

# ***Bacillus subtilis* E *Lactobacillus plantarum* COMO PROBIÓTICO NA DIETA DE PÓS-LARVAS DE TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, DURANTE A FASE DE REVERSÃO SEXUAL\***

Mateus Cardoso GUIMARÃES<sup>1,2\*</sup>; Silvana TAPIA-PANIAGUA<sup>2</sup>; Miguel Ángel MORIÑIGO<sup>2</sup>; Danielle de Carla DIAS<sup>1</sup>; Mariene Myoko NATORI<sup>1</sup>; Carlos Massatoshi ISHIKAWA<sup>1</sup>; Felipe von Atzingen Pereira de ARAUJO<sup>1</sup>; Leonardo TACHIBANA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP [cardosomateus1996@gmail.com](mailto:cardosomateus1996@gmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Faculdade de Ciências/Universidade de Málaga – Espanha

\*Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo 2016/22355)

**Palavras-chave:** nutrição; imunologia; desempenho zootécnico; estresse; microbiologia; expressão gênica

## **INTRODUÇÃO**

Os probióticos podem ser definidos como “microrganismos os quais, quando administrados em adequadas quantidades, conferem benefícios na saúde do hospedeiro” (IRIANTO e AUSTIN, 2002). A fase de reversão sexual da tilápia-do-nylo é considerada uma das mais críticas em relação à mortalidade, e o hormônio masculino na ração pode acarretar imunossupressão nos peixes, que ficam sujeitos às doenças oportunistas, podendo afetar o crescimento e sobrevivência dos mesmos; portanto se faz necessário mais estudos (FARIAS *et al.*, 2004). Objetivou-se, com este trabalho, avaliar os efeitos benéficos da administração do probiótico composto de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* (Biogenic – AQUA-PHOTO) em pós-larvas de tilápia-do-nylo, durante a fase de reversão sexual, em condições de estresse pela alta densidade.

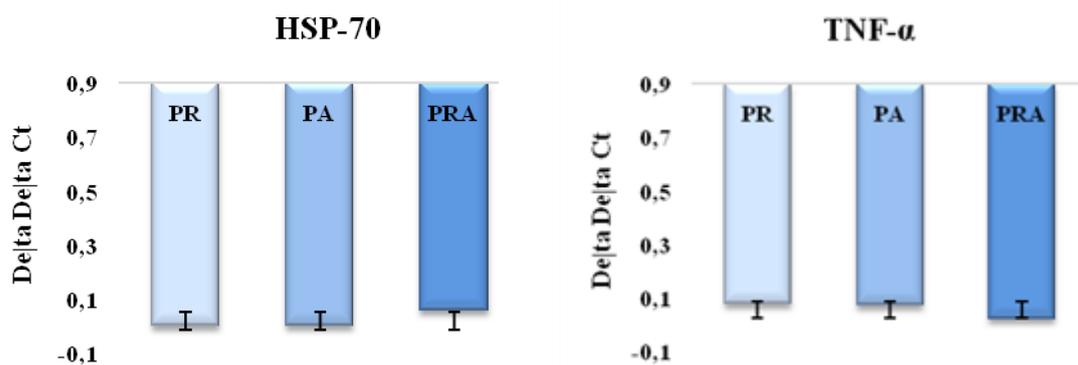
## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Instituto de Pesca de São Paulo, no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram: 1) adição de probiótico na ração (PR); 2) adição do probiótico na água do aquário (PA); 3) adição do probiótico na ração e água (PRA); 4) controle. Foram utilizadas 2.000 pós-larvas de tilápia-do-nylo distribuídas em 20 aquários com capacidade para 20 litros. Os quatro grupos receberam ração comercial contendo 60 mg kg<sup>-1</sup> do hormônio 17- $\alpha$ -metiltestosterona. O probiótico em pó foi adicionado à ração (0,2% do peso da ração) e na água. As amostras de trato intestinal de 2 peixes por aquário foram removidas após

anestesia profunda com eugenol (100 mg L<sup>-1</sup>) e secção da medula espinhal cervical, para a análise de expressão gênica de TNF- $\alpha$  (imunologia) e HSP-70 (estresse), realizada na Universidade de Málaga (UMA) - Espanha, no Laboratório de Microbiologia. As amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi isolado utilizando o kit de extração de TRIsure™ (BIOLINE). O RNA total (1  $\mu$ g) de cada amostra foi transcrito de modo reverso para a conversão de RNA em moléculas de DNA utilizando o kit de síntese de cDNA iScript\_ (Bio-Rad). A seleção de mRNA foi feita a partir de RNA total, utilizando um iniciador com 15 unidades de timina (poli-T) que se ligam especificamente com a cauda de moléculas de mRNA de eucariotas. O protocolo utilizado de amplificação iniciou com a desnaturação inicial e ativação de enzimas durante 7 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, e 65 °C durante 30 segundos. Os dados foram analisados para a quantificação relativa e foram relacionados com o sinal de PCR do alvo transcrito em um grupo de tratamento para outra amostra, tal como um controle não tratado. Os dados foram submetidos à análise de variância, após verificação da homocedasticidade e a normalidade, e posteriormente foi aplicado o teste de Tukey para a comparação de médias (P<0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão dos genes relacionados com a imunologia (TNF- $\alpha$ ) e com estresse (HSP-70) não apresentou diferença estatística entre si (p<0,05) e os valores estão representados na Figura 1.



**Figura 1.** Expressão do gene TNF- $\alpha$  e HSP-70 no intestino de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* alimentada com probiótico *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*, tratamento Probiótico na Ração (PR), Probiótico na Água (PA), Probiótico na Ração + Água (PRA).

A inclusão do probiótico na água ou na ração não causou aumento na expressão do gene TNF- $\alpha$  e HSP-70. Os resultados observados neste experimento diferem dos relatos de alguns autores. HE *et al.* (2013) observaram aumentos significativos ( $P>0,05$ ) na expressão dos genes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e HSP-70 em tilápia-do-nilo com dietas suplementadas com *B. subtilis* após 56 dias de alimentação. Modulações também foram relatadas em trutas arco-íris, *Ochorynchus mykiss* alimentadas com *B. subtilis*, *Lactococcus rhamnosus* e *Lactococcus garvieae* (PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste experimento, conclui-se que a adição dos probióticos *B. subtilis* e *L. plantarum*, em pós-larvas de tilápia-do-nilo, não promoveram efeitos sobre o sistema imune (TNF- $\alpha$ ) e de estresse (HSP 70). Desta forma, estudos sobre o tempo de suplementação de probióticos, dosagens e condição de estresse são necessários para comprovar a eficácia da aplicação do probiótico.

## REFERÊNCIAS

- FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O.; SAMPAIO, A.H. 2004 Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. *Revista Ciência Agronômica*, 35(número especial): 189-195.
- HE, S.; ZHANG, Y.; XU, L.; YANG, Y.; MARUBASHI, T.; ZHOU, Z. 2013 Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*/*Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 412: 125-130.
- IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002 Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6): 333-342.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, J.L.; BALCAZAR, D.L.; MERRIFIELD, O.; CARNEVALI, G.; GIOACCHINI, I. de Blas. 2011 Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunology*, 31: 196-201.