

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

**UTILIZAÇÃO DE IMUNOESTIMULANTES EM TILÁPIA-
DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Raissa Bertoncello Cavalcante

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva
Co-orientadora: 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
Julho - 2015

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

**UTILIZAÇÃO DE IMUNOESTIMULANTES EM TILÁPIA-
DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Raissa Bertoncello Cavalcante

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva
Co-orientadora: 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
Julho - 2015

EPÍGRAFE

Desconfiai do mais trivial, na aparência singela.
E examinai, sobretudo, o que parece habitual.
Suplicamos expressamente: não aceiteis o que é de
hábito como coisa natural, pois em tempo de
desordem sangrenta, de confusão organizada, de
arbitrariedade consciente, de humanidade
desumanizada, nada deve parecer natural,
nada deve parecer impossível de mudar.

Bertolt Brecht

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, por todo amor, educação e confiança sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha pequena grande família, *Maria de Fátima Pereira Bertoncello e Natassia Bertoncello Cavalcante*, por todo apoio e confiança durante esses anos, vocês foram fundamental em todos os momentos, todo esse esforço é por vocês!

À minha orientadora Prof^a Dr^a *Maria José Tavares Ranzani-Paiva*, pela amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pela autonomia que pude ter para efetuar o experimento em Pirassununga.

Aos pesquisadores Dr^a *Danielle de Carla Dias*, Dr *Carlos Massatoshi Ishikawa*, pelos conselhos, auxílio e apoio durante a realização desse trabalho.

Ao Instituto de Pesca – APTA/SAA-SP e ao Programa de Pós Graduação em *Aquicultura e Pesca* pela oportunidade da realização da pós-graduação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio financeiro (2014/17967-4).

A ALLTECH pela doação do produto *Actigen*, um dos tratamentos do meu projeto. Obrigada por sempre estarem de portas abertas para a ciência.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) e ao chefe da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, *Fábio Rosa Susseel*, por conceder a infraestrutura necessária para realização deste projeto, e pela confiança durante todos esses anos de trabalho.

À banca examinadora Prof. Dr. *Antenor Aguiar Santos e Uriel Rodriguez Estrada* pelas contribuições e sugestões no Exame de Qualificação.

À Dr^a. *Maria Letícia Petesse* (Pós-doutoranda do Instituto de Pesca) pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Aos pesquisadores Dr. *Hélcio Marques* e Dr. *Marcello Boock* pelo conhecimento compartilhado.

À banca examinadora da dissertação, Dr. *Giovani Sampaio Gonçalves* e Dr. *Leonardo Tachibana*, pelo aceite do convite e pela amizade.

À *Hirla Fukishima*, por todo conhecimento passado, pelos dias de convivência, pela amizade e pelo incentivo a entrar no mestrado.

À *Profª. Drª. Elisabeth Romagosa*, pelas risadas, pelos conselhos, pela amizade!

Aos funcionários do APTA – Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, *Jair Donizetti Mazzafero, Claudio Cirineu Ciola, Tereza Jacintho de Souza e Aparecida Conceição Mariscal* pelo dia a dia alegre e por toda a ajuda que obtive durante a estadia no APTA.

Aos amigos *Ednara Ronise Lima de Araújo, Eliana Oshiro, Mariana Machado Evangelista, Mayara Moura, Manoel Joaquim Pereira Ribeiro e Thaís Monteiro Ferreira*, pelos bons e maus dias, pelo companheirismo, pelos conselhos, por terem me ajudado de diversas formas ao longo do mestrado. Foram dias muito felizes!

Ao meu grande amigo *Caio Pianta Pereira*, pela alegre convivência em Pirassununga, pelos conselhos, risadas, amizade de anos!

Ao meu namorado, amigo, incentivador, *Guilherme Silveira Telli*, por ter me auxiliado de todas as formas possíveis ao longo desses anos. Com você tudo ficou mais fácil, obrigada pelas puxadas de orelha, pelos ensinamentos, e principalmente por saber que posso compartilhar com você meus medos e alegrias.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
Capítulo 1: HEMATOLOGIA, RESPOSTA IMUNE INATA E RESISTÊNCIA BACTERIANA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM PROBIÓTICO E PREBIÓTICOS	19
Resumo	20
Introdução	21
Material e Métodos	22
Resultados	27
Discussão	31
Conclusão	33
Referências Bibliográficas	34
Capítulo 2: DESEMPENHO E AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM PROBIÓTICO E PREBIÓTICOS	38
Resumo	39
Introdução	40
Material e Métodos	41
Resultados	46
Discussão	49
Conclusão	52
Referências Bibliográficas	53
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho, a microbiota intestinal, os parâmetros hematológicos e imunológicos de tilápia-do-nylo alimentados com ração suplementada com probiótico e prebióticos, além da sobrevivência frente a desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*. Para o primeiro experimento foram utilizadas 240 tilápias ($8,84 \pm 1,29$ g), distribuídas em 24 aquários de 40L, com seis tratamentos, com 4 repetições e alimentadas durante 63 dias: Controle (C), Probiótico DBA, constituído de $3,5 \times 10^9$ UFC g^{-1} *Bifidobacteria*, $3,5 \times 10^9$ UFC g^{-1} *Lactobacillus acidophilus* e $3,5 \times 10^9$ UFC g^{-1} *Enterococcus faecium* (PRO), os Prébióticos Actigen - MOS (PRE1), Quitosana (PRE2) e os simbióticos DBA e Actigen - MOS (S1), DBA e Quitosana (S2). No desafio bacteriano foram utilizadas 180 tilápias-do-nylo, distribuídas em 18 aquários de 40L, com os mesmos seis tratamentos, com 3 repetições. Os peixes receberam as dietas experimentais durante 21 dias, três vezes ao dia, até a saciedade. Após o período de alimentação os peixes foram infectados via injeção intraperitoneal com $1,26 \times 10^8$ UFC mL^{-1} de *Aeromonas hydrophila* e observados durante 15 dias para a detecção da mortalidade. O delineamento dos dois experimentos foi inteiramente casualizado, e em ambos os casos, os dados foram submetidos ao teste de ANOVA e, quando $p < 0,05$, foi realizado o teste de Dunnett. No desempenho zootécnico, houve diferença significativa na biomassa final dos tratamentos S2 e PRE2 quando comparados com S1, e maior ganho de peso individual no grupo S2 em relação ao grupo S1. A avaliação da microbiota intestinal não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) nos índices de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp no intestino dos animais que foram suplementados com os prebióticos Actigen e Quitosana e o probiótico DBA, quando utilizados em separado e em conjunto. No desafio bacteriano, o nível de proteção relativa (NPR) foi maior no grupo S1 (40%) em relação a proteção do grupo controle, apontando interação positiva entre o probiótico DBA e o prebiótico mananoligossacarídeo (Actigen). Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos e imunológicos.

Palavras-chave: Simbióticos, probióticos, prebióticos, nutrição, hematologia, imunologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the growth performance, intestinal microbiota, hematological and immunological parameters, from Nile tilapia fed with supplemented diet with probiotic and prebiotics, and bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila* survival. For the first experiment were used 240 tilapia, distributed in 24 tanks of 40L, with six treatments, 4 replicates and were fed for 63 days: Control (C), Probiotic DBA, consisting of - $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ *Bifidobacteria*, $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ *Lactobacillus acidophilus* and $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ *Enterococcus faecium* (PRO), prebiotics Actigen - MOS (PRE1), chitosan (PRE2), and symbiotic DBA and Actigen – MOS (S1), DBA and chitosan (S2). In bacterial challenge were used 180 Nile tilapia, distributed in 18 tanks 40L, with the same six treatments with three repetitions. Fish received the experimental diets for 21 days, three times daily until satiation. After the feeding period the fish were infected by intraperitoneal injection with $1,26 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ from *Aeromonas hydrophila* and observed for 15 days for the detection of mortality. The design of the two trials was randomized, and in both cases, the data were submitted to ANOVA test and $p < 0.05$, was held the Dunnett test. On the growth performance, there was a significant difference in the final biomass of the S2 and PRE2 treatments compared to S1, and greater individual weight gain in the S2 group compared to the S1 group. The evaluation of the intestinal microbiota showed no statistical difference ($p > 0.05$) in the levels of bacteria of the genus *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Enterococcus* spp the intestine of the animals that were supplemented with the prebiotics Actigen and Chitosan and the probiotic DBA, used separately and together. In the bacterial challenge, the level of relative protection (NPR) was higher in the group S1 (40%) compared to the control group protection, pointing to a positive interaction between the DBA probiotic and prebiotic mannan oligosaccharide (Actigen). No significant differences were observed in hematological and immunological parameters.

Key Words: Symbiotics, Prebiotics, Probiotics, Nutrition, Hematology, Immunology.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura representa hoje o setor de maior crescimento na produção de alimentos de origem animal, com mais de 600 espécies produzidas, fornecendo cerca da metade (47%) de todo o pescado destinado à alimentação humana. A previsão é de que até 2030 a demanda de pescado aumente em mais de 100 milhões de toneladas por ano (FAO, 2012). O declínio dos estoques naturais dos peixes tem sido um incentivo para a diversificação do setor aquícola atual (WHYTE, 2007).

A produção mundial hoje é de 126 milhões de toneladas e o Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda por pescados, sobretudo por meio da aquicultura (MPA, 2012).

Em 2012, a produção de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) atingiu 3 milhões de toneladas, sendo a quinta espécie mais cultivada no mundo (FAO, 2012). No Brasil foram produzidos em torno de 155 mil toneladas em 2010, se tornando a espécie de peixe mais criada (MPA, 2012). Esse peixe se destaca nas criações intensivas por ser rústica, precoce, e possuir boa aceitação no mercado, características favoráveis ao seu consumo (FURUYA *et al.*, 2005).

A intensificação dos cultivos causa estresse aos animais e diminui a qualidade da água (YOUSEFIAN e AMIRI, 2009). O estresse reduz a competência imunológica desses animais, que se tornam mais vulneráveis às infecções bacterianas, e nesses casos é comum a antibioticoterapia, alvo de críticas, por seu potencial para selecionar bactérias resistentes e para destruir a microbiota ambiental (GARCIA, 2008). Com isso, aumentou o número de pesquisas com alimentos funcionais e de substâncias que promovam o aumento da eficiência alimentar e da taxa de crescimento dos peixes (OLIVEIRA *et al.*, 2002), aumento da resistência do animal às doenças infecciosas (ALY *et al.*, 2008) e alternativas para redução do uso de antibióticos (KESARCODI-WATSON *et al.*, 2008).

A utilização de alimentos funcionais na nutrição de peixes é uma alternativa interessante, principalmente por sua composição não causar danos ao meio ambiente e pelas respostas positivas de desempenho zootécnico (HISANO *et al.*, 2004).

Os probióticos são usados há muitos anos, de diversas maneiras, no mundo todo. Segundo FÜLLER (1989), os probióticos são organismos vivos utilizados como suplementos que podem produzir efeitos benéficos no hospedeiro, equilibrando a microbiota intestinal. SCHREZENMEIR e DE VRESE (2001), propuseram que o termo probiótico deveria ser utilizado para designar preparações ou produtos que contenham microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alterem a microbiota intestinal por implantação ou colonização do sistema do hospedeiro e que produzem efeitos benéficos em sua saúde. Para se tornar um produto de boa qualidade na alimentação animal, é necessário que a seleção de bactérias probióticas siga alguns critérios, tais como o gênero ao qual a bactéria pertença; sua estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile; capacidade de aderência à mucosa intestinal; capacidade de colonização, mesmo que temporariamente do trato gastrintestinal; capacidade de produção de compostos antimicrobianos metabolicamente ativos no intestino (COLLINS *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000). Entre os microorganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, as quais são mais frequentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras.

A interação entre ambiente e hospedeiro no ecossistema aquático é complexa, pois os microrganismos na água influenciam a microbiota do intestino dos animais e vice-versa. Os gêneros de bactérias presentes no intestino dos hospedeiros parecem ser aqueles presentes no ambiente ou no alimento, que conseguem sobreviver e se multiplicar (VERSCHUERE *et al.*, 2000). Os probióticos utilizados para organismos aquáticos apresentam efeitos benéfico não só nos animais, mas também no ambiente de criação (MEURER, 2005), por meio da melhoria da qualidade da água.

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão totalmente elucidados. Especula-se que alguns processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição bacteriana intestinal (GHADBAN, 2002). A gama de atividade dos probióticos pode ser dividida em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos. De acordo com VERSCHUERE *et al.* (2000), três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células bacterianas viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a

competição por sítios de adesão. O segundo mecanismo é a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro é o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (FÜLLER, 1989). Os probióticos não apresentam efeitos bactericidas diretamente, mas sim de competição com as bactérias, inibindo seu desenvolvimento e contribuindo para o equilíbrio biológico (BALCÁZAR, 2002).

LARA-FLORES *et al.* (2003) avaliaram o efeito da inclusão de 0,1% da mistura de *Streptococcus faecium* + *Lactobacillus acidophilus* em tilápia-do-nylo e como resultado apresentaram taxa de crescimento específico maior em relação ao grupo controle, demonstrando efetividade se utilizados como promotores de crescimento. Ainda com tilápia-do-nylo, APUN-MOLINA (2009) concluíram que, ao trabalhar com bactérias ácido-láticas e bacilos, a administração dos probióticos na água, alimentação ou misto, aumentaram o peso final e a taxa de crescimento específica dos peixes em relação ao grupo controle. WANG *et al.* (2008) avaliaram o efeito de *E. faecium* em tilápia-do-nylo aplicado na água dos aquários experimentais na concentração de 10^7 UFC mL⁻¹ (suplementado uma vez a cada quatro dias) e observaram maior peso final, maior atividade de mieloperoxidase, maior explosão respiratória e maior número de fagócitos sanguíneos no grupo que recebeu a bactéria probiótica.

As evidências de efeitos positivos dos probióticos deram origem aos prebióticos, ingredientes não digestíveis da dieta que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de bactérias benéficas para o trato gastrointestinal, melhorando a saúde do hospedeiro (GIBSON and ROBERFROID, 1995).

A Instrução Normativa nº 13/2004 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), descreve os prebióticos como aditivos zootécnicos, considerados ingredientes que não são digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, mas que são fermentados pela flora bacteriana do trato digestório originando substâncias que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias benéficas. Para um produto ser considerado prebiótico, não pode ser absorvido ou hidrolisado no intestino, pois é um substrato seletivo para um determinado grupo de bactérias comensais benéficas, capaz de alterar positivamente a microbiota intestinal e a induzir efeitos no lúmen intestinal ou

sistêmicos que sejam benéficos ao hospedeiro. A maioria dos oligossacarídeos não digestíveis tem sido utilizados como prebióticos, devido a sua seletividade fermentativa (SILVA e NÖENBERG, 2003).

Os oligossacarídeos são cadeias curtas de polissacarídeos, compostos de três a dez açúcares simples ligados entre si. Segundo BACILA (2003) os oligossacarídeos possuem de 2 até 10 unidades de monossacarídeos. As cadeias de oligossacarídeos são processadas no complexo de Golgi nas células intestinais produtoras de muco, nas células caliciformes, que teriam ligação com este processo de liberação de muco intestinal (ALBERTS *et al.* 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005). Isso poderia indicar que alguns monômeros de oligossacarídeos, oriundas dos prebióticos possam ser absorvidas no trato gastrointestinal.

De acordo com ABRAHAM e BEACHEY (1985), os mananoligossacarídeos (MOS) são derivados de glucomanoproteínas oriundas da parede celular de leveduras. O modo de ação dos MOS é a adsorção de agentes patogênicos, bloqueando a sua colonização. As bactérias patogênicas colonizam o trato gastrintestinal ligando-se aos açúcares manose na superfície do intestino. Ao fornecer uma rede de manose no complexo manano, os patógenos ligam-se à rede e são expelidos do sistema. A utilização destes polissacarídeos melhora a saúde de peixes (ROBERTSEN *et al.*, 1994; SAKAI, 1999), considerando que o MOS atua sobre o sistema imunológico e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrintestinal do animal (SPRING, 2000; STAYKOV *et al.*, 2005; STAYKOV *et al.*, 2007), melhorando o desempenho de peixes (ZHOU and LI, 2004; CULJAK *et al.*, 2006; STAYKOV *et al.*, 2007).

A quitosana é um polissacarídeo produzido através da deacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, e demonstrou estimular a atividade imunológica em peixes (SAKAI, 1999). Em *Litopenaeus vannamei*, foram injetados doses de quitina e quitosana e como resposta houve aumento na sobrevivência, do número de células sanguíneas, explosão respiratória e atividade fagocítica quando desafiados com *Vibrio alginolyticus* (WANG *et al.*, 2005). Diversos trabalhos tem demonstrado estímulo da atividade imunológica ao utilizar quitosana ou quitina em diferentes espécies, como truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), dourada (*Sparus aurata*) e carpa

comum (*Cyprinus carpio*) (ANDERSON *et al.*, 1995; ESTEBAN *et al.*, 2001; GOPALAKANNAN *et al.*, 2006).

A aplicação da hematologia em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). O estudo dos constituintes sanguíneos dos peixes pode ser utilizado ainda como um indicador prognóstico de condições patológicas, especialmente quando consideradas as alterações morfológicas nas células sanguíneas. Estas avaliações permitem identificar os diferentes graus de resposta dos peixes quando enfermos, nos quais a severidade das alterações implica pior condição frente ao desafio imposto. Neste sentido, SATAKE *et al.* (2009) descrevem as principais alterações morfológicas observadas nas células sanguíneas de peixes teleósteos em criação. Além disso, pode-se obter a etiopatogenia das enfermidades por meio da avaliação hematológica tanto nos parâmetros quantitativos, como nos qualitativos (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

O sistema imune dos peixes apresenta dois tipos de resposta: a resposta imune inata, funcionando como uma primeira barreira contra microrganismos; e a resposta imune específica, responsável pela identificação de antígenos e produção de anticorpos específicos (BERNSTEIN *et al.*, 1998). O sistema imune inato, segundo BLY e CLEM (1994), possui grande versatilidade e desempenha papel importante, uma vez que o sistema específico responde lentamente quando comparado ao de mamíferos, principalmente em temperaturas da água abaixo do conforto para a espécie. O importante aspecto do sistema imune inato é a falta de especificidade, resultando no deslocamento da maioria das células envolvidas para o local onde está o agente patógeno (SECOMBES, 1996).

De acordo com IWANA e NAKANISHI (1996), fatores celulares e hormonais de ambos os sistemas, inato e adquirido, promovem nos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Apesar da diferenciação na classificação desses dois sistemas de defesa, é importante ressaltar que, quando um agente patogênico ataca o organismo, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imune, onde vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (FERNANDEZ *et al.*, 2002).

Diante do exposto, o presente estudo apresenta os efeitos da inclusão do probiótico DBA[®] (*Lactobacillus acidophilus* - $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹, *Enterococcus faecium* - $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ e *Bifidobacteria* - $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹) e dos prebióticos Actigen - MOS (Alltech) e quitosana na ração de tilápia-do-nilo.

2. OBJETIVOS

- **OBJETIVOS GERAIS**

Objetiva-se avaliar a inclusão de um probiótico comercial 1) DBA e dois prebióticos 1) Actigen (Mananoligossacarídeo) e 2) Quitosana em diferentes concentrações na dieta de tilápia-do-nilo, testados separadamente e juntos.

- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o desempenho zootécnico, a microbiota intestinal, os parâmetros hematológicos, a resposta imune inata e a sobrevivência de tilápia-do-nilo frente a um desafio bacteriano, quando alimentada com rações suplementadas com o probiótico DBA[®] ($3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ *Bifidobacteria*, $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ *Lactobacillus acidophilus* e $3,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ *Enterococcus faecium*), e com os prebióticos Actigen (Mananoligossacarídeo – Alltech) e quitosana, testando os produtos separados e em simbiose.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM S.N.; BEACHEY E.H. 1985 Host defenses against adhesion of bacteria to mucosal surfaces. In: *Advances in host defense mechanisms*. Gallin J.I. and Fauci A.S. (eds). Raven Press. New York. pp 63-88.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. et al. 2004 *Biologia molecular da célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 1463p.
- ALY, S.M.; AHMED Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A. & MOHAMED, M.M. 2008 Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish immunology*. 25:128-136.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. 1995 Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). *Diseases in Asian aquaculture II*. Manila: Asian Fisheries Society, Fish Health Section, p. 185-202.
- APUN-MOLINA, J.P.; SANTAMARIA-MIRANDA, A.; LUNA-GONZALEZ, A.; MARTINEZ DIAZ, S.F.; ROJAS-CONTRERAS, M. 2009 Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8): 887-893.
- BACILA, M. 2003 *Bioquímica veterinária*. 2.ed. São Paulo: Robe, 583p.
- BALCÁZAR, J.L. 2002 Uso dos probióticos em acuicultura: Aspectos generales. *I Congresso Ibero americano Virtual de Acuicultura*. (CIVA), p. 877- 881.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. 1998 Immunity. In: Evans, D.H. *The physiology of fishes*. 2ed. Boca Raton: CRC Press, p.215-242.
- BLY, J.E.; CLEM, L.W. 1994 Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. In: COSSINS, A.R. (Ed.). *Temperature adaptation of biological membranes*, London: Portland Press, p.169-184.
- COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. 1999 Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1052-1057.
- CULJAK, V.; BOGUT, G; HAS-SHON, E et al. 2006 Effect of Bio-MOS on performance and health of juvenile carp. In: *Nutrition and biotechnology in the feed and food industries: Alltecch's 22nd annual symposium*, Lexington.
- ESTEBAN, M.A.; CUESTA, A.; ORTUNO, J.; MESEGUER, J. 2001 Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunology*, 11:303-315.
- FAO, Fishery and Aquaculture, 2012. Disponível em <<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>> Acesso em 20 de Novembro de 2014.
- FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. 2002 El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Rev. AcuaTic*, v.16.
- FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; MACEDO, R.M.G.; SANTOS, V.G.; SANTOS, L.D.; SILVA, T.S.C.; FURUYA, V.R.B.; SALES, P.J.P. 2005 Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.34, p.1433-1441.
- FULLER, R. 1989 A review: probiotic in man and animals. *Journal Applied Environmental Microbiology*, 63: 1034-1039.
- GARCIA, F. 2008 *Suplementação alimentar com beta-glucano e mananossacarídeo para tilapias do Nilo em tanques-rede*. 120 p. Dissertação

(Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal/SP.

GHADBAN, G.S. 2002 Probiotics in Broiler production – a review. *Archive Geflugelk.* v.66, n.2, p. 49-58.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. 1995 Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 125, p. 401-412.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. 2006 Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255:179-187.

HISANO, H. 2005 *Levedura desidratada íntegra, autolizada e parede celular como pró nutrientes para tilápia do Nilo*. 2005. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. 1996 The fish Immune System. *Fish Physiology*, v.15.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 2008 *Histologia básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 524p.

KESARCODI-WATSON, A.; KASPAR, H.; JOSIE LATEGAN, M.; GIBSON, L. 2008 Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274 (1): 1-14.

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMAN-MENDEZ, B.E. 2003 Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 216, p. 193-201.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2003 Evaluation of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, v. 219, p. 681-692.

MEURER, F. 2005 *Levedura (Saccharomyces cerevisiae) como probiótico para as fases iniciais do cultivo de Tilápia-do-Nilo (Oreochromis niloticus)*. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Governo Federal: Brasília, fev. 2012. Disponível em: <

http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2015.

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

RANZANI-PAIVA M.J. e SILVA-SOUZA A.T. 2004 Hematologia de Peixes Brasileiros. In: *Sanidade de Organismos Aquáticos* (ed. By M.J. Ranzani-Paiva, R.M.Takemoto e M.A.P. Lizama), p. 89-120. Varela Publishing, Sao Paulo, Brasil.

RANZANI-PAIVA, M.J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. 2013 *Métodos para análise hematológica em peixes*. 1º Ed. Maringá: Eduem. 135p.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.B. 1994 Glucans as immunostimulants in fish. In: Stolen, J., Fletcher, T.C. (Eds) *Modulators of Fish Immune Responses*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp 83-99.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J; MATTILA-SANDHOLM, T. 2000 Probiotic bacteria safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v.8, n.3, p. 197-215.

SAKAI, M. 1999 Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v.172, p. 63-92.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. 2008 Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39: 223-239.

SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. 2009 Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. 1° Ed. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-45.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. 2001 Probiotics, prebiotics and symbiotics - approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.73, n.2, p.361-364.

SCHWARZ, K. S.; FRANCO, S.; FEDALTO, M. 2002 *Substituição de probióticos e prebióticos na alimentação de frangos e corte*. UFPR (Dissertação), Curitiba, 83p.

SCHWARZ, K. S.; FANTA, E.; WERNECK, P. R.; et al. 2005 Dados preliminares do desenvolvimento e ganho de massa corpórea como consequência da utilização de mananoligossacarídeo na alimentação de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) e sua relação com as características teciduais. UFPR, <http://25pgbiocel.bio.ufpr/ResumosPUB/0049.html>, Curitiba.

SECOMBES, C.J. 1996 The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. *The Fish Immune System*. London: Academic Press. p.63-105.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. 2003 Prebióticos na nutrição de não ruminantes – Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 5, p 983-990, set-out.

SPRING, P. 2001 Yeast's secret wear on aids animal production. *Feed Mix*. p. 32.

STAYKOV, Y.; DENEV, S; SPRING, P. 2005 Influence of dietary mannan oligosaccharide (Bio-MOS) on e growth rate and immune of common carp (*Cyprinus carpio* L.). In: Howell B, Flos R (eds) *Lessons from the past to optimize the future*. *European Aquaculture Society*, Special Publication. N 35, june, p. 431- 432.

STAYKOV, Y.; SPRING, P; SWEETMAN, J. 2007 Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Int*, v. 15, p. 153-161.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELLOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000 Probiotic bactéria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p.655-671.

WANG, Y.B.; XU, Z.R.; XIA, M.S. 2005 The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei*) ponds. *Fisheries Science*, v. 71, p.1034–103.

WANG, Y.B.; TIAN, Z.Q.; YAO, J.T.; LI, W.F. 2008 Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, v. 277, p. 203-207.

WHYTE, S. K. 2007 The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, v.23, p.1127-1151.

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M.S. 2009 A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology*, 8:7313-7318.

ZHOU, X. Q.; LI, Y, L. 2004 The effects of Bio-Mos® on intestinal microflora and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian). In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries: Proceedings of Alltec's 20th annual symposium*, Lexington.

CAPÍTULO 1

HEMATOLOGIA, RESPOSTA IMUNE INATA E RESISTÊNCIA BACTERIANA DE TILÁPIA-DO-NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM PROBIÓTICO, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

(Segundo normas da revista *Fish and Shellfish Immunology*)

Hematologia, resposta imune inata e resistência bacteriana de tilápia-do-nylo alimentada com rações suplementadas com probiótico, prebióticos e simbióticos

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos, imunológicos e posterior sobrevivência de tilápia-do-nylo desafiada com *Aeromonas hydrophila*. Para avaliação dos parâmetros hematológicos e imunológicos foram utilizadas 240 tilápias revertidas ($8,84 \pm 1,29$ g) distribuídas em 24 aquários de 40L, sendo seis tratamentos, com 4 repetições: Controle (C), Probiótico DBA, os prebióticos Actigen e Quitosana, e os simbióticos DBA e Actigen e DBA e Quitosana. Os animais foram alimentados durante 63 dias para coleta final de sangue, plasma e soro. Do sangue foram feitas análises de hematócrito, taxa de hemoglobina, número total de eritrócitos e extensão sanguínea; do plasma foi feita análise de lisozima e do soro foram feitas análises de proteínas totais e albumina. Para o desafio bacteriano foram utilizadas 180 tilápias-do-nylo, distribuídas em 18 aquários de 40L, sendo os mesmos 6 tratamentos do primeiro experimento, em 3 repetições. Os peixes foram alimentados durante 21 dias, para posterior injeção intraperitoneal de $1,26 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de *Aeromonas hydrophila*. Foi realizada a observação de sinais clínicos e mortalidade durante 15 dias para cálculo de mortalidade acumulada e do índice de proteção relativa. O delineamento dos dois experimentos foi inteiramente casualizado, e em ambos os casos, os dados foram submetidos ao teste de ANOVA e, quando $p < 0,05$, foi realizado o teste de Dunnett. Não foram observadas diferenças nos parâmetros hematológicos e imunológicos entre os tratamentos testados. Os peixes alimentados com a dieta contendo a simbiose entre DBA[®] e Actigen - MOS, demonstraram maior nível de proteção relativa à infecção por *Aeromonas hydrophila*, com menor porcentagem de mortalidade acumulada.

Palavras-chave: Simbióticos, imunoestimulantes, nutrição, imunologia, desafio bacteriano, aquicultura.

INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) tem sido a espécie mais criada no Brasil, graças ao grande conhecimento de sua reprodução, rusticidade e adaptabilidade. Porém, ainda faltam informações sobre a nutrição, principalmente no uso de aditivos, os quais podem contribuir de forma significativa na saúde e desempenho dos peixes (SCHWARZ, 2011).

Concomitante ao crescimento da piscicultura ocorre o aumento da prática de intensificação do cultivo, resultado de constantes avanços tecnológicos e científicos. Como consequência, existe uma tendência de piora da qualidade da água, estresse dos peixes e aumento da incidência de doenças e outros efeitos deletérios à saúde dos peixes confinados. Dentre os principais agentes causadores de doenças, estão as bactérias do gênero *Aeromonas* sp. (PLUMB, 1999), patógenos oportunistas que trazem grandes prejuízos econômicos aos piscicultores e que são comumente combatidos com a adição de quimioterápicos e antibióticos às dietas. Entretanto, o uso indiscriminado de agentes terapêuticos pode levar ao desenvolvimento de cepas de organismos resistentes (COLLADO *et al.*, 2000; KAWAKAMI *et al.*, 1997).

Uma alternativa ao uso dos antibióticos são as substâncias imunoestimulantes, como os probióticos, prebióticos e simbióticos, que vem sendo estudados e utilizados como uma alternativa viável economicamente e ambientalmente.

Os probióticos são definidos como qualquer adjunto microbiano vivo que tenha efeito benéfico ao hospedeiro, seja modificando o organismo animal ou a comunidade microbiana do ambiente aquático, através de uma melhora no uso da dieta ou seu valor nutricional, na resposta do hospedeiro a doenças, ou ainda na qualidade do ambiente em que se encontra (VERSCHUERE *et al.*, 2000). Os prebióticos são substâncias não digeríveis por enzimas do trato gastrintestinal, mas capazes de serem seletivamente hidrolisadas por microrganismos específicos que compõem a microbiota intestinal, promovendo benefícios ao hospedeiro (FOOKS *et al.*, 1999). Já o termo simbiótico refere-se a um aditivo alimentar que combina um prebiótico e um probiótico, e cujos benefícios são maiores se comparados à administração do prebiótico e do probiótico em separado (HOLZAPFEL and SCHILLINGER, 2002).

Os efeitos já relatados em peixes tratados com esses aditivos podem ser: aumento da sobrevivência após desafio bacteriano, melhora no crescimento, aumento nos níveis de lisozima, aumento da atividade dos macrófagos e aumento da proliferação celular (BRICKNELL and DALMO, 2005).

A avaliação dos parâmetros imunológicos é uma importante ferramenta para o entendimento das respostas fisiológicas, por ser sensível à ação de fatores estressores. De acordo com WATTS *et al.* (2001), é fundamental o entendimento da complexidade desse sistema, suas peculiaridades e a influência sofrida tanto do animal quanto do meio sobre algumas de suas variáveis, para que não haja interpretações equivocadas.

Os estudos sobre imunoestimulantes têm focado a avaliação dos componentes humorais e celulares da resposta inata. O sistema imunológico inato é importante para os mecanismos de resistência a doenças em peixes, especialmente porque a resposta imunológica adquirida é geralmente lenta (MAGNADOTTIR, 2006). As análises no soro mostra que mudanças humorais ocorrem quando imunoestimulantes são administrados, incluindo aumento na lisozima e aumento do complemento, como demonstrado para o salmão do Atlântico por ENGSTAD *et al.* (1992). Incrementos na lisozima também foram detectados em truta (JORGENSEN *et al.*, 1993), salmão do Atlântico (ENGSTAD *et al.*, 1992), e “yellowtail” *Seriola quinqueradiata* (MATSUYAMA *et al.*, 1992),

O objetivo desse trabalho foi avaliar os parâmetros hematológicos, imunológicos e índice de proteção relativa frente a desafio bacteriano com a bactéria *Aeromonas hydrophila* de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com um probiótico e dois prebióticos, a serem testados juntos e separadamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP. Foram realizados dois experimentos, onde foram utilizadas seis rações experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis de garantia e percentual de inclusão dos imunostimulantes utilizados nas seis rações experimentais.

Tratamento	Níveis de Garantia	Percentual de Inclusão
Controle (C)	-----	-----
Probiótico DBA [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹ , <i>Enterococcus faecium</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹ e <i>Bifidobacteria</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹	0,03%
Actigen	140g Mananas kg ⁻¹	0,4%
Quitosana	100% Quitosana	0,4%
DBA [®] + Actigen		0,03%+0,4%
DBA [®] + Quitosana		0,03%+0,4%

Foram preparadas seis rações experimentais extrusadas (Tabela 2). O prebiótico foi incluído antes do processo de extrusão, enquanto que a inclusão do probiótico foi realizada após o processo de extrusão, a fim de garantir a sobrevivência e eficácia das bactérias probióticas.

O probiótico foi pesado em balança analítica e homogeneizado em óleo de soja (2,0% da ração) e aspergidos sobre a ração. A dieta controle recebeu a mesma quantidade de óleo de soja. As rações foram mantidas a 4°C e fornecidas três vezes ao dia até a saciedade.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais de tilápias-do-nilo, *O. niloticus*, com inclusão do probiótico DBA (PRO: *A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e simbióticos (DBA+Actigen, DBA+Quitosana).

Rações	Controle	Prebiótico	Probiótico	Simbiótico
Ingredientes	%	%	%	%
Farinha de penas	4,00	4,00	4,00	4,00
Milho moído	22,74	22,34	22,71	22,31
Farinha de vísceras	15,00	15,00	15,00	15,00
Farelo de soja	18,05	18,05	18,05	18,05
Protenose	3,50	3,50	3,50	3,50
Farelo de trigo	8,56	8,56	8,56	8,56
Quirera de arroz	7,00	7,00	7,00	7,00
Farinha de carne	10,00	10,00	10,00	10,00
Farinha de peixe	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de sangue	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
Fosfato bicálcico	0,32	0,32	0,32	0,32
Óleo de peixe	2,00	2,00	2,00	2,00
Clor. de colina	0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina	0,22	0,22	0,22	0,22
L-Treonina	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina	0,26	0,26	0,26	0,26
Antioxidante	0,05	0,05	0,05	0,05
Antifúngico	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
DBA ^{®2}	0,00	0,00	0,03	0,03
Prebiótico ³	0,00	0,40	0,00	0,40

¹Premix: vitA 12000 UI; vitD₃ 3000 UI; vitE 150 mg; vitK₃ 15 mg; vitB₁ 20 mg; vitB₂ 20 mg; vitB₆ 17,50 mg; B₁₂ 40 mg; Vitamina C 300 mg; ac. Nicotínico 100 mg;ác. Pantotênico 50 mg; biotina 1 mg; ác. fólico 6 mg; antioxidante 25 mg; Cu 17,50; Fe 100 mg; Mn 50 mg; Zn 120 mg; I 0,80 mg; Se 0,50 mg; Co 0,40 mg; Inositol 125 mg; Colina 500 mg.

²DBA[®]: *Lactobacillus acidophilus* - 3,5x10⁹UFC g⁻¹, *Enterococcus faecium* - 3,5x10⁹UFC g⁻¹ e *Bifidobacteria* - 3,5x10⁹UFC g⁻¹.

³Prebiótico: Actigen (Alltech) e Quitosana.

Tabela 3. Composição química e bromatológica das dietas experimentais de tilápia-do-nilo com inclusão do probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e simbióticos (DBA+Actigen, DBA+Quitosana).

	Controle	DBA [®]	Actigen	Quitosana	DBA [®] + Actigen	DBA [®] + Quitosana
Matéria seca (%)	95,45	95,54	94,76	94,99	94,31	94,83
Proteína bruta (%)	38,87	38,96	39,37	38,89	39,12	39,22
Fibra bruta (%)	6,00	5,07	5,85	6,60	4,89	5,42
Extrato etéreo (%)	3,83	4,54	4,16	4,37	4,16	4,34
Cinzas (%)	10,43	10,36	10,29	10,35	10,39	10,37

- **1^a Experimento: Avaliação dos parâmetros hematológicos e imunológicos**

O experimento foi realizado num período de 63 dias, com 240 tilápias (8,84g ± 1,29; 7,91 cm ± 0,36) revertidas para machos e distribuídas em 24 aquários com volume útil de 40 litros, sendo estes instalados em sistema aberto de água com aquecedores e sistema de aeração individual, a fim de evitar contaminação entre os tratamentos que não utilizavam bactérias probióticas. A densidade utilizada foi de 10 peixes aquário⁻¹. Foram utilizados seis tratamentos com quatro repetições cada. As trocas de água foram realizadas duas vezes ao dia, retirando-se 50% do volume do aquário, a fim de retirar fezes e eventuais sobras de ração. Diariamente foram analisados os parâmetros da água, tais como oxigênio dissolvido, pH, temperatura e amônia total.

- *Parâmetros hematológicos*

Ao final do período experimental, dois peixes por aquário (n=8) foram anestesiados em óleo de cravo (0,3 mL L⁻¹), o sangue coletado por punção do vaso caudal com seringas heparinizadas (100 UI mL⁻¹). O plasma foi obtido por centrifugação do sangue (2000 x g), durante 10 minutos. Para a obtenção do soro, o sangue foi coletado sem anticoagulante e centrifugado a 2000 x G durante 10 minutos. Tanto o plasma quanto o soro foram mantidos em freezer a -20°C até a utilização.

Imediatamente após a colheita, o sangue foi utilizado para a determinação dos seguintes parâmetros: número total de eritrócitos contados em câmara de Neubauer, hematócrito pelo método de microhematócrito, taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina e preparação de extensões sanguíneas coradas segundo ROSENFELD (1947) para contagem diferencial e total de leucócitos e contagem de trombócitos (HRUBEC e SMITH, 1998).

A partir dos valores encontrados para hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de eritrócitos (Er) foram calculados os índices hematimétricos conforme WINTROBE (1934): volume corpuscular médio (VCM = (Ht x 10) / Er), hemoglobina corpuscular média (HCM = (Hb x 10) / Er) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM = (Hb x 100) / Ht).

A determinação da glicose foi realizada através da utilização de glicosímetro portátil. (Accu-Chek Advantage; Roche Diagnosis®).

- *Parâmetros imunológicos*

A avaliação dos parâmetros imunológicos foi feita com o soro e plasma de 2 peixes por aquário (n=8). A lisozima plasmática foi determinada segundo KIM e AUSTIN (2006) modificado. Diluições seriadas de plasma foram realizadas com tampão fosfato salina (PBS 0,05M) em microplacas de 96 poços de fundo plano. A cada poço foi adicionado 100 µL de solução de *Micrococcus lysodeikticus* (0,4mg.mL⁻¹ de PBS). As placas foram incubadas e a densidade ótica foi medida a 540 nm nos tempos 0, 5 e 10 min. Uma unidade de lisozima foi determinada como a quantidade necessária para diminuir a absorbância em 0,001 m⁻¹.

A determinação de concentração de proteínas totais (PT) foi realizada pelo método do biureto e a de albumina pelo método do verde de bromocresol, utilizando-se kits comerciais específicos (Labtest).

A avaliação da atividade fagocítica foi realizada segundo SILVA *et al.* (2005). Os peixes (n=8) foram anestesiados em óleo de cravo, 1 mL de solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foram injetados na cavidade celomática dos peixes na concentração de 9500 células mm⁻³. Após 4 horas de inoculação, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico seguido de dissecação medular e, em seguida, realizada a lavagem da cavidade celomática com 1 mL de solução salina 0,7% e o líquido aspirado com pipeta Pasteur foi centrifugado a 2000 G por cinco minutos, e o sobrenadante desprezado. Uma alíquota do sedimento foi examinada em microscópio (400x) de contraste de fase para a determinação da capacidade fagocítica (CF) e índice fagocítico (IF) segundo SILVA *et al.* (2005), obedecendo as seguintes fórmulas: CF = n° de fagócitos fagocitando / 100 fagócitos contados e IF = n° total de leveduras no interior dos fagócitos / número de fagócitos fagocitando.

- **2ª Experimento: Desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila***

O desafio bacteriano foi realizado em outro experimento, com 180 tilápias-do-nylo (8,70 g ± 0,53; 6,98 cm ± 1,57) revertidos em macho, distribuídos em 18 aquários de volume útil de 40 litros, sendo estes instalados em sistema aberto de água com aquecedores e de aeração individual, a fim de evitar contaminação entre os tratamentos que não utilizavam bactérias probióticas. A densidade utilizada foi de 10 peixes aquário⁻¹. O manejo realizado nesta segunda etapa foi similar ao descrito anteriormente na primeira etapa do trabalho.

Para a realização do desafio bacteriano com *A. hydrophila*, a bactéria foi doada pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), e foram conduzidos ensaios de DL50, dose letal que causa a morte de 50% dos animais, chegando-se à concentração de 1,26x10⁸ UFC mL⁻¹.

Os peixes foram alimentados com 6 dietas experimentais durante 21 dias, três vezes ao dia, até a saciedade (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis de garantia e percentual de inclusão dos imunoestimulantes utilizados nas seis rações experimentais.

Tratamento	Níveis de Garantia	Percentual de Inclusão
Controle (C)	-----	-----
Probiótico DBA [®]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹ , <i>Enterococcus faecium</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹ e <i>Bifidobacteria</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹	0,03%
Actigen	140g Mananas kg ⁻¹	0,4%
Quitosana	100% Quitosana	0,4%
DBA [®] + Actigen		0,03%+0,4%
DBA [®] + Quitosana		0,03%+0,4%

Após o período de alimentação os peixes foram infectados via injeção intraperitoneal com 0,1mL de solução da bactéria patogênica e observados durante 15 dias para a detecção da mortalidade (ALY *et al.*, 2008).

Os dados obtidos na mortalidade foram utilizados para calculo da porcentagem de mortalidade acumulada e nível de proteção relativa (NEWMAN e MAINARICH, 1982), com a seguinte fórmula:

$$\text{NPR} = 1 - (\% \text{ de mortalidade do tratamento} \div \% \text{ de mortalidade do controle}) \times 100$$

- **Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa Statistica 7, por análise de variância (ANOVA), e quando $p < 0,05$, realizado o teste de Dunnett.

RESULTADOS

Os parâmetros físicos e químicos da água dos dois experimentos não apresentaram diferenças entre os tratamentos e se mantiveram dentro dos padrões necessários para a criação da espécie (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2006). Os valores médios encontrados foram: temperatura ($25,4 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($4,7 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$), pH ($6,49 \pm 0,5$) e amônia total abaixo de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$.

- *Parâmetros hematológicos*

Os valores médios dos parâmetros hematológicos estão apresentados na tabela 4. A inclusão de probióticos e/ou prebióticos nas dietas não causou diferença ($P>0,05$) em relação à dieta controle tanto dos parâmetros da série vermelha quanto da branca.

Tabela 4. Valores médios e desvios padrões do eritrograma, leucograma e trombograma de tilápias do Nilo, *O. niloticus*, alimentadas com rações contendo probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbióticos (Actigen e DBA, quitosana e DBA) durante 63 dias.

	Controle	Probiótico DBA	Actigen	Quitosana	DBA+Actigen	DBA+Quitosana
Er (10^6 mm^{-3})	2,00±0,34	2,06±0,22	2,01±0,28	2,13±0,13	1,82±0,27	2,37±0,57
Hematócrito (%)	31,59±1,88	33,90±3,40	28,84±4,54	32,87±2,06	32,37±1,93	33±3,31
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	9,55±1,83	9,46±0,96	8,45±0,01	11,88±2,03	8,25±0,85	11,17±2,46
VCM (fL)	164,03±28,95	168,11±32,41	170,45±16,39	154,35±9,52	181,94±23,19	148,36±28,82
HCM (pg)	49,29±11,46	46,63±4,45	42,68±4,46	55,74±10,44	45,91±4,78	49,56±11,21
CHCM (g dL ⁻¹)	30,56±6,44	27,52±4,45	25,96±2,18	35,56±5,92	25,41±1,63	34,09±7,03
Leucócitos (mm ⁻³)	25064±7305	19004±7417	28828±10743	27834±6304	42078±18385	31890±9952
Linfócitos (mm ⁻³)	22369±7442	16919±6704	27751±10471	25888±5994	39511±18040	29247±7926
Neutrófilos (mm ⁻³)	1837±1007	1245±767	811±398	1316±485	1906±580	1869±1274
Monócitos (mm ⁻³)	858±321	838±490	424±216	881±315	754±378	1083±850
Trombócitos (mm ⁻³)	20367±11596	12861±8145	9734±4659	16448±7610	13115±2783	10525±7446

- *Parâmetros imunológicos*

Os valores médios encontrados nos parâmetros imunológicos estão apresentados na tabela 5. As análises de lisozima, proteínas totais, albumina, capacidade fagocítica e índice fagocítico, não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) nas dietas com inclusão de probiótico e/ou prebióticos em relação à dieta controle.

Tabela 5. Valores médios e desvios padrões de lisozima, proteínas totais, albumina, capacidade fagocítica, índice fagocítico e nível de proteção relativa (NPR) de tilápias-do-nylo alimentadas com rações contendo probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbióticos (DBA+Actigen, DBA+quitosana) durante 63 dias.

	Controle	Probiótico DBA	Actigen	Quitosana	DBA+Actigen	DBA+Quitosana
Lisozima (UNIDADE!!)	8,50±0,90	8,40±3,60	9,20±2,50	8,05±3,40	6,64±1,70	8,40±3,40
Proteínas totais (g dL ⁻¹)	3,19±0,20	3,24±0,40	3,27±0,30	3,41±0,90	3,20±0,30	3,22±0,20
Albumina (g dL ⁻¹)	1,0±0,20	1,08±0,20	0,96±0,20	1,0±0,10	0,95±0,10	0,98±0,10
Capacidade Fagocítica (%)	80,40±6,00	82,25±8,40	81,75±5,60	83,87±7,60	81,90±5,00	85,75±4,10
Índice Fagocítico (Leveduras/Macrófago)	2,14±0,10	2,34±0,20	2,29±0,10	2,41±0,1	2,22±0,20	2,22±0,10
Nível de Proteção Relativa (NPR %)	0,00	20,00	33,33	13,33	40,00	6,67

- *Desafio bacteriano com Aeromonas hydrophila*

A porcentagem acumulada de mortalidade está apresentada na figura 1. O grupo Controle (C), que não teve suplementação de probiótico e/ou prebiótico, foi o tratamento com maior porcentagem de mortalidade (50%), seguido de DBA+Quitosana e Quitosana com 43,4%, DBA com 40%, Actigen com 33,3% e DBA+Actigen com a menor porcentagem de mortalidade acumulada, com 30%.

O nível de proteção relativa (NPR) após o desafio bacteriano foi superior no tratamento Actigen e DBA com 40%, seguido dos tratamentos Actigen (33,33%), Probiótico BDA (20,0%), Quitosana (13,33%) e Quitosana e DBA (6,67%) (Tabela 4). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos, somente em relação ao controle.

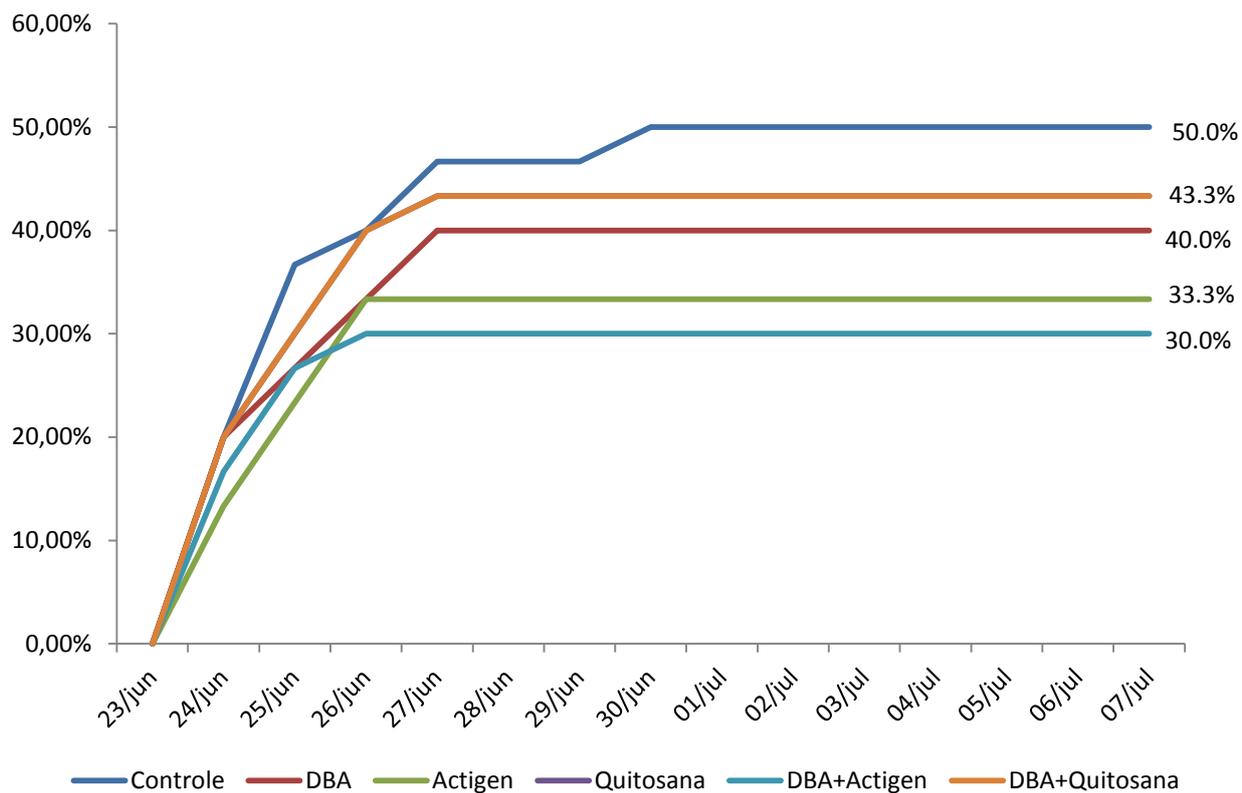


Figura 1. Porcentagem acumulada de mortalidade de tilápias-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Aeromonas hydrophila*, após 21 dias de alimentação com rações contendo probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbiótico (DBA+Actigen, DBA+Quitosana).

DISCUSSÃO

Em peixes, como em outros vertebrados, a presença, quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico refletem um estado fisiológico específico do organismo num dado momento, durante certo período da vida (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos e imunológicos, quando incluídos o probiótico e os prebióticos nas dietas. Estudos de SIWICKI *et al.* (1994) também não apresentaram diferenças significativas no hematócrito e número de leucócito de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas contendo 0,2% de um produto comercial imunoestimulante contendo β -glucanas durante uma semana em relação a uma dieta controle.

MERRIFIELD *et al.* (2010) também não encontraram diferenças nestes parâmetros ao avaliar a suplementação da alimentação de truta arco-íris com *Enterococcus faecium*. Por outro lado, ALY *et al.* (2008), observaram aumento do hematócrito em tilápia suplementada com *L. acidophilus*. MOURIÑO *et al.* (2011) verificaram aumento do número de eritrócitos ao adicionar a dieta o probiótico *Weissella ciberia* associado ao prebiótico inulina em surubim híbrido.

A lisozima é uma proteína lítica de grande importância para o sistema de defesa inespecífico, por causar a lise nas paredes celulares de bactérias gram-positivas (LIE *et al.*, 1989; ELLIS, 1990; PAULSEN *et al.*, 2003). A suplementação das dietas com probiótico e/ou prebióticos não afetou ($P < 0,05$) a atividade da lisozima sérica de tilápias do Nilo. O fato de não ter apresentado diferença significativa pode estar associado com o tempo de administração, como HARIKRISHNAN *et al.*, (2011) observou com juvenis de *Paralichthys olivaceus* alimentados com mistura de probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *B. subtilis* e *S. cerevisiae*) e extratos vegetais. Durante as duas primeiras semanas, o autor não encontrou diferença entre os tratamentos; porém, a partir da semana quatro até a semana 12, foi observado aumento significativo da atividade da lisozima nos peixes alimentados com rações contendo os imunoestimulantes em relação ao grupo controle.

Recentemente, LIN *et al.* (2012) estudaram os efeitos da administração oral de oligossacarídeos de quitosana e *Bacillus coagulans*, simples e

combinados, na alimentação de *Cyprinus carpio*, e relataram que a atividade da lisozima foi afetada positivamente pelo oligossacarídeo de quitosana e *B. coagulans*, além de significativa interação entre o *B. coagulans* e oligossacarídeo de quitosana.

A avaliação da proteína plasmática está associado à higidez, metabolismo proteico e à condição nutricional dos peixes. No presente estudo, o fornecimento de aditivos na dieta não alterou significativamente os valores de proteína ($P < 0,05$). O incremento dos níveis de proteína sérica e albumina é associado a fortes repostas inatas em peixes (ANDREWS *et al.*, 2011). Contrário ao estudo, alevinos de rohu (*Labeo rohita*) alimentados por 60 dias com dietas suplementadas com *B. subtilis* apresentaram aumento dos níveis de proteínas totais (NAYAK, 2007). Por outro lado, tilápias-do-nilo alimentadas com dieta basal e recebendo o probiótico *Enterococcus faecium* na água dos aquários por 40 dias, não apresentaram diferenças estatísticas nos parâmetros de proteínas totais e albumina (WANG *et al.*, 2008).

As células fagocíticas desempenham importante papel na regulação do sistema imune inato, pois são capazes de reconhecer patógenos e materiais estranhos e degradá-los pelo processo de fagocitose (SECOMBES, 1990; STEINHAGEN e JENDRYSEK, 1994). Não foram observadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$) na capacidade fagocítica dos animais nos tratamentos em relação à dieta controle.

Corroborando com o resultado do presente estudo, VILLAMIL *et al.* (2002) não observaram diferença na capacidade e índice fagocítico na utilização de *L. lactis* como probiótico na alimentação de *Scophthalmus maximus*. PIRARAT *et al.* (2006), observaram aumento significativo da atividade fagocitária em tilápias do Nilo, alimentadas durante duas semanas com ração suplementada com *L. rhamnosus*. Ao analisar a capacidade e índice fagocítico de Rã-touro *Lithobates catesbeianus* alimentadas com diferentes níveis de probióticos (1- *L. acidophilus*, *B. bifidum* e *E. faecium* e 2- *Bacillus subtilis*), DIAS *et al.* (2009) notaram efeito positivo na fagocitose nos animais que receberam ração suplementada.

De acordo com JOBLING (1994), os sistemas fisiológicos dos peixes podem ser desafiados ou estressados por vários fatores. A exposição ao agente estressor resulta em ajustes imediatos desencadeados nos diversos níveis da

organização metabólica, iniciando predominantemente com mudanças no comportamento (VAL *et al.*, 2005). O tratamento S1 (Actigen – MOS e DBA) mostrou o maior nível de proteção relativa (NPR) contra *Aeromonas hydrophila* entre os grupos testados. Esses resultados demonstram que a simbiose entre o mananoligossacarídeo e as bactérias probióticas *Enterococcus faecium*, *Bifidobacteria* e *Lactobacillus acidophilus* promoveu aumento de resistência da tilápia à infecção pelo patógeno. STAYKOV *et al.* (2007) também observaram aumento da sobrevivência de truta arco-íris com dieta suplementada com 0,2% de mananoligossacarídeo. Com o mesmo período de alimentação que no presente estudo, tilápias-do-nilo suplementadas com 0,6% de MOS, apresentaram maior sobrevivência ao serem desafiadas com *Streptococcus agalactiae*, com alimentação pré-desafio de 21 dias (SAMRONGPAN, *et al.*, 2008). Estudos de desafios com *Aeromonas hydrophila* injetado intraperitonealmente demonstram aumento da resistência a essa bactéria quando *Labeo rohita* e *Carassius auratus gibelio* foram alimentadas com dietas suplementadas com 1% e 0,048% de MOS, respectivamente (ANDREWS *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013).

Alguns mecanismos de ação dos probióticos para o aumento de resistência após a infecção foram descritos por BALCÁZAR *et al.* (2008), em estudos com truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os autores verificaram que os organismos probióticos mostraram grande habilidade de aderir ao muco intestinal, o que causou significativa redução da adesão dos patógenos, pela secreção de substâncias antimicrobianas e pela exclusão por competição de nutrientes.

CONCLUSÃO

As dietas contendo suplementação com prebiótico e probiótico, juntos ou separadamente, não apresentaram diferenças significativas nas análises hematológicas e imunológicas, apontando pouca efetividade desses imunoestimulantes na alimentação de tilápia-do-nilo. Porém, no desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila*, a ração contendo a simbiose entre o mananoligossacarídeo e as bactérias probióticas *Enterococcus faecium*, *Bifidobacteria* e *Lactobacillus acidophilus* promoveu maior resistência à infecção, sugerindo que a interação do probiótico com o prebiótico trouxe benefícios para o sistema imune do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALY, S.M.; AHMED Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.M. 2008 Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potencial probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish immunology*, 25:128-136.
- ANDERSON, D.P. 1992 Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, Oxford, v. 2, p. 281-307.
- ANDREWS, S.R.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; KUMER, S. 2009 Haematological modulation growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chorella. *Aquaculture research*, 41:61e9.
- ANDREWS, S.R.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; MUKHERJEE, S.C.; KUMAR, S. 2011 Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haematoimmunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. *Research in Veterinary Science*, Amsterdam, v. 91, p. 103-109.
- BALCÁZAR, J.L.; VENDRELL, D.; BLAS, I. de; RUIZZARZUELA, I.; MUZQUIZ, J.L.; GIRONES, O. 2008 Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, v.278, p.188-191.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. 2005 The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 19, p. 457-472.
- BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J. 2001 Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 853-873.
- COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. 1999 Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1052-1057.
- DIAS, D. C.; DE STÉFANI, M. V.; FERREIRA, C. M.; FRANÇA, F. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SANTOS, A. A. 2009 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquac. Res.* 40, 1–8.
- 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. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 40-45.
- DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; MOATE, R.; DAVIES, S.J. 2009 Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal Science*, Savoy, v. 87, p. 3226-3234.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. 1992 Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 2, p. 287–297.
- GENG, X., DONG, X.; TAN, B. YANG, Q.; CHI, S.; LIU, H.; LIU, X. 2011 Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 31, p. 400-406.
- GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J.; GATLIN III, D.M. 2008 The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide

or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, Oxford, v. 283, p. 163–167.

HARIKRISHNAN, R.; KIM, M.; KIM, J.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. 2011 Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 31, p. 310-317.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. 2002 Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, Amsterdam, v. 35, p. 109–116.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. 1998 Hematology of fish, p. 1120-1125. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Ed.). *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Blackburg:Wiley-Blackwell.

JOBLING, M. 1994 *Fish bioenergetics*. London: Chapman & Hall, 307p.

JORGENSEN, J.B.; SHARP, G.J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERTSEN, B. 1993 Effect of a yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 3, p. 267–277.

KIM D.-H.; AUSTIN B. 2006 Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunology*, 21: 513–524.

LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A., FROYSADAL, E. 1989 Study of lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 1-5.

LIN, S.; MAO, S.; GUAN, Y.; LUO, L.; LUO, L.; PAN, Y. 2012 Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, Oxford, v. 342/343, p. 36–41.

LIU, B.; XU, L.; GE, X.; XIE, J.; XU, P.; ZHOU, Q.; PAN, L.; ZHANG, Y.Y. 2013 Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 34:1395e403.

MAGNADÓTTIR, B. 2006 Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 20, p. 137-151.

MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R.E.P.; YANO, T. 1992 Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, Oxford, v. 101, p. 197-203.

MERRIFIELD, D.L.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M.; DAVIES, S.J. 2010 Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, 16: 496-503.

MOURIÑO, J.L.P.; NASCIMENTO VIEIRA, F.; JATOBÁ, A.B.; SILVA, B.C.; JESUS, G.F.A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. 2011 Effect of dietary supplementation of inulin and *W.cibaria* on haemato-immunological parameters on hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquaculture Nutrition*, 17:1-8.

NAYAK, A.K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S.C. 2007 Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 23, p. 892-896.

NAYAK, S.K. 2010 Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunology*, 29, 2-14.

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

PASTORET, P.P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. 1998 Immunology of fishes. In: *Handbook of vertebrate immunology*, San Diego: Academic Press, 3-62.

PAULSEN, S. M., LUNDE, H., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. 2003 *In vivo* effects of glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 39-54.

PICCHIETTI, S.; MAZZINI, M.; TADDEI, A.R.; RENNA, R.; FAUSTO, A.M.; MULERO, V. 2007 Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish & Shellfish Immunology*, Oxford, v. 22, p. 57-67.

PIRARAT N., KOBAYASHI T., KATAGIRI T., MAITA M., ENDO M. 2006 Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol*;113:339e47.

RANZANI-PAIVA, M.J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. 2013 *Métodos para análise hematológica em peixes*. 1º Ed. Maringá: Eduem. 135p.

ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 20, p. 329-334.

SCHWARZ, K.K.; FURUYA, W.M.; NATALI, M.R.M.; GAUDEZI, M.C.; LIMA, P.A.G. 2011 Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40 (12): 2634-2640.

SECOMBES, C.J. 1990 Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish immunology*. Fair Haven: SOS Publications, p.137-154.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BACCARIN, A. E.; BRAGA, F. M. de S. 2006 Limnological parameters and plankton community responses in Nile tilapia ponds under chicken dung and NPK (4-14-8) fertilizers. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18. (3): 335-346.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. 1994 Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 41, p. 125- 139.

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. 2007 Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, Dordrecht, v. 15, p. 153–161.

STEINHAGEN D.; JENDRYSEK, S. 1994 Phagocytosis by carp granulocytes; in vivo and in vitro observations. *Fish Shellfish Immunol* 4.521-524.

VAL, A.L.; OLIVEIRA, A.M.; FIORINI, M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2005 Nutrição e estresse em peixes da Amazônia. In: Simpósio de nutrição e saúde de peixes, Botucatu. *Anais...* Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ, Universidade Estadual Paulista, p.84-92.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000 Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 64, p. 655-671.

VILLAMIL, L., TAFALLA, C., FIGUERAS, A., NOVOA, B. 2002 Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus Maximus*). *Journal of Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*, 9, 6, 1318- 1323.

WANG, Y.; TIAN, Z.; YAO, J.; LI, W. 2008 Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, Oxford, v. 277, p. 203-207.

WINTROBE, M.M. 1934 Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Leipzig, v.51, p.32-49.

CAPITULO 2

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E MICROBIOTA INTESTINAL DE TILÁPIA- DO-NILO ALIMENTADA COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM PROBIÓTICO, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

(Segundo normas da revista *Fish and Shellfish Immunology*)

Desempenho zootécnico e avaliação da microbiota intestinal de tilápia-do-nylo alimentada com ração suplementada com probiótico, prebióticos e simbióticos

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho zootécnico e a microbiota intestinal de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com ração suplementada com probiótico, prebióticos e simbióticos. Para esse experimento foram utilizadas 240 tilápias revertidas ($8,84 \pm 1,29$ g), distribuídas em 24 aquários de 40L, alimentadas durante 63 dias com seis tratamentos com 4 repetições: Controle, Probiótico DBA ($3,5 \times 10^9$ UFC g^{-1} *Bifidobacteria*, $3,5 \times 10^9$ UFC g^{-1} *Lactobacillus acidophilus* e $3,5 \times 10^9$ UFC g^{-1} *Enterococcus faecium*), prebióticos Actigen e Quitosana, e os simbióticos DBA+Actigen e DBA+Quitosana. O delineamento foi inteiramente casualizado. Após 63 dias de experimento, foi realizada a avaliação da microbiota nos intestinos de 8 peixes/tratamento. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA e, quando $p < 0,05$, foi realizado o teste de Dunnett. No desempenho zootécnico, não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados, quando em comparação com o tratamento controle. Diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos, na biomassa final os tratamentos Quitosana e o simbiótico DBA+Quitosana apresentaram maiores valores quando comparados com DBA+Actigen. Maior ganho de peso individual foi observado no grupo DBA+Quitosana em relação ao grupo DBA+Actigen. A avaliação da microbiota intestinal não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) nos índices de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp no intestino dos animais que foram suplementados com os prebióticos Actigen e Quitosana e o probiótico DBA.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, nutrição, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, mananoligossacarídeo, quitosana.

INTRODUÇÃO

A população mundial tem crescido de tal forma que para o ano de 2050 estima-se que o número de pessoas no mundo chegará a 9,6 bilhões (NAÇÕES UNIDAS, 2013), com crescimento principalmente em países em desenvolvimento. Consequente ao crescimento, a demanda e produção de pescados deve aumentar também. Em 2012 foram produzidas cerca de 160 milhões de toneladas de pescado e estima-se que até 2030 esse número aumente 63%, chegando a mais de 250 milhões de toneladas (FAO, 2014).

No Brasil, a espécie mais criada é a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), que apresenta excelente potencial zootécnico e reprodutivo, características que lhe conferem o segundo lugar dos peixes criados em águas continentais no mundo, depois da carpa (YASSUI *et al.*, 2007). Esta espécie apresentou ótima adaptação às condições climáticas brasileiras, mostrando rápida taxa de crescimento, adaptabilidade aos diferentes sistemas de criação e boa aceitação pelo mercado consumidor (BOSCOLO *et al.*, 2001; MEURER *et al.*, 2000).

Devido ao aumento da demanda de produção aquícola, o desenvolvimento de estratégias de profilaxia vem ganhando mais atenção e sendo estudadas em diversas pesquisas. Uma das estratégias mais estudadas é a adição de aditivos à dieta que aumentem a resistência dos animais a processos infecciosos, com destaque para os imunostimulantes, como prebióticos, probióticos e simbióticos, capazes de modular o sistema imune do animal, além de contribuir para a melhora do ambiente aquático e trazer melhorias aos índices zootécnicos e, conseqüentemente, melhorando os índices econômicos.

Os probióticos são microrganismos vivos que trazem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrado como aditivo dietético ou na água (Al *et al.*, 2011). Os prebióticos têm sido definidos como um ingrediente não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número ilimitado de bactérias benéficas no trato intestinal com melhora da saúde do hospedeiro (GIBSON and ROBERFROID, 1995). Já, os simbióticos são produtos que contêm ambos os

prebióticos e probióticos. GIBSON e ROBERFROID (1995) afirmaram que a utilização dos simbióticos pode gerar benefícios no crescimento dos peixes, principalmente devido ao efeito sinérgico. A lógica por trás dessa utilização combinada é que, por causa da fermentação dos carboidratos prebióticos, há melhora na sobrevivência da cepa probiótica. Esta última utiliza o prebiótico como substrato prontamente disponível, incentivando o crescimento e multiplicação dessas bactérias.

Os imunoestimulantes normalmente são utilizados com o intuito de modular o sistema imune e, uma das conseqüências, é a modulação da microbiota intestinal e reforço da morfologia intestinal, resultando em melhorias na nutrição do hospedeiro. A modulação da microbiota intestinal pode aumentar a atividade enzimática (WACHE *et al.*, 2006) e a produção de vitaminas que reforçam a nutrição e a saúde dos animais. Diversos estudos demonstraram que a aplicação de probióticos e prebióticos pode melhorar a conversão alimentar, taxa de crescimento e ganho de peso dos peixes (BOGUT *et al.*, 1998, 2000; LARA-FLORES *et al.*, 2003; TAOKA *et al.*, 2006.; STRAUKOV *et al.*, 2007; SAMRONGPAN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; BAGHERI *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-ESTRADA *et al.*, 2009).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico e a microbiota intestinal de tilápia-do-nilo, alimentadas com dietas suplementadas com probiótico e prebióticos, testados juntos e separadamente.

MATERIAL E MÉTODOS

- *Desenho experimental*

O experimento foi conduzido na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga/SP.

O experimento foi realizado num período de 63 dias, com 240 tilápias ($8,84 \pm 1,29$ g e $7,91 \pm 0,36$ cm) revertidas para machos e distribuídas em 24 aquários com volume útil de 40 litros, na densidade de 10 peixes/aquário. Foram realizadas trocas de água duas vezes ao dia, retirando-se 50% do

volume do aquário, a fim de retirar fezes e eventuais sobras de ração. O uso de aeração foi contínuo e individual para evitar contaminação entre os tratamentos que não utilizavam bactérias probióticas. Foram instalados termostatos em todos os aquários. Diariamente foram analisados os parâmetros da água, tais como oxigênio dissolvido, pH, temperatura e amônia total.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições (Tabela 1).

Tabela 1. Princípio ativo e tratamentos que foram utilizados no experimento com probiótico e prebióticos para tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*.

Tratamento	Princípio Ativo	Doses
Controle (C)	-----	-----
DBA [®]	DBA [®] (<i>Lactobacillus acidophilus</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹ , <i>Enterococcus faecium</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹ e <i>Bifidobacteria</i> - 3,5x10 ⁹ UFC g ⁻¹)	0,3g kg ⁻¹
Actigen	140g Mananas kg ⁻¹	4,0g kg ⁻¹
Quitosana	100% Quitosana	4,0g kg ⁻¹
DBA [®] +Actigen		0,3g+4,0gkg ⁻¹
DBA [®] +Quitosana		0,3+4,0g kg ⁻¹

- *Preparo das rações*

Foram preparadas seis rações experimentais extrusadas (Tabelas 2 e 3). A inclusão do prebiótico se deu antes do processo de extrusão, enquanto que a inclusão do probiótico foi realizada após o processo de extrusão, a fim de garantir a sobrevivência e eficácia das bactérias probióticas.

O probiótico foi pesado em balança analítica e homogeneizado em óleo de soja (2,0% do peso da ração) e aspergidos sobre a ração. A dieta controle recebeu a mesma quantidade de óleo de soja. As rações foram mantidas a 4°C e fornecidas três vezes ao dia até a saciedade.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais de tilápia-do-nylo, *O. niloticus*, suplementadas com probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbiótico (DBA+Actigen, DBA+Quitosana) alimentadas durante 63 dias.

Rações	Controle	Prebiótico	Probiótico	Simbiótico
Ingredientes	%	%	%	%
Farinha de penas	4,00	4,00	4,00	4,00
Milho moído	22,74	22,34	22,71	22,31
Farinha de vísceras	15,00	15,00	15,00	15,00
Farelo de soja	18,05	18,05	18,05	18,05
Protenose	3,50	3,50	3,50	3,50
Farelo de trigo	8,56	8,56	8,56	8,56
Quirera de arroz	7,00	7,00	7,00	7,00
Farinha de carne	10,00	10,00	10,00	10,00
Farinha de peixe	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de sangue	4,00	4,00	4,00	4,00
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
Fosfato bicálcico	0,32	0,32	0,32	0,32
Óleo de peixe	2,00	2,00	2,00	2,00
Clor. de colina	0,10	0,10	0,10	0,10
L-Lisina	0,22	0,22	0,22	0,22
L-Treonina	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-Metionina	0,26	0,26	0,26	0,26
Antioxidante	0,05	0,05	0,05	0,05
Antifúngico	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
DBA ^{®2}	0,00	0,00	0,03	0,03
Prebiótico ³	0,00	0,40	0,00	0,40

¹Premix: vitA 12000 UI; vitD₃ 3000 UI; vitE 150 mg; vitK₃ 15 mg; vitB₁ 20 mg; vitB₂ 20 mg; vitB₆ 17,50 mg; B₁₂ 40 mg; Vitamina C 300 mg; ac. Nicotínico 100 mg;ác. Pantotênico 50 mg; biotina 1 mg; ác. fólico 6 mg; antioxidante 25 mg; Cu 17,50; Fe 100 mg; Mn 50 mg; Zn 120 mg; I 0,80 mg; Se 0,50 mg; Co 0,40 mg; Inositol 125 mg; Colina 500 mg.

²DBA[®]: *Lactobacillus acidophilus* - 3,5x10⁹UFC g⁻¹, *Enterococcus faecium* - 3,5x10⁹UFC g⁻¹ e *Bifidobacteria* - 3,5x10⁹UFC g⁻¹.

³Prebiótico: Actigen (Alltech) e Quitosana.

Tabela 3. Composição bromatológica das dietas experimentais de tilápia-do-nilo suplementadas com: probiótico DBA (PRO: *A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbióticos (DBA+Actigen e DBA+Quitosana) durante 63 dias.

	Controle	Probiótico DBA	Actigen	Quitosana	DBA+Actigen	DBA+Quitosana
Matéria seca (%)	95,45	95,54	94,76	94,99	94,31	94,83
Proteína bruta (%)	38,87	38,96	39,37	38,89	39,12	39,22
Fibra bruta (%)	6,00	5,07	5,85	6,60	4,89	5,42
Extrato etéreo (%)	3,83	4,54	4,16	4,37	4,16	4,34
Cinzas (%)	10,43	10,36	10,29	10,35	10,39	10,37

- *Desempenho zootécnico*

A cada 21 dias durante os 63 dias de experimento foram feitas biometrias, quando se pesava a biomassa total e dois peixes de cada aquário eram capturados aleatoriamente para medição do comprimento total e peso total. Para isso os peixes foram anestesiados em solução de óleo de cravo (0,3 mL L⁻¹), pesados em balança de precisão e medidos em ictiômetro. Os parâmetros avaliados foram:

- ✓ Ganho de peso (GP):

$$GP = [(peso\ final) - (peso\ inicial)];$$
- ✓ Conversão alimentar aparente (CA):

$$ICA = [(consumo\ de\ ração) \div (ganho\ de\ peso)];$$
- ✓ Sobrevivência (S%):

$$S = [(100 \times número\ de\ animais\ final) \div número\ de\ animais\ inicial];$$
- ✓ Taxa de crescimento específico:

$$TCE = \{100 \times [(\ln\ peso\ final - \ln\ peso\ inicial) \div período]\}$$
- ✓ Biomassa;

- *Avaliação bromatológica*

Oito animais de cada tratamento foram enviados ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) para realização das análises de composição corporal. As amostras foram congeladas, secas, moídas e homogeneizadas para determinação de matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo e proteína bruta. A ração também foi enviada para análise de matéria seca, matéria mineral, proteína bruta, fibra bruta e extrato etéreo.

- *Avaliação da microbiota intestinal*

Ao final do experimento, seis peixes de cada tratamento foram sedados, mortos e realizada coleta da porção anterior do intestino para avaliar a presença das bactérias *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp.. Uma porção de 1 a 2 g do intestino anterior foi separada, fragmentada e acondicionada em tubos de ensaio estéreis e pesadas em balança analítica. Após maceração foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em solução fisiológica 0,7%, seguidas de homogeneização em vortex (ISHIKAWA, 1998). Cem microlitros de cada solução foi semeada em 4 meios de cultura: TSA (Agar Tripticaseína de Soja), *Bifidobacterium* Agar, Modified *Lactobacillus* Agar e HiCrome *Enterococcus faecium* Agar Base; e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

- *Análises estatísticas*

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa Statistica 7, por análise de variância (ANOVA), e quando $p < 0,05$, realizado o teste de Dunnett.

RESULTADOS

- *Desempenho zootécnico*

Os parâmetros físicos e químicos da água não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Os valores médios encontrados foram: temperatura ($25,4 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($4,7 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$), pH ($6,49 \pm 0,5$) e amônia total abaixo de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$. Esses resultados estão de acordo com os preconizados para a espécie (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2006).

Os valores médios dos parâmetros de desempenho e sobrevivência estão apresentados na Tabela 4. A inclusão de probióticos e/ou prebióticos nas dietas não causou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à dieta controle. Entre as dietas suplementadas, houve diferença significativa entre os valores dos peixes do tratamento DBA+Quitosana ($42,87 \pm 4,5 \text{ g}$) e DBA+Actigen ($23,39 \pm 5,4 \text{ g}$) no ganho de peso individual. Quanto à biomassa final foram encontradas diferenças significativas dos tratamentos DBA+Quitosana ($473,71 \pm 81,6 \text{ g}$) e Quitosana ($458,38 \pm 74,9 \text{ g}$) quando comparado ao DBA+Actigen ($254,31 \pm 37,0 \text{ g}$) ($P < 0,05$).

Tabela 4: Valores médios e desvios padrões dos parâmetros de desempenho zootécnico de tilápia-do-nylo, *O. niloticus*, alimentada com probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbióticos (DBA+Actigen, DBA+Quitosana) durante 63 dias.

	Controle	Probiótico DBA	Actigen	Quitosana	DBA+Actigen	DBA+Quitosana
Peso final (g)	47,07±5,79	40,90±7,38	41,38±3,52	47,21±8,87	33,10±5,95	53,89±5,30
Ganho em peso (g)	36,98±5,59 ^{ab}	32,77±7,07 ^{ab}	30,50±3,32 ^{ab}	39,46±9,40 ^{ab}	23,39±5,47 ^a	42,87±4,55 ^b
Biomassa (g)	388,83±62,60 ^{abc}	361,09±41,84 ^{abc}	360,96±20,27 ^{abc}	458,38±74,97 ^{bc}	254,31±37,09 ^a	473,71±81,60 ^b
Conversão Alimentar	1,12±0,08	1,11±0,14	1,16±0,03	1,03±0,09	1,30±0,14	1,07±0,11
Taxa de crescimento específico (% dia ⁻¹)	2,63±0,19	2,39±0,30	2,44±0,13	2,62±0,31	2,09±0,28	2,85±0,14
Sobrevivência (%)	82,50	90,00	87,50	97,50	77,50	87,50

Letras distintas indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo teste de Dunnett.

- *Avaliação bromatológica*

Não foram encontradas diferenças significativas na composição corporal dos peixes alimentados com dietas suplementadas com probiótico e prebióticos separados e em conjunto (Tabela 5).

Tabela 5. Composição do corpo inteiro de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentada com probiótico DBA (*A. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos (Actigen e quitosana) e Simbióticos (DBA+Actigen e DBA+quitosana) durante 63 dias. Valores expressos na matéria seca.

	Controle	Probiótico DBA	Actigen	Quitosana	DBA+Actigen	DBA+Quitosana
Matéria seca (%)	95,26±0,75	95,58±0,41	95,60±0,68	95,33±0,78	95,51±0,46	95,37±0,42
Proteína	59,25±1,11	59,31±1,53	58,91±1,03	58,14±2,56	60,62±1,73	58,28±1,35
Cinzas	15,46±0,83	16,37±1,90	14,93±0,93	15,84±0,74	15,83±0,32	15,40±0,53
Extrato etéreo	19,68±1,29	22,20±3,08	19,92±1,16	20,49±2,22	18,85±2,02	19,95±1,96

- *Avaliação da microbiota intestinal*

As figuras 1, 2 e 3 mostram a contagem de colônias de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp. oriundas do conteúdo intestinal de tilápia-do-nilo. Os peixes que receberam as dietas com aditivo probiótico e/ou prebiótico apresentaram colonização pelas bactérias presentes no probiótico utilizado, porém não houve diferença estatística quando comparados ao tratamento controle.

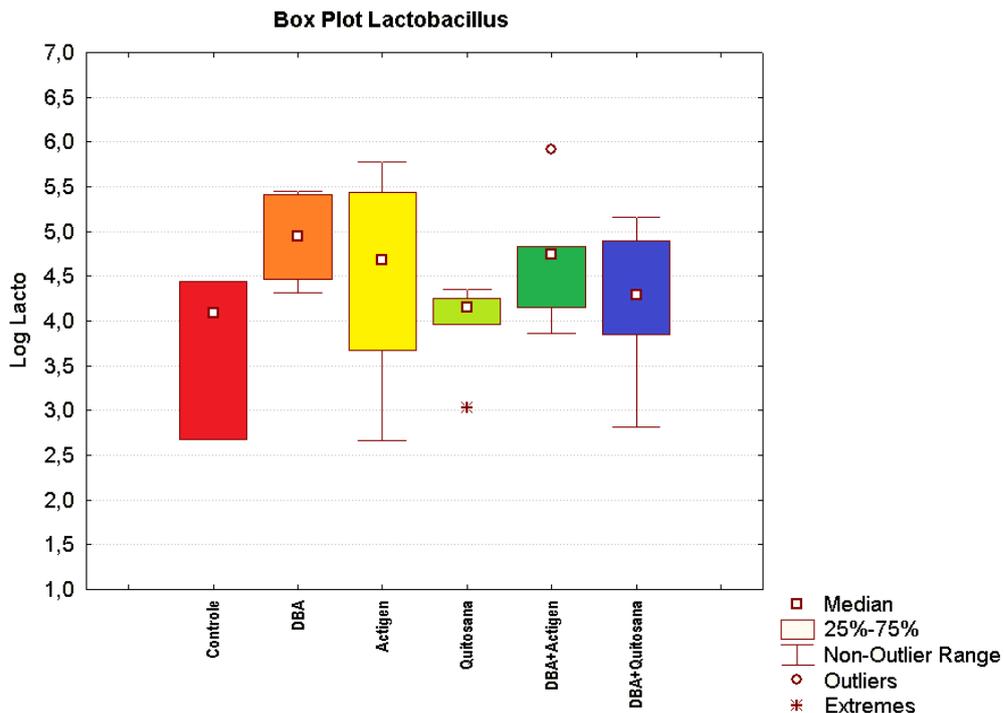


Figura 1. Avaliação da colonização intestinal de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) pelo gênero *Lactobacillus* spp., após 63 dias alimentadas com rações suplementadas pelo Probiótico DBA (*L. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos Actigen e Quitosana, e pelos simbióticos DBA+Actigen e DBA+Quitosana.

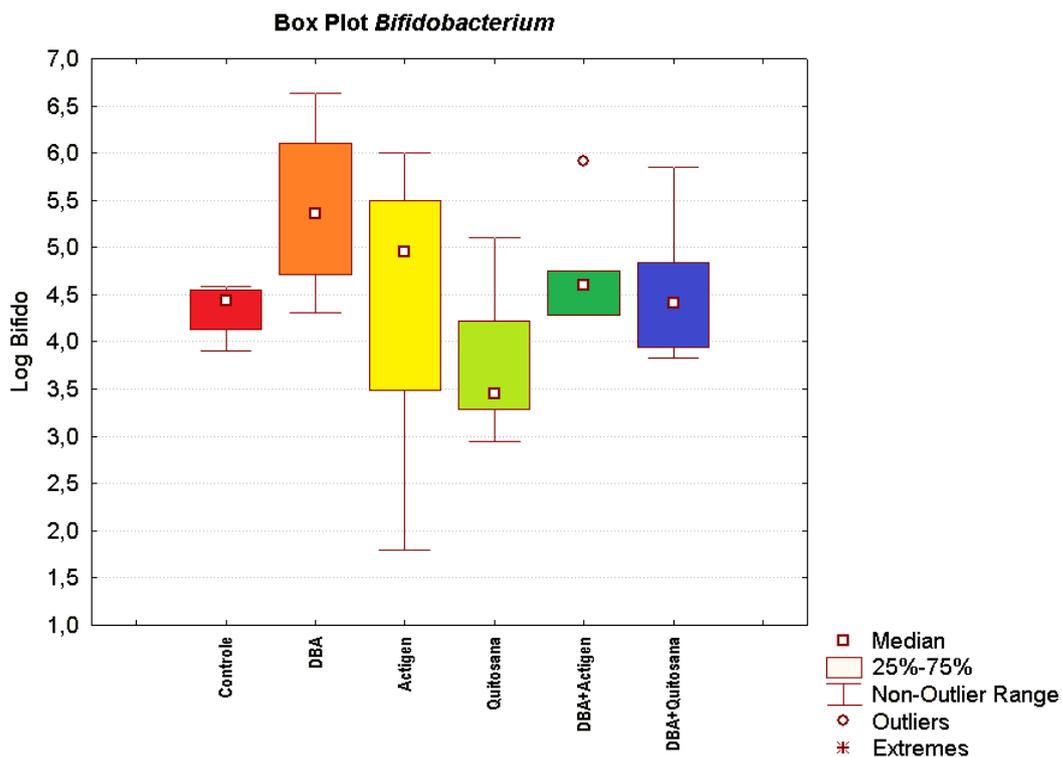


Figura 2. Avaliação da colonização intestinal de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) pelo gênero *Bifidobacterium* spp., após 63 dias alimentadas com rações suplementadas pelo Probiótico DBA (*L. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos Actigen e Quitosana, e pelos simbióticos DBA+Actigen e DBA+Quitosana.

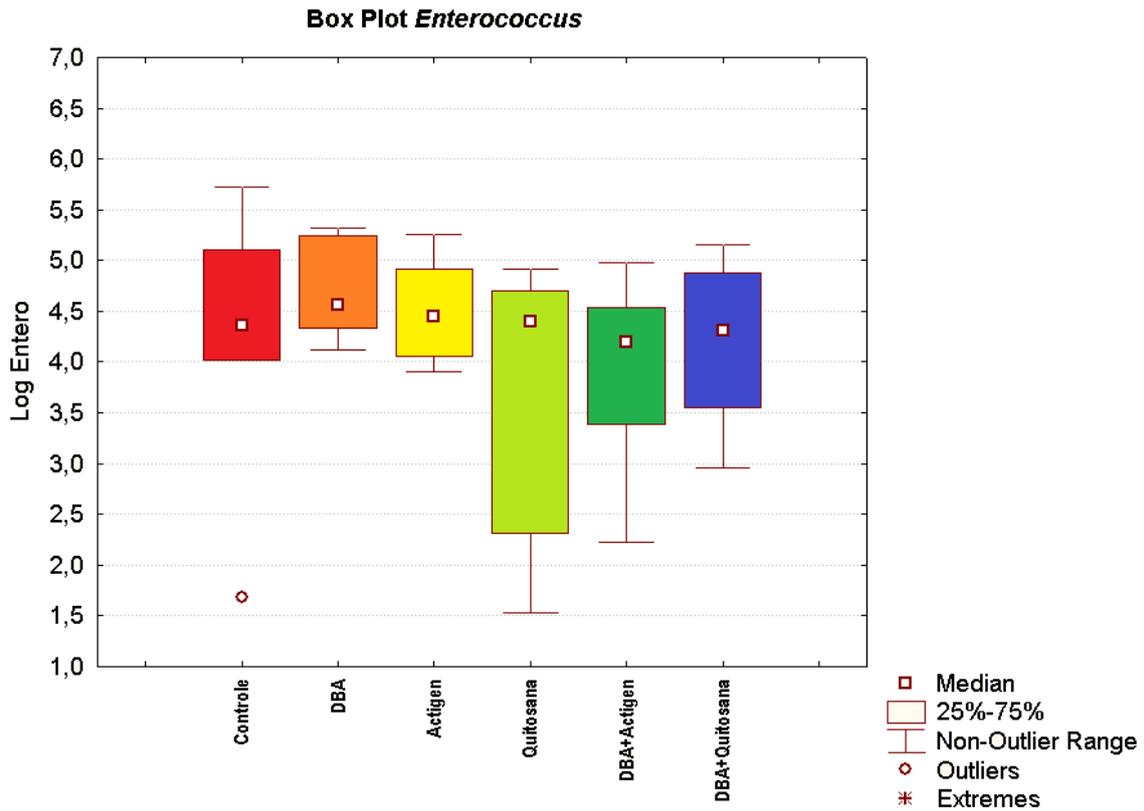


Figura 3. Avaliação da colonização intestinal de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) pelo gênero *Enterococcus* spp., após 63 dias alimentadas com rações suplementadas pelo Probiótico DBA (*L. acidophilus*, *E. faecium* e *Bifidobacteria*), prebióticos Actigen e Quitosana, e pelos simbióticos DBA+Actigen e DBA+Quitosana.

DISCUSSÃO

Os índices de desempenho zootécnico avaliados no presente estudo não apresentaram diferenças significativas quando se comparam os resultados dos peixes que receberam suplementação em relação ao grupo controle. Porém, foram encontradas diferenças significativas no ganho de peso individual entre os peixes dos tratamentos S1 e S2, sendo o segundo tratamento com maior ganho. Diferenças significativas foram encontradas também na biomassa final dos tratamentos S2 ($473,71 \pm 81,6$ g) e PRE2 ($458,38 \pm 74,9$ g) quando comparado ao S1 ($254,31 \pm 37,0$ g). Em ambos os casos, os tratamentos com inclusão de quitosana apresentaram melhores resultados, indicando que há maior interação desse prebiótico com o hospedeiro e como substrato das bactérias benéficas no trato gastrintestinal. Contudo, ao decorrer do experimento, houve fatores externos que podem ter influenciado no tratamento S1, tais como territorialismo e conseqüente estresse dos animais. Foi observada a presença de um peixe dominante em três dos quatro aquários do tratamento, e esses peixes foram trocados, porém sem resultado positivo, uma vez que outro peixe tomava a posição de dominante.

Esse comportamento agonístico é característico entre peixes territorialistas como a tilápia-do-nylo, principalmente em animais jovens que permanecem em grupos durante as primeiras semanas de vida e, então, passam a manter territórios (HUNTINGFORD, 1986). Segundo VOLPATO *et al.* (1987), animais hierarquicamente submissos desta espécie apresentam aumento da atividade metabólica, comparativamente aos dominantes, e suas reservas energéticas, que poderiam ser utilizadas para promover o crescimento, são desviadas para atender às demandas metabólicas impostas nas confrontações. O confinamento de pequenos grupos de peixes de uma mesma espécie resulta no estabelecimento de hierarquia social que promove, principalmente nos indivíduos submissos, escurecimento do corpo, redução da taxa de crescimento, perda de linfócitos dos tecidos hematopoiéticos, elevação dos níveis de cortisol e maior índice de mortalidade (YAMAGISHI, 1962; LI and BROCKSEN, 1977; NOAKES and LEATHERLAND, 1977; PETERS and SCHWARZER, 1985; LAIDLEY and LEATHERLAND, 1988).

A utilização da quitosana junto com probióticos pode gerar resultados variados. Assim como o presente estudo, LIN *et al.* (2012) observaram aumento do peso final de carpa comum ao suplementar com o probiótico *Bacillus coagulans* e com o oligossacarídeo de quitosana como prebiótico durante um período de 8 semanas. O maior valor foi encontrado na simbiose desses dois aditivos (70,9g), seguido pelo probiótico (63,8g) e pelo oligossacarídeo de quitosana (62,5g). Entretanto, SHIAU e YU (1999) apresentaram queda do ganho de peso ao adicionar níveis maiores de quitina e quitosana na dieta de tilápia-do-nilo, com o mesmo período de alimentação.

A avaliação da composição corporal não apresentou diferenças significativas. Os dados obtidos são semelhantes aos apresentados no estudo de SOUSA *et al.* (2012), com alevinos de tilápia-do-nilo, com valores de proteína bruta (PB) de 59,50%, extrato etéreo (EE) de 20,42% e matéria mineral (MM) de 15,46%. Trabalhando com o mesmo peixe, NOGUEIRA (2009) obteve valores de proteína bruta (PB) de 56,4%, extrato etéreo (EE) de 28,0% e matéria mineral (MM) de 11,9%.

A avaliação da microbiota demonstrou que houve colonização no trato intestinal com a inclusão do probiótico DBA e dos prebióticos Actigen e Quitosana, apesar de não apresentar diferença estatística em relação ao controle. Gêneros como *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. são bactérias que habitam a microbiota intestinal dos peixes, e a utilização desses aditivos incentivou o crescimento e proliferação dessas bactérias benéficas.

O trato gastrointestinal dos peixes possui uma grande variedade de microrganismos que interagem em um ecossistema e a colonização microbiana, o estabelecimento, a composição e a diversidade é um processo complexo e reflete a composição microbiana da água, da dieta fornecida aos peixes e do ambiente (GELDREICH and CLARKE, 1966; BURAS *et al.*, 1987; KORSNES *et al.*, 2006; RING *et al.*, 2006a; RING *et al.*, 2006b; FJELLHEIM *et al.*, 2007; NAYAK, 2010). A mucosa do hospedeiro interage com essas comunidades microbianas, as quais regulam mecanismos vitais para a manutenção da defesa da mucosa contra ataques de patógenos (McCRACKEN and LORENZ, 2001; TORRECILLAS *et al.*, 2013). Em peixes de água doce, as colonizações do trato gastrointestinal é feita principalmente pelas bactérias

gram-negativas, como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, Enterobactérias e por bactérias gram positivas, como *Micrococcus*, *Clostridium* e diferentes espécies de bactérias ácido lácticas (SUGITA; *et al.*, 1985; RINGO and GATESOUBE, 1998; UHLAND; *et al.*, 2000)

Bactérias como as ácido láticas, bifidobactérias e enterobactérias existem normalmente no trato de tilápias e por essa razão é que apareceram nas placas dos peixes do grupo controle.

Diversos estudos já demonstraram a efetividade da suplementação de dietas na microbiota intestinal de diversas espécies. Juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas suplementadas com 0,2% de Bio Mos por 111 dias apresentaram redução significativa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e *Micrococcus* spp. e aumento da população de *Enterococcus* spp. (DIMITROGLOU *et al.*, 2009). Os mesmos autores, ao trabalharem com dourada (*Sparus aurata*) alimentada durante 14 dias com rações suplementadas com 0,4% de inclusão de MOS, observaram redução da carga bacteriana intestinal (DIMITROGLOU *et al.*, 2011). Outra pesquisa desses autores também com dourada alimentada por 9 semanas com rações suplementadas com MOS, demonstrou aumento da diversidade da microbiota intestinal, enquanto que nos peixes alimentados com inclusão de soja esses parâmetros permaneceram inalterados (DIMITROGLOU *et al.*, 2010). Esses dados denotam a importância da inclusão de aditivos dietéticos como o MOS, com resultados positivos para a microbiota intestinal.

CONCLUSÃO

A inclusão do probiótico e prebióticos não influenciou o desempenho zootécnico dos peixes. Entre os tratamentos com suplementação de imunostimulantes, a quitosana parece favorecer o ganho de peso individual e maiores índices de biomassa quando associada ao probiótico, apontando maior efetividade da quitosana como substrato para as bactérias benéficas. Em relação ao crescimento de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. no intestino de tilápia-do-nilo, a adição do probiótico DBA e dos prebióticos Actigen e Quitosana, separados e

em conjunto, não apresentaram nenhuma diferença em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, Q.; XU, H.; MAI, K.; XU, W.; WANG, J.; ZHANG, W. 2011 Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, Oxford, v. 317 p. 155–161.
- BAGHERI, T., HEDAYATI, S., YAVARI, V., ALIZADE, M. AND FARZANFAR, A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 8: 43-48.
- BOGUT, I.; MILAKOVIC, Z.; BRKIC, S.; NOVOSELIC, D. AND BUKVIC, Z. 2000 Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish, (*Silurtes glanis* L). *Vet. Med.* 45: 107-109.
- BOGUT, I.; MILAKOVIC, Z.; BRKIC, S. AND ZIMMER, R. 1998 Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech J. Anim. Sci.*, 43: 231-235.
- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; SOARES, C.M. 2001 Farinhas de peixe, carne e ossos, vísceras e crisálida como atractantes em dietas para alevinos de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n. 5, p. 1397-1402.
- BURAS, N.; DUEK, L.; NIV, S.; HEPHER, B.; SANDBANK E. 1987 Microbiological aspects of fish grown in treated wastewater. *Water Research*, New York, v. 21, n. 1, p. 1-10.
- DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; MOATE, R.; DAVIES, S.J.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; BRADLEY, G. 2009 Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Anim Sci*, 87:3226e34.
- DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, S.J. 2010 Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300:182e8.
- DIMITROGLOU, A.; REYNOLDS, P.; RAVNOY, B.; JOHNSEN, F.; SWEETMAN, J.; JOHANSEN, J.; DAVIES, S.J. 2011 The effect of mannan oligosaccharide supplementation on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) fed diets with high levels of plant proteins. *J Aquac Res Dev*, S1:011.
- FAO, Fishery and Aquaculture, 2014. Disponível em <<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>> Acesso em 20 de Novembro de 2014.
- FJELLHEIM, A. J.; PLAYFOOT, K. J.; SKJERMO, J.; VADSTEIN O. 2007 Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 269, n. 1-4, p. 98-106.
- GELDREICH, E. E.; CLARKE, N. A. 1966 Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 14, n. 3, p. 429-437.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. 1995 Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401–1412.

HUNTINGFORD, F. A. 1986 Development of behaviour in fishes. In: PITCHER, T.J., ed. *The behaviour of teleost fishes*. London: Croom Helm, 1986. p. 47-68.

KORSNES, K.; NICOLAISEN, O.; SKAR, C. K.; NERLAND, A. H.; BERGH, Ø. 2006 Bacteria in the gut of juvenile cod *Gadus morhua* fed live feed enriched with four different commercial diets. *ICES Journal of Marine Science*, Dauphin Island, v. 63, n. 2, p. 296-301.

LAIDLEY, C.W.; LEATHERLAND, J.F. 1988 Cohort sampling, anaesthesia and stocking density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *R. Journal of Fish Biology*. v. 33, p. 73-88.

LARA-FLORES, M.; OLEVERA-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.

LI, H.W.; BROCKSEN, R.W. 1977 Approaches to the analysis of energetic costs of intraspecific competition for space by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*. v. 11, p.329-334.

LIN, S.; MAO, S.; GUAN, Y.; LUO, L.; LUO, L.; PAN, Y. 2012 Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, Oxford, v. 342/343, p. 36–41.

McCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. 2001 The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity, and microbiota. *Cellular Microbiology*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-11.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES C.M.; BOSCOLO, W.R. 2000 Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum*, v.22, n.2, p.479-484.

NAÇÕES UNIDAS, 2013. População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU. Disponível em < <http://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/> > Acesso em 06 de Julho de 2015.

NAYAK, S. K. 2010 Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, Oxford, v. 41, n. 11, p. 1553-1573.

NOAKES, D.L.G.; LEATHERLAND, J.F. 1977 social dominance and interregional cell activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Pisces: Salmonidae). *Environmental Biology of Fishes*. v.2, p.131-136, 1977.

PETERS, G.; SCHWARZER, R. 1985 Changes in hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. *Diseases of Aquatic Organisms*. v.4, p. 83-89.

RING, E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R.; MAYHEW, T. M.; OLSEN, R. E. 2006a The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research*, Oxford, v. 37, n. 9, p. 891-897.

RING, E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R.; REFSTIE, S.; KROGDAHL, Å. 2006b Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 261, n. 3, p. 829-841.

RINGO, E.; GATESOUBE, F.J. 1998 Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, v. 160, p. 177-203.

RODRIGUES-ESTRADA U, SATOH S, HAGA Y, FUSHIMI H, SWEETMAN J. 2009 Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult Sci*, 54(4): 609e17.

- SAMRONGPAN, C.; AREECHON, N.; YOONPUNDH, R.; SIRSAPOOME, P. 2008 Effect of mannan oligosaccharides on growth, survival and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) fry. In: *8th international symposium on tilapia in aquaculture*; October 12e14. p. 345e53. Cairo, Egypt.
- SHIAU, S.; YU, Y. 1999 Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth on tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, 179, 439-446.
- STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. 2007 Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, Dordrecht, v. 15, p. 153–161.
- SUGITA, H.; TOKUYAMA, K.; DEGUCHI, Y. 1985 The intestinal microflora of carp, *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Sarotherodon niloticus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Tokio, v. 51, n. 8, p. 1325-1329.
- TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J.Y.; JEON, M.J.; BAI, S.C.; LEE, W.J.; YUGE, K.; KOSHIO, S. 2006 Growth, stress tolerance and nonspecific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72, 310–321.
- TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; BETANCOR, M. B.; MONTERO, D.; CABALLERO, M. J.; SWEETMAN, J.; IZQUIERDO, M. 2013 Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology*, Philadelphia, v. 34, n. 6, p. 1485-1495.
- UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; HIGGINS, R. 2000 Infections of *Edwardsiella tarda* among brook trout in Quebec. *Journal of Aquatic Animal Health*, Bethesda, v. 12, n. 1, p. 74-77.
- VOLPATO, G.L.; FRIOLI, P.M.A.; CARRIERI, M.P.; FERNADES, M.O.; SARTORI, D.R.S.; BELICIO, H.C. 1987 Comportamento de dominância e crescimento em peixes. In: COSTA, M.J.R.P.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.F., eds. *Anais de Etologia*, Jaboticabal, 1987. v.5, p.169-194.
- WANG, Y.-B., LI, J.-R., LIN, J. 2008 Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281, 1–4.
- WACHE, Y.; AUFRAY, F.; GATESOUBE, F.J.; ZAMBONINO, J.; GAYET, V.; LABBE, L.; QUENTEL, C. 2006 Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* fry. *Aquaculture*, 258: 470–478
- YAMAGISHI H. 1962 Growth relation in some small experimental populations of rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* R. with special reference to social relations among individuals. *Japanese Journal of Ecology*. v. 12, p. 43-53.
- YASSUI, H.; AKINO, T.; YASUDA, T.; FUKAYA, M.; WAKAMURA, S.; ONO, H. 2007 Gomadalactones A, B and C: novel 3-oxabicyclo [3.3.0] octane compounds in the contact sex pheromone of the white-spotted longicom beetle, *Anoplophora malasiaca*, *Tetrahedron Letters*, v. 48, p. 2395-2400.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento da produção aquícola traz consigo a necessidade de estudos e aplicações de imunostimulantes na dieta de peixes produzidos intensivamente, objetivando a redução da ocorrência de surtos e de mortalidades. Além disso, o mercado consumidor está cada vez mais rígido, exigindo mercadorias de qualidade, produzidas de modo sustentável, limitando o uso de antibióticos nas produções.

No presente estudo, ao testar a inclusão de probiótico e prebióticos separados e em conjunto na dieta de tilápia-do-nilo, não foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos e imunológicos. Porém no desafio bacteriano, melhores índices de sobrevivência e de proteção relativa foram apresentados em peixes alimentados durante 21 dias com ração contendo a simbiose entre o mananoligossacarídeo e o probiótico comercial.

Já no desempenho, os resultados foram diferentes, com maiores valores de ganho de peso e biomassa em tratamentos com suplementação de quitosana (separado e em conjunto com o probiótico DBA). Porém, fatores externos como territorialismo e comportamento agonístico prejudicaram o tratamento com simbiose entre mananoligossacarídeo (DBA+Actigen), influenciando os resultados.

A nível produtivo, a inclusão de simbióticos na ração pode ser uma alternativa profilática, principalmente em momentos que antecedem manejos estressantes, como classificação, vacinação e despesca. Essa profilaxia poderia resultar em menores índices de mortalidade, gerando menos prejuízo aos produtores. Por isso, novos experimentos são necessários para comprovar a efetividade do uso de prebióticos e probióticos, separados ou em simbiose, assim como suas dosagens e tempo de fornecimento, a nível laboratorial e produtivo.