus hirae* na ração, T5 – *Enterococcus faecium* na ração e T6 – mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*).

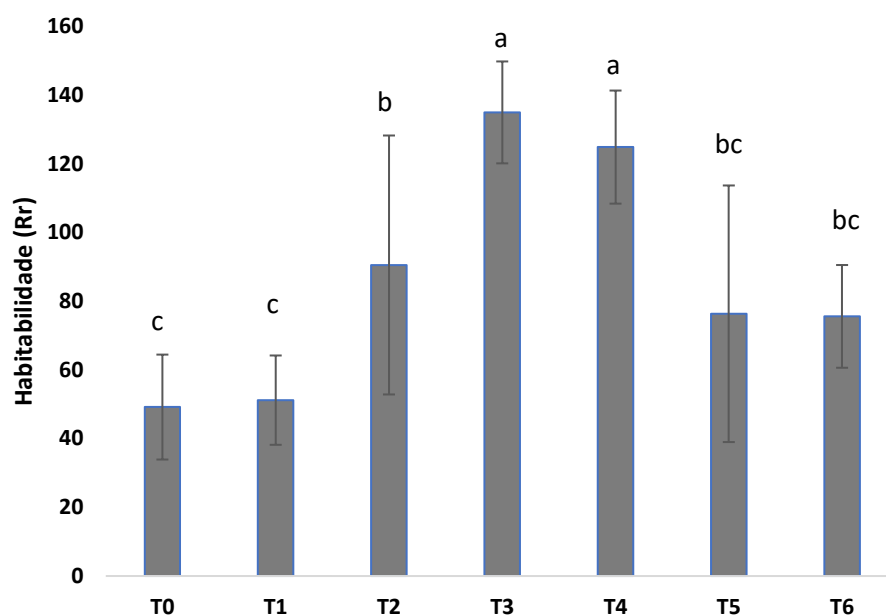


Figura 5. Habitabilidade (Rr) da microbiota intestinal de tilápias-do-nylo alimentadas com dietas contendo probióticos por 81 dias. (T0 - controle, T1 - *Bacillus velezensis* na ração, T2 - *Bacillus pumilus* na ração, T3 - *Bacillus subtilis* na ração, T4 - *Enterococcus hirae* na ração, T5 - *Enterococcus faecium* na ração e T6 - mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*).

Tabela 8. Parâmetros ecológicos de tilápias-do-nylo, *O. niloticus*, alimentadas com probióticos durante 81 dias.

Variáveis	Inclusão de probióticos (concentração 1g.kg ⁻¹ de dieta)							CV (%)	P-value
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
	Controle	<i>B. velezensis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. faecium</i>	MIX		
H	2,59 ^{abc} ± 0,08	2,47 ^{bc} ± 0,14	2,69 ^{ab} ± 0,33	2,57 ^{abc} ± 0,10	2,76 ^a ± 0,25	2,38 ^c ± 0,16	2,54 ^{abc} ± 0,15	7,92	0.0108
R	16,13 ^c ± 2,12	16,5 ^c ± 2,12	21,25 ^b ± 4,76	29 ^a ± 1,58	27,88 ^a ± 1,83	21,13 ^b ± 5,55	21,63 ^b ± 2,18	15,9	<.0001
Rr	49,19 ^c ± 15,27	51,2 ^c ± 13,00	90,55 ^b ± 37,69	134,96 ^a ± 14,83	124,86 ^a ± 16,46	76,34 ^{bc} ± 37,35	75,58 ^{bc} ± 14,95	29,43	<.0001

T0 - controle; T1 - *Bacillus velezensis*; T2 - *Bacillus pumilus*; T3 - *Bacillus subtilis*; T4 - *Enterococcus hirae*; T5 - *Enterococcus faecium*; T6 -mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae*; *E. faecium*;

H- índice de Shannon; R- riqueza de espécies; Rr- habitabilidade

3.4 Hemograma, glicemia, lactato *burst* respiratório, lisozima

As análises hematológicas demonstraram que as contagens de trombócitos e basófilos foram diferentes significativamente ($P < 0,05$) entre os tratamentos. O número de trombócitos de peixes do grupo T1 (*B. velezensis*) foi superior em relação ao T4 (*E. hirae*), T5 (*E. faecium*) e T6 (mistura de todos os probióticos), e semelhante ao T0 (controle) e T2 (*B. pumilus*). No caso de basófilos, os animais alimentados com T3 (*B. subtilis*), T5 (*E. faecium*) e T6 (mistura de todos os probióticos) apresentaram valores superiores aos que receberam T0 (controle), T1 (*B. velezensis*) e T2 (*B. pumilus*). Para os demais índices, estes foram semelhantes entre os tratamentos (Tabela 5).

A glicemia, lactato, atividade de lisozima e de *burst* respiratório, os resultados também foram similares entre os grupos experimentais (Tabela 6).

Tabela 5. Eritrograma, leucograma e trombograma de tilápias-do-nilo, *O. niloticus*, alimentadas com probióticos durante 81 dias.

Variáveis	Inclusão de probióticos (concentração 1g .kg ⁻¹ de dieta)							CV (%)	p-value
	T0 Controle	T1 <i>B. velezensis</i>	T2 <i>B. pumilus</i>	T3 <i>B. subtilis</i>	T4 <i>E. hirae</i>	T5 <i>E. faecium</i>	T6 Mix		
RBC (10 ⁶ mm ⁻³)*	2,01 ±0,21	2,10 ±0,12	2,04 ±0,08	2,12 ±0,11	2,33 ±0,12	2,36 ±0,15	2,15 ±0,09		
Ht (%)*	30,56 ±0,93	30,78 ±2,27	28,06 ±1,14	27,72 ±1,44	29,72 ±1,04	30,72 ±1,42	27,72 ±0,75	13,98	0,36
Hb (g dL ⁻¹) *	8,55 ±0,24	8,55 ±0,36	8,87 ±0,27	8,13 ±0,35	8,62 ±0,32	9,03 ±0,38	8,39 ±0,22	10,81	0,48
VCM (fL) *	177,05 ±34,62	154,5 ±23,28	138,23 ±6,06	132,71 ±8,31	129,16 ±6,06	132,30 ±7,04	130,31 ±5,62	35,38	0,36
HCM (pg) *	50,10 ±10,26	42,05 ±4,05	43,74 ±1,69	38,63 ±1,12	37,32 ±1,30	38,98 ±2,05	39,27 ±1,33	31,60	0,42
CHCM (g dL ⁻¹) *	28,05 ±0,54	28,23 ±0,95	31,75 ±0,63	29,59 ±1,03	29,10 ±0,84	29,62 ±1,13	30,37 ±0,97	9,07	0,07
Leuc (mm ⁻³)**	49.139,07 ±8.806,43	60.790,48 ±11.468,14	45.703,51 ±9.848,78	62.937,62 ±8.814,50	39.294,14 ±5.381,21	41.715,28 ±5.108,25	48.038,37 ±2.847,06	48,27	0,33
Lf (mm ⁻³)**	44.538,07 ±8.146,10	55.141,28 ±10.856,89	41.659,19 ±8.731,08	55.301,73 ±7.764,67	34.734,15 ±4.903,76	35.934,35 ±4.331,82	42.244,51 ±2.807,63	49,42	0,38
Nt (mm ⁻³) *	1.693,29 ±374,45	2.531,65 ±370,88	1.589,91 ±541,75	2.330,03 ±330,24	1.811,91 ±424,50	1.938,35 ±373,51	1.623,08 ±158,55	59,44	0,49
Bs (mm ³)**	1.073,10 ^b ±266,77	1.405,88 ^b ±408,21	1.435,74 ^b ±432,60	4.205,83 ^a ±1.091,23	2.289,33 ^{ab} ±542,54	3.152,00 ^a ±744,53	3.139,46 ^a ±641,51	80,59	0,01

Es (mm ³) *	731,53	617,80	507,64	140,63	34,74	121,22	270,91	173	0,10
	±267,39	±332,49	±202,49	±70,64	±23,38	±61,16	±217,27		
Mn (mm ⁻³)**	1103,08	1.093,87	511,02	959,40	424,02	569,36	760,41	76,31	0,16
	±320,24	±260,05	±133,35	±228,69	±70,01	±76,96	±143,53		
Tr (mm ⁻³)*	23.098,50 ^{ab}	35.546,80 ^a	27.890,06 ^{ab}	27.724,62 ^{ab}	22.444,62 ^b	16.211,13 ^b	18.081,92 ^b	49,76	0,03
	±4.388,86	±5.182,76	±4.996,86	±4.204,65	±3.161,64	±2.473,92	±3.312,38		

T0 - controle; T1 - *Bacillus velezensis*; T2 - *Bacillus pumilus*; T3 - *Bacillus subtilis*; T4 - *Enterococcus hirae*; T5 - *Enterococcus faecium*; T6 -mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*; RBC = Eritrócitos; Ht = hematócrito; Hb = Hemoglobina; VCM= Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Médio; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Media; Leuc = Leucócitos Totais; Lf = Linfócitos; Nt = Neutrófilo; Bs = Basófilo; Es = Eosinófilo; Mn = Monócito; Tr = Trombócito

*ANOVA (análise paramétrica). Letras diferentes em mesma linha demonstra diferença significativa entre as médias pelo teste de Duncan (p<0,05).

**Teste de Kruskal-Wallis (análise não paramétrica). Letras diferentes em mesma linha demonstra diferença significativa entre as medianas pelo teste de Post Hoc Dunn (p<0,05).

Tabela 6. Glicemia, lactato, lisozima sérica e *burst* respiratório de tilápias-do-nylo, *O. niloticus*, alimentadas com probióticos durante 81 dias.

Variáveis	Inclusão de probióticos (concentração 1g.kg ⁻¹ de dieta)							CV (%)	P-value
	T0 Controle	T1 <i>B. velezensis</i>	T2 <i>B. pumilus</i>	T3 <i>B. subtilis</i>	T4 <i>E. hirae</i>	T5 <i>E. faecium</i>	T6 Mix		
Glicemia*	53,78 ±10,56	49,33 ±5,00	44,67 ±11,39	48,78 ±8,72	45,00 ±7,19	42,11 ±7,56	43,78 ±6,98	18,06	0,07
Lactato*	19,76 ±4,05	16,82 ±5,17	20,71 ±5,45	21,86 ±4,84	16,70 ±3,76	18,36 ±8,51	18,08 ±9,09	32,60	0,49
Lisozima*	819,17 ±224,68	934,07 ±623,04	688,89 ±181,13	717,04 ±275,74	1002,59 ±639,82	783,75 ±206,78	804,07 ±375,48	49,75	0,67
Burst respiratório**	0,473 ±0,09	0,481 ±0,19	0,469 ±0,09	0,428 ±0,14	0,482 ±0,07	0,500 ±0,17	0,527 ±0,06	26,74	0,67

T0 - controle; T1 - *Bacillus velezensis*; T2 - *Bacillus pumilus*; T3 - *Bacillus subtilis*; T4 - *Enterococcus hirae*; T5 - *Enterococcus faecium*; T6 -mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*

*ANOVA (análise paramétrica)

**Análise de Kruskal-Wallis (análise não paramétrica).

3.5 Composição química dos peixes

Os resultados de composição química dos peixes inteiros demonstraram que os probióticos não promoveram alterações relevantes em comparação ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7. Composição centesimal dos peixes, base na matéria seca (%) de tilápias-do-nylo, *O. niloticus*, alimentadas com probióticos durante 81 dias em hapas.

Variáveis	Inclusão de probióticos (concentração 1g.kg ⁻¹ de dieta)							CV (%)	P-value
	T0 Controle	T1 <i>B. velezensis</i>	T2 <i>B. pumilus</i>	T3 <i>B. subtilis</i>	T4 <i>E. hirae</i>	T5 <i>E. faecium</i>	T6 Mix		
PB*	51,21 ±1,71	48,62 ±1,90	50,04 ±0,77	48,44 ±1,66	51,11 ±1,14	49,14 ±1,59	50,06 ±0,38	2,83	0,15
MM*	15,86 ±0,35	15,66 ±0,18	15,68 ±1,01	14,68 ±0,13	15,34 ±0,43	14,92 ±0,27	15,09 ±0,78	3,54	0,13
EE**	28,49 ±1,31	26,72 ±7,81	30,58 ±2,49	30,48 ±3,83	28,35 ±2,28	31,04 ±2,06	29,59 ±1,96	12,69	0,78
ENN**	4,43 ±1,61	9,00 ±8,92	3,69 ±1,57	6,39 ±5,96	5,20 ±2,07	4,50 ±1,58	5,25 ±1,72	84,06	0,57

T0 - controle; T1 - *Bacillus velezensis*; T2 - *Bacillus pumilus*; T3 - *Bacillus subtilis*; T4 - *Enterococcus hirae*; T5 - *Enterococcus faecium*; T6 -mix - *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae*; *E. faecium*;

PB - proteína bruta, MM-matéria mineral, EE - extrato etéreo, FB-fibra bruta, ENN-extrativo não nitrogenado.

*ANOVA (análise paramétrica)

**Análise de Kruskal-Wallis (análise não paramétrica).

4. DISCUSSÃO

O fornecimento de dietas com a inclusão de bactérias pré-selecionadas promoveu efeitos positivos sobre o desempenho zootécnico de crescimento, após 81 dias. Em comparação com o controle, os animais alimentados com dietas contendo *Bacillus* (*B. velezensis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*) apresentaram valores de biomassa final maior, e no caso de *B. pumilus*, com a taxa de conversão alimentar similar. Estes resultados podem ser justificados pelo fato dos *Bacillus* secretarem uma variedade de enzimas que participam na degradação dos alimentos, biodisponibilidade e assimilação de nutrientes (Soto, 2017) e desta forma, contribui para o ganho de peso do animal e aumento na eficiência alimentar. Os autores Liu et al. (2017) verificaram que a cepa *B. subtilis* HAINUP40 adicionada na ração aumentou a atividade enzimática de proteína e amilase em tilápia-do-nilo, podendo ter estimulado a sua produção endógena.

A microbiota intestinal dos peixes contribui para funções essenciais, como inibição de bactérias patogênicas, competição por nutrientes e adesão a mucosa intestinal, produção de fatores antimicrobianos que auxilia na resposta imune e digestão alimentar (Soltani et al., 2019).

Para Sun et al. (2010), a inclusão de *B. pumilus* e *B. clausii* melhorou a taxa de conversão alimentar de garoupa (*Epinephelus coioides*), após 60 dias de experimentação. Segundo (Aly et al., 2008), tilápias-do-nilo alimentadas com dieta contendo *B. pumilis* isoladas de gônadas de tilápia mostraram aumento no desempenho de crescimento das mesmas.

Portanto, o tempo de administração do probiótico é um fator importante para promover os efeitos benéficos, como a produção de enzimas digestivas, inibição da proliferação de bactérias patogênicas, entre outros (Guimarães et al., 2019). Neste estudo, verificou-se que a diferença significativa na biomassa foi observada entre o 63º e 81º dias de experimento.

Neste estudo foi observado uma modulação da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas contendo probióticos em dois agrupamentos, com diferentes padrões de banda em relação aos tratamentos T0 controle, T1 *B. velezensis* e T2 *B. pumilus*. O uso de *Bacillus sp.* na dieta modulou a microbiota intestinal de garoupa e estimulou o desenvolvimento de microrganismo benéficos como *Enterococcus ssp.* e *B. pumilis*, inibindo a colonização de bactérias patogênicas como *Staphylococcus* e *Vibrio ponticus* (Yang et al., 2012). He et al., (2013) também observou que a bactéria probiótica *B. subtilis* modula a microbiota intestinal, isso pode ser atribuída a produção de substâncias com atividade de biomodulação como a iturina e lipoproteínas.

Os animais alimentados com dietas contendo *B. subtilis* (T3) e *E. hirae* (T4) apresentaram maior índice ecológico de riqueza e habitabilidade ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Este fato pode indicar algum antagonismo ou taxas divergentes de crescimento entre as bactérias

de T6 (*B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*), pois, esperava-se efeito maior destes índices ecológicos em relação aos demais, uma vez que neste tratamento estão presentes *B. subtilis* e *E. hirae*, como apresentado no trabalho de Ramos et al. (2013), que verificaram efeito sinérgico de probióticos compostos por *Bacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Enterococcus sp.* e *Lactobacillus sp.* nos parâmetros ecológicos Índice de diversidade de Shannon e Riqueza, para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Para estes autores, a concentração de probióticos interfere no crescimento do animal e modulação da microbiota, e observaram o aumento do índice de Shannon em peixes alimentados com menor nível de inclusão.

A escolha de espécies para compor o probiótico deve ser ponderada, verificando-se os possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos, por metodologias de simulações das condições gastrointestinais (Forssten and Ouwehand, 2017). Sun et al. (2012) atribui a modulação da microbiota intestinal à competição entre as bactérias probióticas e patogênicas, melhorando as condições para as bactérias comensais.

Os peixes alimentados com dietas contendo bactérias probióticas apresentaram diferenças nas variáveis hematológicas, no número de basófilos e trombócitos. Resultados similares foram encontrados por Nakandakare et al. (2013), que adicionaram o probiótico antes e após o processamento de peletização da ração, na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo e, não observaram diferenças significativas entre os tratamentos, na contagem de linfócitos, leucócitos, neutrófilos, monócitos.

O uso de probiótico promoveu contagens mais altas de trombócitos em relação ao controle, em híbrido de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* × *P. reticulatum*) (Mouriño et al., 2017; Telli et al., 2014). Os indivíduos alimentados com a bactéria *B. velezensis* (T1) apresentaram números superiores de trombócitos em comparação ao mix (T6). Pode-se inferir que a presença de bactérias *E. hirae* e *E. faecium* no mix pode ter interferido no efeito do *Bacillus*, já que estas cepas também apresentaram valores inferiores. A atividade fagocítica do trombócito foi constada em linguado (*Psetta máxima* L.) por Burrows et al. (2003). Os trombócitos coletados em amostras de sangue de carpas (*Cyprinus carpio*) demonstraram a habilidade em ingerir bactérias (0,50 a 3 µm) (Nagasawa et al., 2014). No entanto, Passantino et al. (2005), ao analisar as amostras de biofilme de sangue de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) acidentalmente infectadas *Candida albicans*, não verificaram a fagocitose pelos trombócitos, mas sim a capacidade de interação com eritrócitos, macrófago, linfócitos e granulócitos, sugerindo que este possa atuar na interface entre o sistema imune inato e adquirido.

Jatobá et al., (2008) obtiveram números mais altos de eritrócitos e trombócitos para animais alimentados com dieta contendo *Lactobacillus plantarum* e desafiados com *Enterococcus durans*.

Os basófilos são leucócitos, que são raramente encontrados em sangue de peixes (Pitombeira, M. da S. and Martins, 1970). A função dos basófilos está relacionada com infestações de parasitas, fagocitose e processos alérgicos (Satake et al., 2009).

A adição do probiótico na dieta pode melhorar a resposta imune inata, com aumento na produção de lisozima e *burst* respiratório, verificado em peixes alimentados com *Bacillus subtilis* (Liu et al., 2017; Telli et al., 2014). De acordo com Díaz-Rosales et al. (2009), a capacidade em estimular a atividade de *burst* respiratório de fagócitos pode estar correlacionada com as características de cepa, em vez do gênero da bactéria.

Neste trabalho, não foram encontradas diferenças significativas na atividade de lisozima e de *burst* respiratório, talvez pelo fato das análises imunológicas (*Burst* respiratório e lisozima) terem sido realizadas ao final do experimento (após 81 dias de administração dos probióticos), o que poderia ter ocorrido também no início do experimento. Para (Noffs et al., 2015) robalos-flecha (*Centropomus undecimalis*) alimentados com dieta suplementada com *Bacillus subtilis*, em regime alternado de sete dias, apresentaram melhor resposta no *burst* respiratório, o que indica que o tempo de administração do probiótico interfere no sistema imune do animal, este autor estabeleceu o tempo de sete dias baseado em estudo anterior, feito com alevinos de robalo, alimentados com ração suplementada com *B. subtilis*, após sete dias apresentaram melhor resposta no *burst* respiratório e após este período houve uma piora na resposta do mesmo. A detecção de um agente patogênico pelos fagócitos gera a formação de radicais livres (superóxido (O_2^-), conhecido como *burst* oxidativo, e desencadeia a formação de compostos com alto potencial bactericida, como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e peroxinitrito (Biller e Takahashi, 2018). O aumento da atividade de lisozima pode ser verificado em momento de estresse, perante a presença de um patógeno (Saurabh e Sahoo, 2008).

Em momentos de estresse, glicemia e lactato tendem a aumentar como resposta secundária, para fornecer energia ao animal (Barton, 2002; Martínez Cruz et al., 2012). Ao fornecer o probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11, Varela et al. (2010) verificaram níveis mais baixos de glicose sanguínea e de lactato em animais submetidos ao estresse de alta densidade de estocagem. No presente estudo, verifica-se uma tendência de que o grupo controle tenha apresentado valor mais alto de glicose ($P=0,07$) em relação aos demais tratamentos com probiótico. No entanto, para níveis de lactato, os valores foram semelhantes entre os indivíduos alimentados com dieta controle e testes. Para constatar o efeito positivo dos microrganismos sobre estas duas variáveis, a realização

de ensaios que envolvam o estresse como a hipóxia, variação de temperatura de água, transporte, densidade de estocagem seriam pertinentes.

Assim como neste trabalho, Telli et al., (2014) não observaram diferenças significativas em relação à composição química de tilápia-do-nilo, alimentadas com o probiótico *B. subtilis*, e atribuíram valor de umidade mais alto em função da densidade de estocagem, que interfere diretamente no crescimento do animal. Para Ramos et al. (2017), o possível efeito da utilização de mix de probióticos (*Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Lactobacillus* sp.) sobre a composição de carcaça provavelmente seria constatado em fase pós-larval e alevinos de truta arco-iris. Lara-Flores et al. (2003) verificaram o aumento de lipídeos em alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com levedura e probiótico comercial ALL-LAC™, composto por *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*. Além disso, a composição da dieta (alta e baixa porcentagem de proteína) também contribuíram para a alteração dos valores de proteína e lipídeos da carcaça dos peixes.

5. CONCLUSÃO

Bactérias isoladas e pré-selecionadas do intestino e muco de tilápias-do-nilo do grupo T2 (*B. pumilus*) e T6 (*B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *E. faecium*), na alimentação, podem ser utilizadas como probiótico para a melhora no desempenho de crescimento e modulação da microbiota intestinal.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP (processo 2014/15390-1) pelo financiamento do projeto, CAPES pela bolsa de mestrado, Aquabel pela doação dos peixes, Dr. Giovani Sampaio Gonçalves, Dra. Silvana Tapia Paniagua, Carolina Perico Graciano, Rodrigo Hozana Ferreira, Camila Aya Tanaka Kato, Sabrina França Lopes, Diego de Souza Vicente, Said Ben Hamed, Claudio Cirineu Ciola, Claudio Batista de Oliveira, Dr. Marcello Villar Boock pelo suporte técnico.

7. REFERÊNCIAS

Aly, S.M., Mohamed, M.F., John, G., 2008. *Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (Oreochromis niloticus)*. *Aquac. Res.* 39, 647–656.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01932.x>

AOAC, 2012. *AOAC® PRE-PUBLICATION DRAFT AOAC® Standards Development AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods*

for Food and Environmental Surfaces.

- Balcázar, J.L., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., 2006. *Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 18, 65–70.
<https://doi.org/10.1080/08910600600799497>
- Barton, B.A., 2002. *Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids*. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525.
<https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- BILLER, J.D., TAKAHASHI, L.S., 2018. *Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 3403–3414.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>
- Burrows, Fletcher, Manning, 2003. *Haematology of the turbot, Psetta maxima (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes*. *J. Appl. Ichthyol.* 17, 77–84. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00250.x>
- Conte, F., 2004. *Stress and the welfare of cultured fish*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>
- Del'Duca, A., Cesar, D.E., Diniz, C.G., Abreu, P.C., 2013. *Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (Oreochromis niloticus) using the fluorescent in situ hybridization technique*. *Aquaculture* 388–391, 115–121.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019>
- Dias, D.C., Leonardo, A.F.G., Tachibana, L., Corrêa, C.F., Bordon, I.C.A.C., Romagosa, E., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2012. *Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (Brycon amazonicus) breeders*. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 40–45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01892.x>
- Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrilón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2009. *Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (Solea senegalensis, Kaup) phagocytes, and protection against Photobacterium damsela subsp. piscicida*. *Aquaculture* 293, 16–21.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.050>
- Etyemez, M., Balcazar, J.L., 2016. *Isolation and characterization of bacteria with antibacterial properties from Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Res. Vet. Sci.* 105, 62–64.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.01.019>
- FAO, 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome.

- Forssten, S.D., Ouwehand, A.C., 2017. *Microbial Ecology in Health and Disease Simulating colonic survival of probiotics in single- strain products compared to multi-strain products*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 28. <https://doi.org/10.1080/16512235.2017.1378061>
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Pezzato, A.C., Barros, M.M., De Miranda, E.C., 2001. Coeficientes de Digestibilidade e Valores de Aminoácidos Digestíveis de Alguns Ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.* 30, 1143–1149.
- Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K.B., Badiola, I., 2013. *Bacillus cereus var. toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *J. Anim. Sci.* 91, 2766–2774. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5414>
- Guimarães, M.C., Dias, D. de C., Araujo, F. von A.P., Ishikawa, C.M., Tachibana, L., 2019. *Probiotic Bacillus subtilis and Lactobacillus plantarum in diet of Nile tilapia*. *Bol. do Inst. Pesca* 45, 252. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.252>
- Hai, N. Van, 2015. *Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
- He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashi, T., Zhou, Z., Yao, B., 2013. *Effects of dietary Bacillus subtilis C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia Oreochromis niloticus ♂×Oreochromis aureus ♀*. *Aquaculture* 412–413, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.028>
- IBGE, 2015. *Produção pecuária municipal 2015*. Rio de Janeiro.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. *Probiotics in aquaculture*. *J. Fish Dis.* 25, 633–642. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x>
- Jatobá, A., Vieira, F.D.N., Neto, C.B., Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Jerônimo, G.T., Dotta, G., Martins, M.L., 2008. *Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nilo como probiótico*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43, 1201–1207. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900015>
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W., 2003. *Use of the bacteria Streptococcus faecium and Lactobacillus acidophilus, and the yeast Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Aquaculture* 216, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6)
- Lie, Ø., Evensen, Ø., Sørensen, A., Frøysadal, E., 1989. *Study on lysozyme activity in some fish species*. *Dis. Aquat. Organ.* 6, 1–5. <https://doi.org/10.3354/dao006001>

- Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W., Zhou, Y., 2017. *Dietary administration of Bacillus subtilis HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A., Ramírez Saad, H.C., 2012. *Use of Probiotics in Aquaculture*. *ISRN Microbiol.* 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Mouriño, J.L.P., do Nascimento Vieira, F., Jatobá, A.B., da Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2012. *Effect of dietary supplementation of inulin and W. cibaria on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (Pseudoplatystoma sp)*. *Aquac. Nutr.* 18, 73–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x>
- Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Silva, B.C., Pereira, G. V., Jesus, G.F.A., Ushizima, T.T., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2017. *Symbiotic supplementation on the hemato-immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Nutr.* 23, 276–284. <https://doi.org/10.1111/anu.12390>
- Nagasawa, T., Nakayasu, C., Rieger, A.M., Barreda, D.R., Somamoto, T., Nakao, M., 2014. *Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates*. *Front. Immunol.* 5, 36–39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00445>
- Nakandakare, I.B., Iwashita, M.K.P., Dias, D.C., Tachibana, L., Ranzani-Paiva, M.J.T., Romagosa, E., 2013. *Incorporation of probiotics in the diet for juvenile Nile tilapias: Hematological, immunological and microbiological parameters*. *Bol. do Inst. Pesca* 39, 121–135.
- Noffs, A.P., Tachibana, L., Santos, A.A., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2015. *Common snook fed in alternate and continuous regimens with diet supplemented with Bacillus subtilis probiotic*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 50, 267–272. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000400001>
- Passantino, L., Cianciotta, A., Patrino, R., Ribaud, M.R., Jirillo, E., Passantino, G.F., 2005. *Do Fish Thrombocytes Play an Immunological Role? Their Cytoenzymatic Profiles and Function During an Accidental Piscine Candidiasis in Aquarium*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 27, 345–356. <https://doi.org/10.1081/IPH-200067959>
- PeixeBr, 2019. Anunário PeixeBr 2019. Assoc. Bras. Piscic.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Balcázar, J.L., 2014. *Probiotics in aquaculture: a*

- current assessment. *Rev. Aquac.* 6, 133–146. <https://doi.org/10.1111/raq.12033>
- Picchietti, S., Fausto, A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R., Buonocore, F., Scapigliati, G., Abelli, L., 2009. *Early treatment with Lactobacillus delbrueckii strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval Dicentrarchus labrax (L.)*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.008>
- Picchietti, S., Mazzini, M., Taddei, A.R., Renna, R., Fausto, A.M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A., Abelli, L., 2007. *Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.009>
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N., Maita, M., 2011. *Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) by Lactobacillus rhamnosus GG*. *Res. Vet. Sci.* 91, e92–e97. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.014>
- Ramos, M.A., Batista, S., Pires, M.A., Silva, A.P., Pereira, L.F., Saavedra, M.J., Ozório, R.O.A., Rema, P., 2017. *Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia*. *Animal* 11, 1259–1269. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002792>
- Ramos, M.A., Weber, B., Gonçalves, J.F., Santos, G.A., Rema, P., Ozório, R.O.A., 2013. *Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 166, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.025>
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. *Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system*. *Aquac. Res.* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
- Soltani, M., Pakzad, K., Taheri-Mirghaed, A., Mirzargar, S., Shekarabi, S.P.H., Yosefi, P., Soleymani, N., 2019. *Dietary Application of the Probiotic Lactobacillus plantarum 426951 Enhances Immune Status and Growth of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Vaccinated Against Yersinia ruckeri*. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11, 207–219. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9376-5>
- Soto, J.O., 2017. *Bacillus Probiotic Enzymes*, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc., pp. 15–35. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.11.001>
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Huang, K.P., Ye, J.D., 2012. *Culture-independent characterization of the autochthonous gut microbiota of grouper Epinephelus coioides following*

- the administration of probiotic Enterococcus faecium. Aquac. Int.* 20, 791–801.
<https://doi.org/10.1007/s10499-012-9503-y>
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Lin, W.Y., 2010. *Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper Epinephelus coioides. Fish Shellfish Immunol.* 29, 803–809.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018>
- Telli, G.S., Ranzani-Paiva, M.J.T., Dias, D. de C., Sussel, F.R., Ishikawa, C.M., Tachibana, L., 2014. *Dietary administration of Bacillus subtilis on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia Oreochromis niloticus raised at different stocking densities. Fish Shellfish Immunol.* 39, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.025>
- Uramoto, K.; Walder, J. M. M.; Zucchi, R.A., 2005. Análise Quantitativa e Distribuição de Populações de Espécies de Neotrop. *Entomol.* 33–39.
- Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J.M., García-Millán, I., Martín del Río, M.P., Moriñigo, M.A., Mancera, J.M., 2010. *Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream Sparus auratus. Aquaculture* 309, 265–271.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.029>
- Wang, M., Lu, M., 2016. *Tilapia polyculture: a global review. Aquac. Res.* 47, 2363–2374.
<https://doi.org/10.1111/are.12708>
- Watanabe, W.O., Losordo, T.M., Fitzsimmons, K., Hanley, F., 2002. *Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. Rev. Fish. Sci.* 10, 465–498.
<https://doi.org/10.1080/20026491051758>
- Yang, H.L., Sun, Y.Z., Ma, R.L., Ye, J.D., 2012. *PCR-DGGE analysis of the autochthonous gut microbiota of grouper Epinephelus coioides following probiotic Bacillus clausii administration. Aquac. Res.* 43, 489–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02852.x>

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os probióticos são produtos muito visados atualmente para todas as espécies, principalmente por atuarem no sistema imune, proporcionando a diminuição da utilização de medicamentos como os antibióticos. Para animais de produção, estão sendo amplamente estudados também como promotor de crescimento. Neste estudo foi possível observar que alguns dos probióticos avaliados, foram eficientes no desempenho zootécnico de crescimento e na modulação da microbiota intestinal, afirmando o potencial dos mesmos para comercialização.

Estudos para avaliar se há efeito antagônico entre as bactérias utilizadas podem ser realizados, uma vez que foram verificados efeitos benéficos em algumas delas separadamente e não na utilização delas juntas. Assim como seria pertinente efetuar a identificação das bactérias da microbiota intestinal avaliadas no DGGE para melhor entendimento da modulação ocorrida quando fornecido dietas aditivadas com os probióticos. Os parâmetros hematológicos e imunológicos podem ser analisados ao longo do experimento e não apenas ao final, para que seja verificado com quanto tempo se tem início os efeitos benéficos e se eles permanecem ao longo do tempo.

Em estudos anteriores, *in vitro*, as bactérias utilizadas neste trabalho apresentaram capacidade de inibir algumas bactérias patogênicas, como *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, por isso sugere-se que estudos de infecção experimental sejam elaborados no futuro para que se tenha conhecimento da eficácia destes probióticos como inibidores de patógenos.