

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JUNHO - 2015**

**PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE ALEVINOS DE TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*): DESEMPENHO E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS**

ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO

Engenheiro de Pesca
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS da UFRB, Campus de Cruz das Almas, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fortes

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JUNHO – 2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

P142 Paixão, Alison Eduardo Melo.

Probióticos na alimentação de alevinos de Tambaqui (*Colossoma macropomum*): desempenho e parâmetros hematológicos. / Alison Eduardo Melo da Paixão. _ Cruz das Almas, BA., 2015.
75 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fortes da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015.

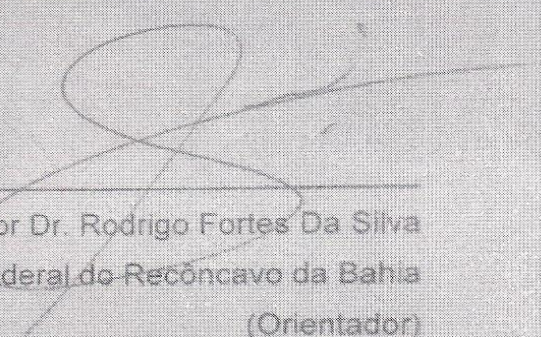
1. Peixe. 2. Tambaqui. 3. *Colossoma macropomum*. 4. Medicina Veterinária I. Silva, Rodrigo Fortes da II. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia III. Título.

CDD: 636.0899 (21.ed.)

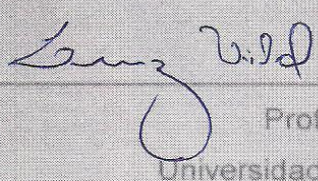
Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro
Bibliotecária - CRB51161
Embrapa Mandioca e Fruticultura

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO



Professor Dr. Rodrigo Fortes Da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)



Professor Dr. Luiz Vitor
Universidade Federal da Bahia



Pós Dr. Denise Soledade Peixoto Pereira
Universidade Federal da Bahia

CRUZ DAS ALMAS - BA
JUNHO - 2015

“Em todas as fases da vida existem dificuldades, são elas que nos ensinam e ajudam a valorizar tudo que conquistamos. Seguir em frente é muito mais que dar um simples passo, seguir em frente é erguer a cabeça e perceber que tudo que você quer, pode sim ser alcançado.”

ALISON EDUARDO MELO DA PAIXÃO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as conquistas que tem me concedido.

Aos meus pais José Silva da Paixão e Terezinha Melo da Paixão, pelo dom da vida e por me mostrar o caminho correto a seguir.

Aos meus irmãos Cláudia, Adson José (in memoriam), Kelly Cristina, José Junior e Tereza Verena por me apoiar em todas as trajetórias e conquistas.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Fortes, pela oportunidade e ensinamentos proporcionados.

Aos meus queridos estagiários, que colaboraram para concretização deste trabalho.

Aos amigos, que sempre deram o apoio moral e sempre incentivaram as minhas iniciativas.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, que compartilharam as alegrias e dificuldades durante o período em que dividimos experiências.

Por fim, fica aqui o meu reconhecimento a todos que contribuíram para que essa conquista fosse alcançada.

Dedico a todos vocês essa conquista.

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

Capítulo 1. Efeito de probióticos no crescimento e composição corpórea do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Resumo	24
Abstract	24
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
3. Resultados	29
4. Discussão.....	30
5. Conclusões	32
6. Referências Bibliográficas	32

Capítulo 2. Parâmetros hematológicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*) suplementados com probióticos e submetidos a desafio sanitário

Resumo	37
Abstract	24
1. Introdução	38
2. Material e Métodos	39
3. Resultados	43
4. Discussão	45
5. Conclusões	49
6. Considerações finais	50
7. Referências Bibliográficas	50

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E ANEXO.

	Paginas
Tabela 1 - Produção mundial da pesca e aquicultura em 2010.....	2
Tabela 2 - Parâmetros de desempenho do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) submetidos a dietas suplementadas com probióticos.....	29
Tabela 3 - Parâmetros de desempenho do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) submetidos a dietas suplementadas com probióticos.....	29
Tabela 4 - Interação (tratamento x tempo) dos parâmetros hematológicos (série vermelha) para o tambaqui após tratamento com dois probióticos (<i>B. subtilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>) e desafiados com <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
Figura 1 - Origem do pescado consumido no Brasil.....	3
Figura 2 - Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	4
Figura 3 - Natação errática e perda de equilíbrio de tilápias, infectadas..	7
Figura 4 - Tilápias com distensão abdominal, infectadas.....	7
Figura 5 - Tilápia com Exoftalmia causada por estreptococose.....	7
Anexo- ARTIGO CIENTÍFICO: Probióticos: desempenho, composição corporal e interação “desafio x tempo” nos parâmetros hematológicos do tambaqui.....	56

PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE ALEVINOS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*): DESEMPENHO E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Autor: Alison Eduardo Melo da Paixão

Orientador: Rodrigo Fortes da Silva

Resumo: O tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie endêmica das bacias Orinoco e Amazonas é uma espécie com notório interesse comercial. Ela é considerada uma das espécies nativas de água doce com maior interesse na aquicultura brasileira e possui um grande valor de mercado devido a sua rusticidade, crescimento rápido e sabor agradável. Diversos problemas atingem a aquicultura mundial, a exemplo de danos causados por bactérias patogênicas. A *Streptococcus agalactiae* é um das bactérias que mais acometem a produção aquícola, trazendo prejuízos imensos aos produtores. Probióticos são ótimas alternativas ao uso de antibióticos para sanar problemas causados por patógenos na aquicultura, eles têm sido utilizados em dietas para organismos aquáticos visando aumentar a resistência, sobrevivência, imunidade, desempenho, dentre outros parâmetros fisiológicos. Diversos estudos vêm sendo realizados com o propósito de sanar ou minimizar os problemas causados por patógenos no meio aquático, como por exemplo, estudos de parâmetros hematológicos, que podem verificar a possível ação de patógenos sobre os seus hospedeiros. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o desempenho e parâmetros hematológicos de juvenis de tambaquis com inclusão de dois probióticos (*Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*) na dieta. Na primeira etapa foram utilizados 108 animais e durou 90 dias. Avaliou-se o desempenho produtivo e a composição da carcaça dos animais. Foi constatado que a inclusão dos aditivos probióticos *B. subtilis* e *S. cerevisiae* não afetou o desempenho produtivo e a composição corpórea dos animais alimentados durante os 90 dias. Na segunda etapa foram utilizados 60 animais, o objetivo foi avaliar o efeito do desafio com *Streptococcus agalactiae* nos parâmetros hematológicos dos tambaquis suplementados com *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. No presente estudo não foi observado sinais clínicos nem mortalidade após o desafio com a bactéria *Streptococcus agalactiae*. Os parâmetros hematológicos apresentaram alterações ($p \leq 0,05$) para o número de eritrócitos (Eri), volume globular (VG), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média

(CHCM), hemoglobina (Hb) e proteína (PTT). O estudo demonstrou que a admissão desses incrementos tem efeitos benéficos para os animais suplementados, reduzindo os efeitos danosos, mesmo quando desafiados com bactéria patogênica.

Palavras chave: Desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos, imunidade, resistência.

Probiotics in feeding of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fingerlings: performance and hematological parameters

Author: Alison Eduardo Melo da Paixão

Orientated by: Rodrigo Fortes da Silva

Abstract: Tambaqui (*Colossoma macropomum*), an endemic species of the Orinoco and Amazon basins, is a species with remarkable commercial interest. It is considered one of the native freshwater species with higher interest for Brazilian aquaculture and has a great market value due to its hardiness, fast growing and pleasant taste. Several problems affect the global aquaculture, such as damage caused by pathogenic bacteria. *Streptococcus agalactiae* is the bacteria that most affect aquaculture, bringing huge losses to producers. Probiotics are great alternatives to antibiotics to remedy problems caused by pathogens in aquaculture; they have been used in diets for aquatic organisms to increase the resistance, survival, immunity and performance, among other physiological parameters. Several studies have been conducted with the purpose of remedying or minimizing the problems caused by pathogens in aquatic environment, such as studies of hematologic parameters, which can verify the possible action of pathogens on their hosts. This study aimed to evaluate the performance and hematological parameters of tambaqui juveniles with inclusion of two probiotic (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) in the diet. At the first stage, which lasted 90 days, 108 animals were used. The productive performance and carcass composition of animals were evaluated. It has been found that the inclusion of probiotics additives *B. subtilis* and *S. cerevisiae* did not affect growth performance and body composition of animals fed for 90 days. In the second stage 60 animals were used, the objective was to evaluate the effect of the challenge with *Streptococcus agalactiae* in hematological parameters of tambaquis supplemented with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Our study has not observed clinical signs or mortality after challenge with the bacteria *Streptococcus agalactiae*. Hematological parameters showed changes ($p = 0.05$) for the number of erythrocytes (Eri), packed cell volume (PCV), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), hemoglobin (Hb) and protein (PTT). The study showed that the admission of these increments have beneficial effects for the supplemented animals, reducing the harmful effects, even when challenged with pathogenic bacteria.

Key words: zootechnical performance, hematological, immunity, resistance.

1. INTRODUÇÃO

A carne de pescado é a proteína animal mais consumida no mundo. Cerca de 155,7 milhões de toneladas de pescado foram produzidas em 2011, onde 130,8 milhões foram destinadas ao consumo humano. Entre 1991 e 2011, a consumo mundial de carne bovina cresceu 13%, praticamente a mesma taxa de crescimento do consumo humano de pescado (14,4%) foi registrada num período quatro vezes menor entre 2006 e 2011. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), ao todo, o setor movimenta US\$ 217,5 bilhões em todo planeta (GONÇALVES, 2014).

A aquicultura nos últimos anos vem passando por uma grande ascensão. Segundo dados da FAO (2014), a produção mundial de pescado por captura reduziu de 93,7 milhões de toneladas para 91,3 milhões entre os anos de 2011 e 2012, enquanto a aquicultura mundial passou de 62,0 milhões de toneladas para 66,6 milhões no mesmo período, desses, a aquicultura continental produziu 41,9 milhões de toneladas e a aquicultura marinha 24,7 milhões de toneladas, demonstrando a significativa ascensão da atividade aquícola em todo o mundo. Por continente temos a Ásia liderando a produção aquícola com 58,9 milhões de toneladas (89,39%), Américas com 3,2 milhões (4,78%), Europa com 2,8 milhões (4,32%), África com 1,5 milhões (2,23%) e por ultimo a Oceania com quase 200.000 toneladas (0,28%) de pescados produzidos em 2012. A mesma fonte relata que China (41.108,306 T), Índia (4.209.415 T) e Vietnam (3.085.500 T) são os maiores produtores aquícolas mundiais. .

O Brasil é um dos escassos países com condições para atender o aumento da demanda mundial por produtos pesqueiros, principalmente por meio da aquicultura. Segundo MPA (2011), o país ocupava o 17º lugar no ranking mundial da aquicultura com 479.399 toneladas e o 25º lugar na produção da pesca extrativista com 785.366 toneladas (tabela 1).

Tabela 1: Produção mundial da pesca e aquicultura em 2010.

PESCA EXTRATIVISTA (2010)		AQUICULTURA (2010)	
Ranking mundial	Toneladas	Ranking mundial	Toneladas
1º China	15.665.587	1º China	47.829.610
2º Indonésia	5.384.418	2º Indonésia	6.277.925
3º Índia	4.694.970	3º Índia	4.653.093
25º Brasil	785.366	17º Brasil	479.399

Fonte: Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011/MPA

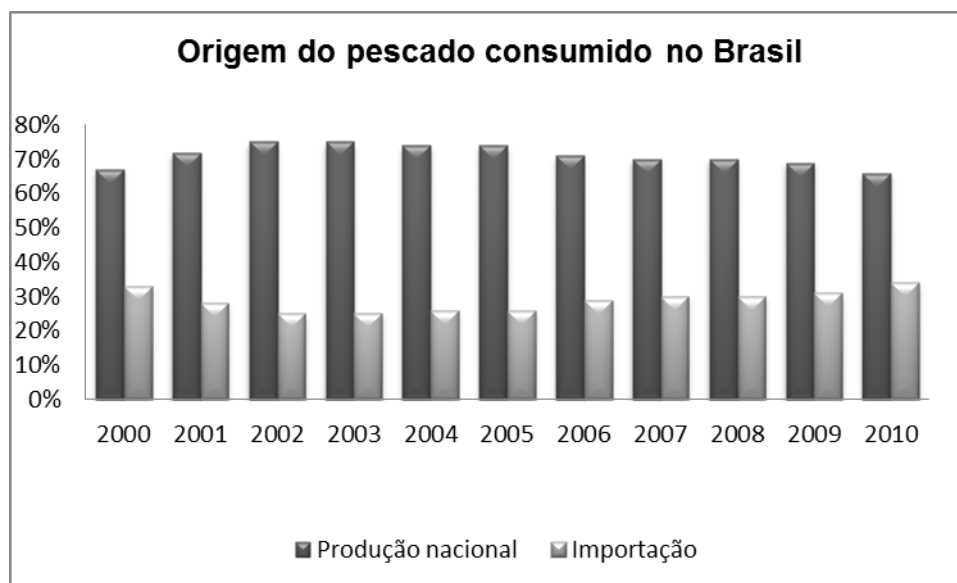
A aquicultura brasileira vem crescendo na mesma proporção da aquicultura mundial. A estimativa é que em 2030 a produção nacional alcance cerca de 20 milhões de toneladas. Alemanha, Estados Unidos, França, Itália, Japão e Taiwan são os principais prováveis países de destino da produção. O país possui condições climáticas e naturais bastante favoráveis: A maior parte da água doce do planeta (cerca de 12%) e sua costa marítima de aproximadamente 8,5 mil quilômetros, além da rica biodiversidade tanto no mar quanto nos rios e lagoas, e uma produção significativa de grãos para a fabricação de ração, classifica o país como uma das grandes potências aquícolas futuras (MPA, 2014). Segundo a mesma fonte, a produção nacional de pescado alcançou em 2011 quase 1,4 milhão de toneladas, onde 628.704,3 deste total foram produzidas em cativeiro.

O Brasil possui cerca de 3 mil espécies de peixes, em que boa parte tem potencial para produção. Como exemplos o dourado, jaú, matrinxã, piau, tambaqui, pintado, pirarucu e jundiá. Apenas 20% das espécies nativas colaboram com a produção nacional, os outros 80% são de espécies exóticas, na Ásia, 95% dos cultivos são de espécies nativas. Hoje as espécies exóticas são mais cultivadas não pelas suas características, mas sim, pela existência de informações básicas para a sua criação. No país, espécies exóticas só poderão ser cultivadas, se já estiverem comprovadamente detectadas na bacia hidrográfica onde se pretende produzir (GONÇALVES, 2014). Existe uma limitação para a produção de espécie exótica na legislação brasileira. O Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) descreve na PORTARIA nº 145/98, de 29 de outubro de 1998, Art. 3º que é proibida a introdução de espécies de macrófitas e peixes de água doce em águas da união (IBAMA, 1998).

Em relação à produção nacional de peixes por região, no Norte prevalece à produção de peixes como o tambaqui e o pirarucu, já no Centro-Oeste, os destaques são o tambaqui, pacu e os pintados, no Nordeste, a tilápia e o camarão marinho, no Sudeste a tilápia tem grande presença na aquicultura, no Sul predominam as carpas, tilápias, ostras e mexilhões (GONÇALVES, 2014).

O consumo brasileiro de pescado vem crescendo a cada ano. Em 2001, o consumo per capta de peixes no Brasil era de 6,79 Kg, superando 9,75 Kg em 2010. Hoje, o consumo no país gira em torno de 10 Kg por habitante e a estimativa é que, no final de 2015 esse consumo alcance 12 kg anuais por habitante, mínimo de consumo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A maior parte do pescado consumido no país nos últimos anos é de origem interna ($\pm 70\%$), o restante vem da importação ($\pm 30\%$) (Figura 1).

Figura 1: Origem do pescado consumido no Brasil



Fonte: MPA (2011).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tambaqui

Uma espécie com notório interesse comercial é a *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818), pertencente à família Characidae e subfamília Serrasalminidae, conhecida vulgarmente como tambaqui (Figura 2). Ela é considerada a segunda maior espécie de escamas de água doce da Bacia Amazônica, perdendo apenas para o pirarucu (GOULDING; CARVALHO, 1982), além de ser uma das espécies nativas de maior interesse na aquicultura brasileira atual (MPA, 2011; FIUZA et al., 2015). Esse animal é proveniente das bacias dos rios Orinoco e Amazonas, situadas na América do Sul. Quando juvenil seu dorso é pardo e o ventre tem uma tonalidade esbranquiçada, quando maduro, possui manchas escuras no ventre e na cauda e seu dorso fica esverdeado. O tambaqui é um peixe dulcícola migrador de grande porte, possui um hábito alimentar onívoro, alimentando-se de zooplâncton, sementes, frutos e pequenos animais, como por exemplo, microcrustáceos, insetos e caramujos (CARVALHO, 1981; GOULDING; CARVALHO, 1982). Esses animais realizam migração reprodutiva, alcançando a maturidade sexual entre 4 e 5 anos de idade, podem alcançar mais de um metro de comprimento e até 45 kg de peso vivo (CARDOSO, 2001).

Figura 2: Tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: Canal do produtor (<http://www.canaldoprodutor.com.br/>)

Devido à rusticidade, com alta resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e temperatura, assim como crescimento rápido, podendo atingir em cativeiro tamanho comercial em um ano, o tambaqui possui um elevado potencial de produção, a ótima qualidade, consistência e palatabilidade de carne apreciada pelo consumidor, também são atrativos que lhes conferem um alto valor comercial e importância para a economia no mercado nacional (VAL; HONCZARYK, 1995; VAL et al. 1998; SILVA et al. 2007). O tambaqui se destaca entre outras espécies pela facilidade de adaptação ao cultivo, aceitando bem, rações peletizadas e extrusadas. Sua tolerância a atividades biométricas e facilidade em reprodução artificial também possui grande destaque (SAINT PAUL, 1986). Esses destaques têm despertado o interesse de vários departamentos da iniciativa privada e governamental no Brasil (RESENDE et al., 2009).

Segundo Brasil (2011), o país produziu cerca de 111,1 mil toneladas de tambaqui em 2011, além disso, nos últimos tempos diversos trabalhos vêm sendo executados com o intuito de promover um aumento na imunidade e desempenho zootécnico dos animais, visando minimizar os problemas de doenças e aumentar a renda nos cultivos (SILVA et al., 2007; NUNES, 2011; CHAGAS et al., 2013; HUANG et al., 2015).

2.2. Sistema digestório dos peixes

O sistema digestório dos peixes possui uma quantidade de células vivas maiores que a encontrada no ambiente, com isso, o intestino e estômago tornam-se um ambiente bastante favorável para o crescimento de microrganismos. A mucosa do intestino abrange uma ampla área, exposta aos agentes exógenos durante a ingestão, digestão e absorção dos nutrientes. Ela é considerada a interface mais importante entre o ambiente e o hospedeiro. As células vivas presente nela regulam a entrada de nutrientes na ingestão e protegem os organismos contra os agentes nocivos que podem estar presentes no lúmen (MAIORKA et al., 2000; MELLO, 2012).

Uma grande parte das espécies cultivadas, inclusive o tambaqui são susceptíveis à infecção, a exemplo de parasitas e bactérias, essas podem causar doenças e mortalidade nos diversos estágios de crescimento dos animais em

sistemas de cultivo (VENMATHI MARAN et al., 2013; UZUN; OGU, 2015; BOIJINK et al., 2015; DIAS et al., 2012; DIAS et al., 2015).

2.3. Sanidade em peixes

A sanidade é um dos fatores de maior relevância para a produção comercial de animais terrestres e aquáticos. A densidade de estocagem dos animais oferece grande risco para o surgimento de enfermidades, assim como a quantidade de alimento fornecido, manejos, transportes inadequados e flutuações nos parâmetros ambientais geram estresse, afetando o sistema imunológico dos animais. Respostas imunológicas dos efeitos inibitórios em peixes podem gerar estresse agudo ou crônico, ocasionando redução na resistência (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Microrganismos patogênicos são enormes responsáveis pela maioria dos problemas econômicos em cultivos de grande porte no Brasil, dentre eles destacam-se as bactérias, maiores causadoras de mortalidade na aquicultura (PAVANELLI et al., 2002; MARTINS et al., 2008). Diversas bactérias são endógenas da flora intestinal do próprio peixe e até mesmo normalmente encontrados no ambiente de cultivo (AYDIN et al., 2005; BARCELLOS et al., 2008). A exemplo, bactérias patogênicas do gênero *Streptococcus* foram isoladas em diversos sistemas de criação no Brasil (SALVADOR et al., 2012). Por este motivo, na aquicultura, há a necessidade de maiores estudos sobre melhorias nas condições nutricionais e sanitárias.

2.4. *Streptococcus*

O gênero é formado por cocos Gram-positivos, seu tamanho pode variar entre 0,5-0,2 μm de diâmetro. São anaeróbios facultativos, para crescimento requerem um meio nutricionalmente rico e temperaturas entre 25 e 45°C. As bactérias do gênero possuem metabolismo fermentativo, com principal produto o lactato. Bactérias do gênero *Streptococcus* possuem ação patogênica para uma grande diversidade de hospedeiros, como por exemplo, seres humanos, outros mamíferos, peixes de água doce e marinhos. As contaminações ocasionadas por esses microrganismos possuem grande impacto em múltiplos segmentos da cultura animal, a exemplo da aquicultura. As espécies *Streptococcus agalactiae* e

Streptococcus iniae são as mais descritas como principais vetores de infecções nervosas em peixes, ocasionando grandes estragos especialmente na tilapicultura em todo mundo (AGNEW; BARNES, 2007; PULIDO; IREGUI, 2010; CHAN; JOLLEY, 2015).

Na literatura, infecções por *Streptococcus agalactiae* são descritas desde o século 30 e nas últimas décadas esse microrganismo vem se destacando como um dos mais prejudiciais patógenos na piscicultura. No Brasil, para animais em engorda, a doença causada por essas bactérias (estreptococose) tem sido controlada com uso de antibióticos incorporados à dieta, ou pela administração direta na água do cultivo (FIGUEIREDO; LEAL, 2008). O primeiro caso de infecção no Brasil foi descrito por Figueiredo et al. (2006), e para mais de 20 espécies de peixes por Olivares-Fuster et al. (2008).

Os sinais clínicos observados são escurecimento dos peixes, natação errática e em movimentos circulares (Figura 3), pequenas lesões de pele com perda de escamas e áreas de petéquias na base das nadadeiras, distensão abdominal (Figura 4), exoftalmia bilateral ou unilateral em alguns animais (Figura 5) e por fim, pode gerar uma alta mortalidade nos cultivos (KUBITZA, 2005). A evolução da doença é rápida, a morte pode acontecer dois a três dias após o início dos sinais clínicos. (MIAN et al., 2009; ZAMRI-SAAD et al., 2010).

Figura 3: Natação errática e perda de equilíbrio de tilápias, infectadas.



Figura 4: Tilápias com distensão abdominal, infectadas.



Figura 5: Tilápia com exoftalmia causada por estreptococose.



Fonte: Kubitza, 2005.

2.5 Probióticos

Aditivos alimentares vêm sendo estudados com o objetivo de conferir maior resistência e saúde aos animais, como por exemplo, os probióticos.

A palavra probiótico tem origem grega, o seu significado é “para a vida”. No início ela descrevia extratos ou compostos de tecidos que tinham a capacidade de

promover o aumento microbiano (LILY; STILLWELL, 1965). Parker (1974) conceituou Probióticos como organismos e substâncias contribuintes para o equilíbrio da microbiota intestinal, definição insatisfatória, pois a palavra substância também inclui suplementos como os antibióticos. Füller (1989) definiu como produto constituído por microrganismos vivos que atua beneficiando o organismo, melhorando o balanço da microbiota gastrointestinal dos animais. O significado foi complementado pela FAO/WHO (2001) como “microrganismos vivos que quando administrados em doses adequadas conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro”. Schrezenmeir; De Vrese (2001), discorrem que o termo deveria ser utilizado para designar produtos com microrganismos interessantes definidos e quantidade adequada, que modifiquem a microbiota das mucosas intestinais, por incremento ou colonização do sistema do hospedeiro e que venham a produzir efeitos benéficos em sua saúde. O probiótico ideal, independentemente da sua fonte, deve ser capaz de colonizar, estabelecer-se e multiplicar-se no intestino do hospedeiro (BELO et al., 2014; CHEN et al., 2014; JHA et al., 2015).

2.5.1 Mecanismos de ação dos probióticos

Ainda não foi inteiramente explicada à maneira de ação dos probióticos, o que se têm, são os diversos processos de atuação associados ou independentes que eles exercem.

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos: O primeiro é a exclusão competitiva, onde os probióticos disputam com os patógenos pelos nutrientes e sítios de fixação do intestino, impedindo a atuação do patógeno temporariamente, esta competição impede a livre fixação dos mesmos, protegendo as vilosidades e permitindo a regeneração da mucosa lesada (PANT et al., 2007; BARBOSA et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Por outro lado, essa exclusão demonstra a necessidade de uma administração contínua e dosagens específicas dos probióticos para manifestar melhores efeitos. O segundo é a alteração do metabolismo microbiano, os probióticos podem afetar os patógenos através de algumas sínteses, promovendo um efeito letal bactericida (RAMÍREZ; OTÁLVARO, 2008; BALLUS et al., 2010; VANEGAS et al., 2010). Os lactobacilos podem produzir peróxido de hidrogênio, substância

inibidora da *Escherichia coli*, *salmonela sp.* dentre outras (SCHLUNDT, 2015). O terceiro é o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (STAYKOV et al., 2007; TORRECILLAS et al., 2007).

2.5.1.1 Exclusão competitiva

A teoria da exclusão competitiva nasceu a partir do conceito de “competição por sítios de ligação” (NURMI; RANTALA, 1973), para indicar a falta de habilidade de alguns microrganismos se estabelecerem no intestino, devido à presença de outra população. Segundo Ferreira e Ferreira (2006), um organismo não consegue ocupar o mesmo espaço de outro. É nesse fato que se baseia a exclusão competitiva, um ambiente já colonizado impede a entrada de um novo agente. Os probióticos, ao serem ingeridos, formam uma barreira física na mucosa intestinal, ocupando os sítios de ligação e excluindo as bactérias patogênicas por competição de espaço (FURLAN et al., 2004). O mecanismo chave da colonização das bactérias parece ser aderência à mucosa intestinal, sem essa aderência, os efeitos nocivos sobre a saúde do hospedeiro são anulados (ALBUQUERQUE et al., 2013; MELLO et al., 2013).

A exclusão competitiva produz produtos que poderiam ser uma alternativa à utilização dos agentes de crescimento. Os compostos gerados nessa interação não produzem efeitos deletérios ao animal, pois são produtos de bactérias, além de não produzir resistência a nenhum medicamento, por esse fato, uma das alternativas mais estudadas nos últimos tempos é a utilização de probióticos (DANIELS et al., 2013; SHARIFUZZAMAN et al., 2014; JHA et al., 2015).

2.5.1.2 Competição por nutrientes

Os animais e as bactérias não competem pelos nutrientes, o que ocorre é a competição entre as bactérias intestinais pelos seus nutrientes específicos (TAKAHASHI et al., 2007; BUSANELLO et al., 2012). Os probióticos se nutrem de compostos degradados pelas enzimas digestivas, a escassez desses nutrientes limita a alimentação das bactérias patogênicas na luz intestinal, fator limitante para sua manutenção, reduzindo os efeitos deletérios dessas sobre o hospedeiro (MACARI; FURLAN, 2005).

Diversos aspectos como dosagem imprópria de microrganismos que compõem os probióticos, deficiências sanitárias em condições experimentais e possíveis competições com o hospedeiro pelos nutrientes podem vir a colaborar com respostas desfavoráveis quando se utilizam os probióticos (FARIA et al., 2009).

2.5.1.3 Produção de substâncias antibacterianas e enzimas

Segundo Silvia et al., 2007, diversos microrganismos probióticos apresentam atividade competidora contra espécies patogênicas por meio da síntese de compostos antimicrobianos como: bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, ácido lático e acético. Bacteriocinas são substâncias antibióticas e proteicas de ação local, que inibem o crescimento de patógenos na flora intestinal e não afetam as células produtoras do intestino. São produzidas por bactérias que mesmo em baixas concentrações são capazes de inibir a multiplicação de outras bactérias (RILEY, 1998; HENG et al., 2007). A produção de ácidos orgânicos, bem como a produção dos ácidos láticos e acéticos pelas bactérias utilizadas como probióticos, reduz o pH do trato gastrointestinal inibindo o crescimento de diversas cepas de bactérias patogênicas (GARCIA et al., 2006).

2.5.1.4 Estimulo ao sistema imunitário

Os mecanismos envolvidos na utilização de probióticos e na resposta imune frente aos estímulos que eles podem proporcionar, ainda não foram bem definidos em peixes. Órgão, tecidos linfóides, moléculas e diversas células, formam a centelha da resposta imune, contudo as respostas imunológicas se associam a dois fatores principais: via de inoculação e dosagem inoculada (ABBAS et al., 2000; ROMBOUT, et., al. 2010).

Em peixes teleósteos, são descritos Linfócitos intra-epiteliais positivos pra determinantes celulares CD3- ϵ + e CD8- α + (células T citotóxicas), essas células podem estar envolvidas na resposta imunológica, assim como, na resposta imune das mucosas intestinais em peixes. O aparecimento precoce das células T sugere que o intestino seja um local de diferenciação destas células. Outras células, a exemplo dos eosinófilos, células B, basófilos e células epiteliais, estão envolvidas na resposta imune da mucosa intestinal a patógenos, essas são descritas em

quadros de enterites, exercendo um papel fundamental neste exemplo de inflamação (CAIN, et. al., 2000; ROMBOUT, et., al. 2010).

A primeira das respostas imune em peixes, ligadas à mucosa intestinal, foi descrita após a detecção de anticorpos na mucosa de animais imunoestimulados por imersão e via oral (LOBB, 1981). Respostas sobre a imunidade em peixes, relacionadas às vias de inoculação, órgãos e tecidos linfóides, afinidade dos anticorpos produzidos, perfil hematológico, produção de anticorpos e células intestinais frente aos estímulos com imunoestimulantes a exemplo de probióticos ainda são escassos, havendo a necessidades de aprofundamento nos estudos da dinâmica das respostas imunes frente à resistência aos patógenos.

2.5.2 Probióticos na aquicultura

Na aquicultura, hoje, vários benefícios já são atribuídos aos probióticos. Têm-se o exemplo das bactérias do gênero *Vibrio*, estudos *in vivo* demonstraram que estas aumentaram a resistência dos animais contra ação de alguns patógenos comuns (AGUILERA-RIVERA et al., 2014; HAN et al., 2015; DHAYANITHIA et al., 2015). Estudos também demonstram um crescimento considerável para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com *Streptococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae* e seus derivados (LARA-FLORES et al., 2003; HISANO et al., 2007; ABDEL-TAWWAB et al., 2008),

Espécies de bactérias, como por exemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus toyoi* possuem uma grande vantagem quando utilizadas como probióticos, a sua habilidade em esporular, lhes conferem uma maior sobrevivência durante o trânsito estomacal (HOA et al., 2000; JUNQUEIRA et al., 2009). Já a levedura *Saccharomyces* possui vantagens por manter suas propriedades probióticas mesmo quando administrada em conjunto com antimicrobianos. (ROLFE, 2000; COPPOLA; GIL-TURNES, 2004).

2.5.2.1. Gênero *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* são as que compreendem a maior parte das espécies atualmente usadas como probióticos na aquicultura. Apesar de não fazerem parte das originadas no próprio trato gastrointestinal (autóctones), varias delas, sob adversas condições, apresentam ciclo de vida duplo, envolvendo

germinação de esporos, proliferação e re-esporulação, o que lhes permite proliferar e sobreviver no intestino de animais e no meio ambiente (HONG et al., 2005).

A capacidade de esporulação dos *Bacillus* confere-lhes maior resistência às enzimas digestivas durante o trânsito intestinal, além de conseguirem sobreviver em temperaturas elevadas, dessa forma podem ser adicionadas a ração no processo de peletização, logo após, essa ração pode ser mantidas em temperatura ambiente sem deterioração, além disso, essas bactérias se tornam resistentes ao baixo pH intestinal quando ingeridas pelos animais, o que lhes conferem uma maior sobrevivência no trato gastrointestinal (EL-RHMAN et al., 2009; CUTTING, 2011).

2.5.2.2. Gênero *Saccharomyces*

Leveduras são fungos unicelulares pertencentes à classe Ascomycetos. Elas possuem variáveis tamanhos e diversos tipos de reprodução (assexuada por brotamento ou cissiparidade e sexuada), estão largamente distribuídas no solo, superfície de folhas, frutos e no trato gastrointestinal de animais (FISHER; COOK, 2001). A composição química básica das leveduras é de 38,0 a 50,0% de proteínas; 33,0 a 46,0% de carboidratos; 3,0% de bases nitrogenadas; 1,0% de amônia; 2,0% de lipídeos e esteróis e 6,0 a 8,0% de nitrogênio (HORI, 1997).

A ação de algumas leveduras ocorre devido à estimulação de células responsáveis pela proteção do organismo. O aumento da atividade fagocítica, elevação da ativação e quantidade de linfócitos, imunoglobulina plasmática e de lisozimas, assim como o aumento da produção de anticorpos, são algumas das respostas produzidas por esses microelementos (GANNAM, 2005). Dentre a grande variedade, temos como destaque a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que é a mais amplamente comercializada.

O fungo *Saccharomyces cerevisiae* é resultante da fermentação do caldo extraído da cana de açúcar com secagem por pulverização a seco. Segundo Butolo (2002), a composição química esta sujeita a linhagem, natureza do substrato que foi utilizado, qualidade da fermentação, concentração de sais no meio, processo de secagem e condições de armazenamento. O seu alto valor nutritivo lhe traz destaque na formulação de diferentes dietas para diversas

espécies animais, inclusive organismos aquáticos. O *Saccharomyces cerevisiae* possui vantagens por manter suas propriedades probióticas mesmo quando administrada em conjunto com antimicrobianos (ROLFE, 2000; COPPOLA; GILTURNES, 2004).

2.6. Justificativa

A demanda do tambaqui no Brasil tende a crescer, esse animal apresenta um grande potencial reprodutivo e zootécnico, ele é caracterizado como um dos peixes mais produzidos no país e vem demonstrando rápida taxa de crescimento, adaptabilidade aos diversos sistemas de criação e boa aceitação pelo mercado consumidor (SILVA et al., 2007; MPA, 2011).

A utilização dos probióticos poderá ser uma ótima alternativa ao uso de antibióticos contra prevenção de doenças e profilaxia na aquicultura. O seu uso também vem evidenciando a diminuição do estresse, melhora na defesa antimicrobiana e da resposta imunitária em espécies de peixes (ALY et al., 2008;).

Estudos com utilização de probióticos na aquicultura estão em grande ascensão. A interpretação dos benefícios da suplementação ainda é difícil, visto que ainda não estão bem evidenciados, isso devido a grande complexidade dos diversos fatores que podem afetar o desempenho e imunologia dos animais, assim como, as diferenciações no ambiente onde os animais são cultivados, o que pode vir a mascarar as ações dos probióticos. Ainda se vê a grande necessidade de maiores estudos para propiciar um maior e melhor entendimento das ações que os probióticos inferem na aquicultura. Resultados positivos da aplicação desses aditivos podem vir a conceber excelentes ferramentas para problemas econômicos, produtivos, sanitários e ambientais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000.

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A.M.; ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 280, p.185–189, 2008.

AGNEW, W.; BARNES, A.C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiolog**, v.122, p. 1–15, 2007.

AGUILERA-RIVERA D.; PRIETO-DAVÓ, A.; ESCALANTE, K.; CHÁVEZ, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G. Probiotic effect of FLOC on Vibrios in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 424–425, 20, p. 215-219, 2014.

ALBUQUERQUE, D. M.; MARENGONI, N.M.; BOSCOLO, W.R.; RIBEIRO, R.P.; MAHL, I.; MOURA, M.C. Probiotics in diets for Nile tilapia during the sex reversal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 8, p.1503-1508, 2013ALY, S.M.;

AHMED, Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, p. 128-136, 2008.

AYDIN, K.Y; MCFARLANE, G.A; KING, J.R; MEGREY, B.A; MYERS, K.W. LINKING oceanic food webs to coastal production and growth rates of Pacific salmon (*Oncorhynchus spp.*), using models on three scales. **Deep-Sea Research II**, v. 52, p. 757–780, 2005.

BALLUS C A.; KLAJN, V.R.; CUNHA, M.F.; OLIVEIRA, M.L.; FIORENTINI, A.M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.28, n. 1, p.85-96, 2010.

BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; SILVA, B.C.; MOURINO, J.L.P.; ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.4, 2011.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; MOTTA, A.C.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; SILVA, L.B. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Bololetim do Intituto de Pesca**, v. 34, n.3, p. 355 – 363, 2008.

BELO M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADO, E.J.R; MORAES, J.R.E; SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high

stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture**, v. 422–423, 20, p. 124–128, 2014.

BOIJINK, C.L.; MIRANDAB, W.S.C.; CHAGAS, E.C. DAIRIKI, J. K.; INOUE L. A. K. A. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. **Aquaculture**, V. 438, p. 138–140, 2015.

BRASIL, PORTARIA nº 145/98, de outubro de 1998, Art. 3º

BUSANELLO, M.; POZZA, M.S.S.; BARROS, P.C.; CHAMBO, A.P.S.; ECKSTEIN, I.I. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. **Scientia Agraria Paranaensis**, V.11, n. 4, p.14-24, 2012.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 1.ed. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 430p. 2002.

CAIN, K.D.; JONES, D.R.; RAISON, R.L.Characterization of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 651-666, 2000.

CARDOSO, R.S. **Caracterização da Aquicultura no Estado do Amazonas**. Monografia de Graduação. Departamento de Ciências Pesqueiras–FCA/UFAM, Manaus, p. 30, 2001.

CARVALHO, M. C. **Alimentação do tambaqui jovem (*Colossoma macropomum*) e suas relações com a comunidade zooplanctônica do lago Grande-Manaquiri-Solimões-AM**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Fundação Universidade Federal do Amazonas, Manaus, p. 91, 1981.

CHAGAS E. C.; PILARSKI, F.; SAKAB, R. e MORAES F. R. Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com β -glucano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.899-905, 2013.

CHAN, M. S., JOLLEY, K. ***Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus* GBS) MLST Database**. Disponível em: <<http://pubmlst.org/sagalactiae/>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

CHEN J.; ZHU, N.; KONG, L.; BEI, Y.; ZHENG, T.; DING, X.; HE, Z. First reported fatal *Bacillus thuringiensis* infections in Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*). **Aquaculture**, v. 428–429, p. 16-20, 2014.

COPPOLA, M. M ; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciencia Rural**, v. 34, n. 4, Santa Maria , 2004.

CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, V 28: p. 214-220, 2011.

DHAYANITHIA, N.B.; AJITHKUMARA, T.T.; AROCKIARAJB, J.; BALASUNDARAMC, J.; RAMASAMY, H. Immune protection by *Rhizophora*

apiculata in clownfish against *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v. 446, p. 1–6, 2015.

DANIELS, C.L.; MERRIFIELD, D.L.; RINGØ, E.; DAVIES, S.J. Probiotic, prebiotic and synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture. **Aquaculture**, v.416–417, p. 396-406, 2013,

DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C. F.; BORDON, I. C. A. C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. **Journal of Applied Ichthyology**, V. 28, p. 40-45, 2012.

DIAS, M. K. R.; NEVES, R. L.; MARINHO, R. G. B.; PINHEIRO, D. A.; TAVARES-DIAS, M. Parasitism in tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, *Characidae*) farmed in the Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 45(2), p. 231 – 238, 2015.

EL-RHMAN, A.M.A.; KHATTAB, Y.A.E.; SHALABY, A.M.E.. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the grown performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, p. 175-180, 2009.

FARIA D.E.; HENRIQUE A.P.F.; NETO F.R.; MEDEIROS A.A.; JUNQUEIRA O.M.; FILHO F.D.E. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de Crescimento para frangos de corte: Probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, V. 10, p. 18-28, 2009.

FERREIRA, A. P.; FERREIRA, C. S. A. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: SIMPÓSIO BRASIL SULDE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó. **Anais...** Chapecó, p. 56 -69, 2006.

FISHER, F.; COOK, N. B. *Micologia: Fundamentos e Diagnóstico*. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2001.

FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G.M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoccefalite e infecção sistêmica em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; MIAN, G. F.; GODOY, D. T.. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. **Panorama da Aquicultura**, v. 19, n. 103, p. 36-38, set./ out. 2007.

FIGUEIREDO H C P; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revisza Brasileira de Zootecnia**, v.37, suplemento especial, p.08-14, 2008.

FIÚZA L. S.; ARAGÃO N. M.; JUNIOR, H. P. R. et al., Effects of salinity on the growth, survival, haematological parameters and osmoregulation of tambaqui *Colossoma macropomum* juveniles. **Aquaculture Research**, v. 46, Issue Supplement S1, p. 1–9, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges.** Rome, 2014.

FÜLLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 6, p.365-378, 1989.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú, p.6-28, 2004.

GANNAM, A. Immunostimulants in fish diets. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, Botucatu. **Anais...** Botucatu, p.93-102, 2005.

GARCIA, R. G.; ARIKI, J.; MORAES, V.M.B.; KRONKA, S.N.; BORGES, S.A.; MURATA, L.S.; CAMPOS, V.A. Ação isolada ou combinada de ácidos orgânicos e promotor de crescimento em rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, 28 n.2, p.149-154, 2006.

GONÇALVES, B. Rede Cheia. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**, 2014, p.43.

GOULDING, M.; CARVALHO M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, *Characidae*) in important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 1, n. 2, p. 107-103, 1982.

HAN J. E.; TANG, K.F.J.; PANTOJA, C.R.; WHITE, B.L.; LIGHTNER, D.V. qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 442, p- 12-15, 2015.

HENG, N.C.; BURTENSHAW, G.A.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7763–7766, 2007.

HISANO, H.; BARROS, M. M; PEZZATO, L. E. Levedura e zinco como pró-nutrientes para tilápia-donilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2007.

HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p. 5241-5247, 2000.

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS. Microbiology Reviews**, n.29, p.813-835, 2005.

HORI, J. Tecnologia da produção de levedura desidratada visando a qualidade do produto final. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Anais...** CBNA, Campinas, p.7-25. 1997.

HUANG, L.; RAN, C.; HE, S. Et al. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* culture or live cells with *Bacillus amyloliquefaciens* spores on growth performance, gut mucosal morphology, hsp70 gene expression, and disease resistance of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 438, p. 33–38, 2015.

JHA, D.K.; BHUJEL, R.C.; ANAL, A.K. Dietary supplementation of probiotics improves survival and growth of Rohu (*Labeo rohita* Ham.) hatchlings and fry in outdoor tanks. **Aquaculture**, v. 435, p. 475–479, 2015.

JUNQUEIRA, O. M.; BARBOSA, L.C.G.S.; PEREIRA, A.A.; ARAÚJO, L.F.; NETO, M.G.; PINTO, M.F. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche, crescimento e terminação. **Revisza Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, 2009.

KUBITZA, F. Tambaqui, pacu e híbridos: Uma revista pra lá de completa de todo manejo. **Panorama da aquicultura**, v.14, n.82, p.27, 2004.

KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. **Panorama da aquicultura**, v.15, n.89, p.15-23, 2005.

KUBITZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da aquicultura**, v.21, n.124, p.10-19, 2011.

LARA-FLORES, M.; OLVERANOVOA, M.A.; GUZMA-MENDEZ B.E.; LOPEZ-MADRID, W. Use of the 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, 2003.

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

LOBB, C.J; CLEM, L.W. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum cutaneous musus and bile. **The Journal of Immunology**, v. 127, p. 1525 - 1529, 1981.

MACARI, M. FURLAN, R.L. Probióticos. Conferencia APINCO, Santos, **Anais... Santos, FACTA2005**. p. 53-68, 2005.

MARAN, B. A.; MOON S.Y.; OHTSUKA S.; OH, S.Y.; SOH, H.Y.; MYOUNG, J.G.; IGLIKOWSKA A.; BOXSHALL G.A. The caligid life cycle: new evidence from *Lepeophtheirus elegans* reconciles the cycles of *Caligus* and *Lepeophtheirus* (Copepoda: Caligidae). **Parasite**, v. 20, p. 15. 2013.

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.M.B.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR, G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Jornal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 631–637, 2008.

MARTINS, W. Rede Cheia. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. p.28, 2014.

MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E.; BORGES, S.A.; BOLELI, I.C.; MACARI M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.487-490, 2000.

MELLO H. ***Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito probiótico.** Dissertação de Mestrado. P-5, Jaboticabal – São Paulo, 2012.

MELLO H.; MORAES, J.R.E.; NIZA, I.G.; MORAES, F.R.; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; FILHO, J.R.E.; CLAUDIANO, G.S. Beneficial effects of probiotics on the intestine of juvenile Nile tilapia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n. 6, 2013.

MIAN, G. F.; GODOY, D.T.; LEAL, C.A.; YUHARA, T.Y.; COSTA, G.M.; FIGUEIREDO, H.C. Aspects of the natural history and virulence of *S. Agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, London, v. 136, n. 1/2, p. 180-183, Apr. 2009.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Potencial brasileiro. Publicado 18 de Junho de 2014. <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 12 de jan. de 2015.

NUNES, C.S. **Crescimento, hematologia e metabolismo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao exercício aeróbico e alimentado com níveis crescentes de proteínas.** Tese de doutorado, Interinstitucional de Pós-graduação e Ciências Fisiológicas (PIPGCF UFSCar- UNESP), São Carlos-SP, 2011.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

OLIVARES-FUSTER, O.; KLESIOUS, P. H.; EVANS, J.; ARIAS, C. R. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, V. 31, p. 277-83, 2008.

PANT N.; MARCOTTE H.; BRÜSSOW H., SVENSSON L.; HAMMARSTRÖM L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 86, p. 1-9, 2007.

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

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2.ed. Maringá: Eduem, p. 305, 2002.

PINHEIRO, Adão. Rede Cheia. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. p.13-14, 2014.

PULIDO E. A., IREGUI C. A. In situ hybridization technique for *Streptococcus agalactiae* detection in tilapia tissues (*Oreochromis sp.*). **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1 Bogotá. 2010.

RAMÍREZ L A G.; OTÁLVARO E.V.A. Determination of the in vitro bactericide potential of a native isolated of *Lactobacillus casei* against *E. coli*. **Revista Lasallista Investig**, v. 5, n. 2, Caldas, 2008.

RESENDE, E. K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.52-57, 2009 (supl. especial).

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocins evolution. **Annals in Reviewed Genetic**, v. 32, p. 255-278, 1998.

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, n.2, p. 396-402, 2000.

ROMBOUT, J. H. W. M; VAN DE WAL, J.W; COMPANJEN, A; TAVERNE, N; TAVERNE-THIELE, J.J. Characterization of T cell lineage marker in carp, *Cyprinus carpio* L. **Developmental and Comparative Immunology**, v.21, p. 35 – 46, 2010

RUTZ, F.; LIMA, G.J.M.M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS - ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, v. 1, 2001.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E. de; MORAES, F.R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, p. 235-241, 2012.

SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. F.. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v.1, n.2, p.26-38, 2011.

SCHLUNDT, J. “**Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.**” Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO / WHO. Acesso: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Visitado em 15 de fev. 2015.

SHARIFUZZAMAN, S.M.; AL-HARBI, A.H.; AUSTIN, B. Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout

fed probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2. **Aquaculture**, v. 418–419, p. 55-61, 2014.

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

SILVA, C.A.; BRIDI, A.M.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H.; SILVA, C.R.B.; MENEGUCCI, C.G.; CARVALHO, B.B. Uso de probiótico e de antibióticos na alimentação de leitões em fase de creche. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 739 – 746, 2007.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 157-164, 2007.

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

TAKAHASHI, S.; EGAWA, Y.; SIMOJO, N.; TSUKAHARA, T., USHIDA, K. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.53, n.6, p.325-332, 2007.

TAVARES, G. C.; PALHARES, M. M.. Epidemiologia, diagnóstico e controle das principais bacterioses que afetam a tilapicultura no Brasil. **Revista veterinária e zootecnia em Minas**. Ano XXI, Jul./ago./set. 2011.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. 1ªed. Ribeirão Preto: FMRP, p. 131, 2004.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, R.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 969-981, 2007.

UZUN E.; OGUT H. The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. **Aquaculture**, v. 437, p. 30–37, 2015.

Val, A.L.; Honczaryk, A. **Criando peixe na Amazônia**. Manaus: INPA. 160p, 1995.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v.33, p.107-114, 1998.

VANEGAS M. C.; GONZÁLEZ, L.M.; ARÉVALO, S.A.. Antibiotic activity of *Bifidobacterium sp.* isolated from breast milk and newborn faeces, against the main causes for foodborne illnesses. **Infectio**, v.14, n. 4, p. 241–247, 2010.

VENMATHI MARAN, B.A.; YONG MOON S.; OHTSUKA S.; Oh S-Y.; SOH H.Y.; MYOUNG J., IGLIKOWSKA A.; BOXSHALI G.A. The caligid life cycle: new evidence from *Lepeophtheirus elegans* reconciles the cycles of *Caligus* and *Lepeophtheirus* (Copepoda: Caligidae). **Parasite**, v. 20, p. 15, 2013.

ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M. N. A.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red tilapia (*Oreochromis spp*) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2/3, p. 227-229, 2010.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE PROBIÓTICOS NO CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO CORPÓREA DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

1 **EFEITO DE PROBIÓTICOS NO CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO CORPÓREA**
2 **DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

3 **Resumo:** Probióticos são ótimas alternativas para o uso de antibióticos na
4 aquicultura. Eles têm sido utilizados nas dietas de organismos aquáticos, visando
5 aumentar a resistência, sobrevivência, imunidade, desempenho, dentre outros
6 parâmetros fisiológicos. Diante da perspectiva de melhoras nos índices
7 zootécnico e imunológicos dos animais de cultivo, hoje, buscam-se alternativas
8 para o uso de antimicrobianos no controle de enfermidades na piscicultura. O
9 objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dois probióticos (*Bacillus subtilis*
10 10^9 UFC/g e *Saccharomyces cerevisiae* 10^9 UFC/g) sobre o desempenho
11 zootécnico produtivo e composição bromatológica de juvenis de Tambaqui
12 (*Colossoma macropomum*). A inclusão dos aditivos probióticos *B. subtilis* e *S.*
13 *cerevisiae* não afetou o desempenho produtivo e composição corpórea dos
14 animais alimentados durante 90 dias.

15
16 **Palavras chave:** Aquicultura, desempenho zootécnico, bromatologia.

17
18
19 **PROBIOTIC EFFECT ON GROWTH AND BODY COMPOSITION OF**
20 **TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

21 **Abstract:** Probiotics are great alternatives to stop the use of antibiotics in
22 aquaculture. They have been used in the diets of aquatic organisms, to increase
23 resistance, survival, immunity, performance, among other physiological
24 parameters. Faced with the prospect of improvements in zootechnical and
25 immunological indexes on farming animals, nowadays, alternative to the use of
26 antimicrobials in controlling diseases in fish farming are sought. The aim of this
27 study was to evaluate the effect of two probiotic (*Bacillus subtilis* 10^9 UFC/g and
28 *Saccharomyces cerevisiae* 10^9 UFC/g) on the productive growth performance and
29 chemical composition of juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*). The
30 inclusion of probiotics additives *B. subtilis* and *S. cerevisiae* did not affect growth
31 performance and body composition of animals fed for 90 days.

32 **Keywords:** Aquaculture, production performance, bromatology.

33 1. INTRODUÇÃO

34 Para uma melhor nutrição, crescimento e imunidade, hoje são utilizados
35 diversos incrementos na alimentação de animais aquáticos. O uso de aditivos em
36 dietas favorece ganho de peso, conversão alimentar e taxa de crescimento
37 específico em diversas espécies de peixes (REQUE et al., 2010; SALVADOR et
38 al., 2013).

39 Probióticos têm sido utilizados das dietas de organismos aquáticos visando
40 aumentar a resistência, sobrevivência, imunidade, desempenho, dentre outros
41 parâmetros fisiológicos dos animais (BURR et al., 2010; TALPUR et al., 2014;
42 FUCHS et al., 2015) a exemplo de alguns probióticos como *Bacillus*,
43 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Enterococcus sp.*,
44 (FUCHS et al., 2015; HUANG et. Al., 20115; OZORIO, 2015). As espécies
45 *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente usadas como
46 probióticos, assim como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria
47 *Bacillus subtilis* (HISANO et al. 2007; DIAS et al., 2010; YEMPITA EFENDI;
48 YUSRA , 2014; HUANG et al., 2015).

49 Sheikhzadeh et al. (2012) verificaram que o desempenho produtivo e
50 parâmetros imunes não específicos dos animais melhoraram significativamente
51 ao utilizar *S. cerevisiae* como aditivo em rações para truta arco-íris
52 (*Oncorhynchus mykiss*). Fuchs et al. (2015), verificaram melhoria na performance
53 de juvenis de turbot (*Scophthalmus maximus*) alimentados com rações contendo
54 β -glicanos (derivado de parede celular da *S. cerevisiae*), *Bacillus subtilis* dentre
55 outros. Também, alguns probióticos e seus derivados como levedura autolisada
56 ou parede celular, favoreceram o ganho de peso, consumo de ração e taxa de
57 crescimento específico (GOPALAKANNAN; ARUL, 2010; SHEIKHZADEH et al.,
58 2015; PLAIPETCH; YAKUPITIYAGE, 2014). O mesmo efeito foi observado por
59 Zhou et al. (2009) quando administrou *Bacillus subtilis* na água de cultivo da
60 tilápia do Nilo, os animais obtiveram maior crescimento e melhores parâmetros
61 imunológicos. Outros exemplos relatam dietas contendo nucleotídeos resultando
62 melhor ganho de peso, contudo, estas respostas podem variar em função da
63 espécie, metodologia de administração, duração da administração, temperatura
64 ambiental e quantidade de suplemento incorporado na dieta (MEHRIM, 2009;
65 GHAEDI et al., 2015).

66 Diante da perspectiva de melhoras no índice zootécnico e imunológicos
67 dos animais de cultivo, hoje, buscam-se alternativas para o uso de
68 antimicrobianos no controle de enfermidades na piscicultura. O incremento
69 probiótico em dietas de peixes é uma ótima alternativa para o controle de
70 patógenos na piscicultura, esses, além de agir no incremento imunológico não
71 específico, também podem vir a contribuir para o benéfico desenvolvimento
72 bacteriano no trato gastrointestinal, reduzindo o crescimento das bactérias
73 patogênicas, melhorando o aproveitamento dos nutrientes das dietas.

74 O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dois probióticos
75 (*Bacillus subtilis* 10⁹UFC/g e *Saccharomyces cerevisiae* 10⁹UFC/g) sobre o
76 desempenho zootécnico produtivo e composições bromatológicas da carcaça de
77 juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em laboratório com ambiente
78 controlado.

79

80 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

81 O experimento foi conduzido no laboratório do Núcleo de Aquicultura e
82 Pesca (NUCAP) situado na Unidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB),
83 Cruz das Almas - Bahia.

84

85 **2.1. Amostras**

86 Foram utilizados 108 juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*)
87 provenientes da Estação de piscicultura da Barragem Pedra do Cavalo, Rodovia
88 101, Km 12, município de Cachoeira - BA. Os peixes foram transportados em
89 sacos plásticos limpos até as instalações do NUCAP onde foram distribuídos
90 aleatoriamente nos 12 tanques.

91

92 **2.2. Delineamento experimental**

93 Os animais utilizados (108 juvenis) possuíam peso inicial médio de
94 2,13±0,75g e comprimento inicial de 3,46±0,43cm. Eles passaram por um período
95 de aclimatação de cinco dias e foram alimentados com dieta comercial sem
96 probiótico (35% de proteína). Durante esse período, a alimentação foi fornecida
97 diariamente, três vezes ao dia (8h, 14h e 19h). Antes de iniciar o experimento, os

98 peixes permaneceram em jejum por um período de 48h para limpeza do sistema
99 gastrointestinal.

100 Os animais foram submetidos à analgesia com Eugenol (65mgL^{-1})
101 (ROUBACH, 2005) até a perda do equilíbrio para facilitar o manejo e evitar
102 possíveis danos físicos. Em seguida, pesados e medidos com o auxílio de
103 balança eletrônica e paquímetro e distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com
104 volume útil de 100L (9 animais por tanque). O sistema possuía temperatura
105 controlada por termostato e recirculação constante com filtragem mecânica e
106 biológica.

107 O período experimental foi de 90 dias e o delineamento inteiramente
108 casualizado, composto por três tratamentos e quatro repetições. Foi considerada
109 como unidade experimental, cada tanque com volume útil de 100L contendo nove
110 juvenis de Tambaqui.

111

112 **2.3. Dieta**

113 (verificar a quantidade e se tem pra tambaqui) Avaliaram-se três dietas
114 experimentais ou tratamentos: T1= dieta controle isenta de probiótico, T2= dieta
115 controle + 2g de probiótico / kg de ração (*Bacillus subtilis* 10^9UFC/g) e T3= dieta
116 controle + 2 g do probiótico / kg de ração (*Saccharomyces cerevisiae* 10^9UFC/g).
117 A dieta comercial (35% PB, 5% EE, cinzas e 13%, umidade) foi adquirida da
118 empresa Pratigi alimentos, Castro Alves, Brasil. Os probióticos comerciais foram
119 adquiridos na fábrica de rações Exato, situada na cidade de Santo Antônio de
120 Jesus-Ba e foram incorporados às rações por meio de um veículo oleoso (2% de
121 óleo de soja) de acordo com metodologia descrita por Dias et al. (2011) e
122 Nakandakare et al. (2013) (o probiótico foi diluído no óleo e misturado na ração), a
123 dieta controle também recebeu 2% de óleo de soja para não diferir das demais
124 dietas.

125 **2.4. Monitoramento da qualidade da água**

126 O monitoramento da qualidade da água foi realizado quinzenalmente, onde foi
127 avaliada a temperatura da água, concentração de oxigênio dissolvido com
128 oxímetro, o potencial hidrogeniônico com pHmetro digital. Os parâmetros de
129 qualidade da água foram $30,20 \pm 0,8^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,96 \pm 0,28$, oxigênio dissolvido =
130 $7,96 \pm 2,48 \text{mgL}^{-1}$. A qualidade da água permaneceu dentro dos padrões

131 recomendados para a criação de peixes de clima tropical (SIPAÚBA-TAVARES,
132 L.H, 1995).

133

134 **2.5. Desempenho zootécnico**

135 Para as análises de desempenho zootécnico, realizaram-se biometrias
136 quinzenalmente até o final do período experimental. Antes de cada biometria, os
137 animais foram analgésicos para facilitar o manejo e evitar possíveis danos
138 físicos.

139 Os seguintes parâmetros zootécnicos foram mensurados:

140 a) Comprimento (C) = Comprimento total;

141 b) Ganho em peso (GP) = Peso final - Peso Inicial;

142 c) Conversão Alimentar Aparente (CAA) = Consumo de ração / Ganho em peso;

143 d) Taxa de sobrevivência (TS) = (nº final de peixes / nº inicial de peixes)x100;

144

145 Ao final do período experimental os animais foram analgésicos e
146 submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico sem nenhum
147 tipo de dano. As carcaças dos animais foram separadas para fazer as análises
148 bromatológicas.

149

150 **2.6. Análises bromatológicas**

151 Para medir os efeitos dos tratamentos sobre a composição corporal dos
152 animais experimentais, as carcaças foram moídas com a utilização de um moedor
153 mecânico até obter-se uma polpa homogênea. Logo após a amostra foi seca em
154 estufa a 60°C por 48 horas e moídas em moinho bola. As análises da composição
155 química bromatológica das carcaças foram realizadas no laboratório de
156 bromatologia da pós-graduação da UFRB segundo metodologia descrita pela
157 AOAC (1997).

158

159 **2.7. Análises estatísticas**

160 Para resultados dos índices zootécnicos e composição corporal
161 primeiramente foram feitos testes de normalidade utilizando Shapiro Wilk
162 ($p \leq 0,05$), em seguida os dados foram analisados em GLM (Modelos Lineares
163 Generalizados). Quando encontrados efeitos significativos, foram realizados

164 testes de média para as comparações múltiplas pelo método de Bonferroni com
165 5% de probabilidade. O Software utilizado na presente análise foi o SPSS 18.0.

166

167 3. RESULTADOS

168 O desempenho produtivo dos animais alimentados com as dietas
169 experimentais não apresentou diferenças para as variáveis de peso e
170 comprimento (Tabela 2). A conversão alimentar aparente e sobrevivência também
171 não apresentaram diferenças entre os diferentes tratamentos avaliados neste
172 estudo.

173

Tabela 2: Parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a dietas suplementadas com probióticos.

Parâmetros	T0 (Grupo Controle)	T1 (<i>B. subtilis</i>)	T2 (<i>S. cerevisiae</i>)
Comprimento Médio Inicial (cm)	3,76 ± 0,42	3,76 ± 0,43	3,76 ± 0,40
Comprimento Médio Final (cm)	12,7 ± 3,25	13,1 ± 1,13	13,29 ± 1,16
Peso Médio Inicial (cm)	2,14 ± 0,72	2,13 ± 0,75	2,13 ± 0,73
Peso Médio Final (cm)	69,27 ± 12	74,14 ± 9,92	79,89 ± 3,29
Ganho Médio de Peso (g)	67,13 ± 11,28	72,01 ± 9,17	77,76 ± 2,56
Conversão Alimentar Aparente	2,63	2,19	2,39
Taxa de sobrevivência (%)	100	100	97,22

174

175

176 Similar ao que foi observado para as variáveis de desempenho produtivo, as
177 variáveis mensuradas para composição bromatológica das carcaças dos juvenis
178 de tambaquis não demonstraram diferenças após realização da análise de
179 variância. Os valores dos achados no presente experimento para composição
180 bromatológica estão expressos na tabela 3.

181

Tabela 3: Parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a dietas suplementadas com probióticos.

Parâmetros	T0 (Grupo Controle)	T1 (<i>B. subtilis</i>)	T2 (<i>S. cerevisiae</i>)
Comprimento Médio Inicial (cm)	3,76 ± 0,42	3,76 ± 0,43	3,76 ± 0,40
Comprimento Médio Final (cm)	12,7 ± 3,25	13,1 ± 1,13	13,29 ± 1,16
Peso Médio Inicial (cm)	2,14 ± 0,72	2,13 ± 0,75	2,13 ± 0,73
Peso Médio Final (cm)	69,27 ± 12	74,14 ± 9,92	79,89 ± 3,29
Ganho Médio de Peso (g)	67,13 ± 11,28	72,01 ± 9,17	77,76 ± 2,56
Conversão Alimentar Aparente	2,63	2,19	2,39
Taxa de sobrevivência (%)	100	100	97,22

182 4. DISCUSSÃO

183 O tempo de administração dos aditivos suplementares para o alcance de
184 adequadas respostas no desempenho produtivo e imunológico em peixes, ainda
185 não está elucidado. A eficácia da suplementação por períodos curtos ou
186 prolongados ainda traz muitas dúvidas.

187 No presente estudo, a suplementação com *S. cerevisiae* e *B. subtilis* em
188 condições laboratoriais não exerceu influência sobre os parâmetros avaliados de
189 desempenho produtivo (Comprimento, peso médio, ganho de peso, conversão
190 alimentar e taxa de sobrevivência). Resultados semelhantes foram encontrados
191 por NAKANDAKARE (2010) e CARVALHO et al. (2011), os quais forneceram
192 dietas suplementadas com *B. subtilis* para juvenis de tilápias do Nilo em um
193 período de 63 dias e 70 dias respectivamente. Outras investigações também não
194 puderam confirmar um desempenho positivo de aditivos em outras espécies de
195 peixes. Chagas (2013) e Falcon (2007) verificaram que a suplementação com β -
196 glucano (derivado da *S. cerevisiae*) durante 60 dias não exerceu influência sobre
197 o desempenho produtivo de tambaquis e tilápias do Nilo. De forma análoga, não
198 foi encontrada diferença nos parâmetros de desempenho em salmões do Atlântico
199 (*Salmo salar*) alimentados com dietas contendo monossacarídeos, (GRISDALE-
200 HELLAND; HELLAND; GATLIN, 2008). Garcia (2008) ao alimentar tilápias do Nilo
201 com β -glucano e mananoligossacarídeo não observou melhora no ganho de peso.

202 O período experimental, assim como a quantidade utilizada dos
203 probióticos, podem ser fatores relevantes quando comparado a outros trabalhos.
204 DIAS et al. (2012), observaram após 83 dias de suplementação com *Bacillus*
205 *subtilis* (5 g kg⁻¹ e 10g kg⁻¹), melhoria nos parâmetros de desempenho
206 zootécnicos para reprodutores de matrinxãs (*Brycon amazonicus*). Já SON et al.
207 (2009) observaram valores de desempenho maiores em *Epinephelus coioides*,
208 quando utilizaram dosagens superiores de probióticos. Da mesma forma, maior
209 desempenho, foi relatado em carpa (*Cyprinus carpio*) e snakehead (*Channa*
210 *striata*) alimentadas com dieta contendo β -(1,3) (1,6)-D-glucan e níveis de 10 e 20
211 g kg⁻¹ de levedura b-glucana respectivamente (KÜHLWEIN et al., 2014, TALPUR
212 et al., 2014).

213 Dessa forma, é possível observar uma vasta variação de resultados na
214 literatura quanto ao desempenho dos animais. Essa variação de resultados pode

215 ser devido a vários aspectos, como por exemplo, a proliferação e função do
216 probiótico no trato digestivo do hospedeiro, ou então, devido a diferenças
217 interespecíficas individuais e de espécie para espécie (MEHRIM, 2009).

218 Após análises bromatológicas, foi constatado que não houve alterações
219 significativas ($p \geq 0,05$) nos parâmetros corporais dos tambaquis experimentados.
220 Os resultados do presente estudo se assemelham aos encontrados por
221 Mendonça et al. (2011) e Junior et al. (2013), ao não encontrarem diferenças
222 significativas nos valores dos parâmetros corporais em tambaquis alimentados
223 com rações contendo 28% de proteína e submetidos a diferentes fotoperíodos e
224 tambaquis alimentados com dietas contendo farinha de folhas de leucena
225 respectivamente. Os achados também corroboram com MERRIFIELD et al.
226 (2010) e Ramos et al. (2015), que suplementaram trutas arco-íris com
227 probióticos, a exemplo de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp., porém divergem dos
228 achados de Silva et al. (2003) e Campeche et al. (2014), ao encontrar diferenças
229 significativas nesses parâmetros para tambaquis alimentados com rações
230 contendo farelo de licurí. Os achados das análises bromatológicas demonstraram
231 que os probióticos não influenciaram na composição corpórea dos tambaquis
232 alimentados durante 90 dias.

233 Diferentes respostas em estudos de parâmetros produtivos podem ser
234 observadas quando se utilizam probióticos, isso também pode se atribuir às
235 diferentes condições experimentais utilizadas nos diversos estudos. Animais
236 aquáticos são totalmente susceptíveis ao meio em que vivem. A constante
237 interação com esse meio pode resultar em uma maior dependência dos fatores
238 ambientais, como por exemplo, a quantidade de oxigênio dissolvido, temperatura,
239 pH e microflora ambiental, além da proliferação e função do probiótico no trato
240 digestivo do hospedeiro (DAS et al., 2008; MEHRIM, 2009). Também devem ser
241 consideradas as diferenças interespecíficas, pois aos aspectos fisiológicos
242 diferem de espécie para espécie.

243

244

245

246

247

248 5. CONCLUSÕES

249 As suplementações com os probióticos testados durante o período de 90
250 dias não influenciaram no desempenho zootécnico nem na composição corpórea
251 dos tambaquis. Os resultados obtidos neste estudo poderão ser utilizados como
252 referência para a espécie *Colossoma macropomum* com utilização de suplemento
253 alimentar na composição da dieta.

254

255 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

256 ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A.M.; ISMAEL, N.E.M. Evaluation of
257 commercial live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and
258 immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ
259 with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture** v. 280, p. 185–189, 2008.

260

261 AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official**
262 **methods of analysis of AOAC International**. 16 ed. Gaitheersburg: AOAC,
263 1997.

264

265 BURR, G.; HUME, M.; RICKE, S.; NISBET, D.; GATLIN, D. Vitro and In Vivo
266 Evaluation of the Prebiotics GroBiotic®-A, Inulin, annanologosaccharide, and
267 Galactooligosaccharide on the Digestive Microbiota and Performance of Hybrid
268 Striped Bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) .**Microbiologia e Ecologia**,
269 v.59, p.187–198, 2010.

270

271 CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; COSTA, D.S.P.; MOREIRA, E.L.T.; PINTO, L.F.B.;
272 ABREU, R.D.; ALBINATI, R.C.B. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal
273 de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou
274 mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12,
275 n. 1, p.176-187, 2011.

276

277 CHAGAS E. C.; PILARSKI, F.; SAKAB, R. e MORAES F. R. Desempenho
278 produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração
279 suplementada com β -glucano. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.48,
280 n.8, p.899-905, 2013.

281

282 DAS, S.; WARD, L.R.; BURKE, C. Prospects of using marine actinobacteria as
283 probiotics in aquaculture. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 81, p. 419–429, 2008.

284

285

286 DIAS, D.C.; STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA,
287 M.J.T.; SANTOS, A.A. Haematologic and immunologic parameters of
288 bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotic. **Aquaculture Research**. v. 41, n.
289 7, p. 1064–1071, 2010.

290

291 DIAS, D.C.; FURLANETO, F.P.B.; AYROZA, L.M.S.; TACHIBANA, L.;
292 LEONARDO, A.F.V.; CORRÊA, C.F.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.

- 293 Utilização de probiótico na dieta de reprodutoras de matrinxã (*Brycon*
294 *amazonicus*). **Bolletim do Instituto de Pesca**, v.37, n. 2, p.135 – 141, 2011.
- 295
- 296 DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C. F.; BORDON, I.
297 C. A. C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Effect of incorporating
298 probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. **Journal of**
299 **Applied Ichthyology**, V. 28, p. 40-45, 2012.
- 300
- 301 FALCON, D.R. **Nível de suplementação de 1,3 β-glucano e vitamina C em**
302 **dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros**
303 **fisiopatológicos**. 2007. 146p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual
304 Paulista, Jaboticabal.
- 305
- 306 FUCHS V.I.; SCHMIDT, J.; SLATER, M.J.; ZENTEKC, J.; BUCK, B.H.;
307 STEINHAGEN, D. The effect of supplementation with polysaccharides,
308 nucleotides, acidifiers and *Bacillus strains* in fish meal and soy bean based diets
309 on growth performance in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**,
310 v. 437, p. 243–251, 2015.
- 311
- 312 GARCIA, F. **Suplementação alimentar com β-glucano e**
313 **mananoligossacarídeo para tilápias do Nilo em tanques-rede**. 2008. 100 p.
314 Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual
315 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.
- 316
- 317 GHAEDI, G.; KEYVANSHOKOOH, S.; AZARM, H.M.; AKHLAGHI, M. Effects of
318 dietary β-glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout
319 (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 441, p.78–83, 2015.
- 320
- 321 GOPALAKANNAN, A.; VENKATESAN, A. Enhancement of the innate immune
322 system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of
323 b-glucan and whole cell yeast. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 884-892, 2010.
- 324
- 325 GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J.; GATLIN III, D.M. The effects of dietary
326 supplementation with mannanoligosaccharides, fructooligosaccharide on the
327 growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Oxford,
328 v. 283, p. 163-137, 2008.
- 329
- 330 HISANO, H.; BARROS, M. M; PEZZATO, L. E. Levedura e zinco como pró-
331 nutrientes para tilápia-donilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos.
332 **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2007.
- 333
- 334 HUANG, L.; RAN, C.; HE, S. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* culture
335 or live cells with *Bacillus amyloliquefaciens* spores on growth performance, gut
336 mucosal morphology, hsp70 gene expression, and disease resistance of juvenile
337 common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 438, p. 33–38, 2015.
- 338
- 339 KÜHLWEIN, H., MERRIFIELD, D.L., RAWLING, M.D., FOEY, A.D., DAVIES, S.J.
340 Effects of dietary β-(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance,

- 341 intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus*
342 *carpio* L.). **Jornal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, V. 98, p. 279–
343 289, 2014.
- 344
- 345 MEHRIM, A.I. Effect of dietary supplementation of Biogen® (commercial probiotic)
346 on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities.
347 **Journal of Fisheries & Aquatic Scienc**, v.. 4, n. 6, p. 261, 2009.
- 348
- 349 NAKANDAKARE, I. B. **Inclusão de probióticos durante o processamento de**
350 **ração para tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, variação Gift**. Dissertação
351 (Mestrado em Aqüicultura e Pesca). Instituto de Pesca, São Paulo. 74p. 2010.
- 352
- 353 NAKANDAKARE, I.B.; IWASHITA, M.K.P.; DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.;
354 RANZANI-PAIVA, M.J; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para
355 juvenis de tilápia-do-nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e
356 microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v39, n. 2, p. 121 –135, 2013.
- 357
- 358 OZORIO R.O.A.; KOPECKA-PILARCZYK, J.; PEIXOTO, M.J.; LOCHMANN, R.;
359 SANTOS, R.J.; SANTOS, G.; WEBER, B.; CALHEIROS, J.; FERRAZ-ARRUDA,
360 L.; VAZ-PIRES, P.; GONÇALVES, J.F.M. Dietary probiotic supplementation in
361 juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under cage culture
362 production: effects on growth, fish welfare, flesh quality and intestinal microbiota.
363 **Aquaculture Research**, p. 1–16, 2015.
- 364
- 365 PLAIPETCH, P.; YAKUPITIYAGE, A. Effect of replacing soybean meal with yeast-
366 fermented canola meal on growth and nutrient retention of Nile
367 tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, V. 45,
368 n.11, p. 1744–1753, 2014.
- 369
- 370 REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E.; BELO, M.A.A.; MORAES, F.R. Inflammation
371 induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets
372 supplemented with *Saccharomyces cerevisia*. **Aquaculture**, v. 300, n.1–4, p. 37–
373 42, 2010.
- 374
- 375 ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as an
376 efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier).
377 **Aquaculture Research**, v.36, p. 1056-1061, 2005.
- 378
- 379 SALVADOR R.; CLAUDIANO, G.C.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; ETO,
380 S.F; PILARSK, F.; TOAZZA, C.S; MORAES, J.RE.; MORAES, F.R. Performance
381 and hematological profile of Nile tilapia fed with *Saccharomyces cerevisiae* and
382 vaccinated against *Streptococcus agalactiae*. **Pesquisa agropecuária**
383 **brasileira**, V. 48, n.8, 2013.
- 384
- 385 SHEIKHZADEH N.; HEIDARIEH, M.; KARIMI PASHAKI, A.; NOFOUZI, K.;
386 AHRAB FARSHBAFI, M.; AKBARI, M. Hilyses ®, fermented *Saccharomyces*
387 *cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune
388 parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunology**,
389 v. 32, p. 1083–1087, 2012.
- 390

- 391 SHEIKHZADEH, N.; MAKHLOUGHI, A.R.; NOFOUZI, K.; TUKMECHI, A Influence
392 of diets enriched with two different *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth
393 performance, innate immune system and disease resistance in rainbow trout
394 (*Onchorhynchus mykiss*). **Aquaculture Research**, p.1–5, 2015.
- 395
396 SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal:
397 Funet, 1995. 72p.
- 398
399 SON, V.M.; CHANG, C.C.; WU, M.; GUU, Y.; CHIU, C.H.; CHENG, W. Dietary
400 administration of probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate
401 immune responses and disease resistance of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish**
402 **and Shellfish immunology** v.26, p.691-698, 2009.
- 403
404 TALPUR, A.D.; MUNIR, M.B.; MARY, A.; HASHIM, R. Dietary probiotics and
405 prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and
406 immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*
407 in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 14–20,
408 2014.
- 409
410 TUOHY, K. M.; ROUZAUD, G. C. M.; BRÜCK, W. M.; GIBSON, G. R. Modulation
411 of the Human Gut Microflora Towards Improved Health Using Prebiotics –
412 Assessment of Efficacy. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p. 75-90, 2005.
- 413
414 YEMPITA EFENDI AND YUSRA. *Bacillus subtilis* Strain VITNJ1 Potential
415 Probiotic Bacteria in the Gut of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) are Cultured in
416 Floating Net, Maninjau Lake, West Sumatra. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 13,
417 n.2, p. 710-715, 2014.
- 418
419 ZAR, JH. **Biostatistical Analysis**. 2° edition. New Jersey, Prentice Hall. 718p.
420 1984.
- 421
422 ZHOU. X.; TIAN. Z.; WANG. Y.; LI .W. Effect of treatment with probiotics as water
423 additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune
424 response. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 1742, p. 1573-1586, 2009.

CAPÍTULO 2

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICOS E SUBMETIDOS A DESAFIO SANITÁRIO

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICOS E SUBMETIDOS A DESAFIO SANITÁRIO

425 **Resumo:** Grande parte das espécies de peixes cultivadas, inclusive o tambaqui
426 são susceptíveis à infecção, a exemplo de parasita e bactérias que podem causar
427 mortalidade nos diversos estágios de crescimento dos animais. Bactérias do
428 gênero *Streptococcus* possuem ação patogênica para uma grande diversidade de
429 hospedeiros. Estudos de parâmetros hematológicos têm o intuito de verificar a
430 possível ação dos patógenos sobre os seus hospedeiros. Este trabalho foi
431 realizado com o intuito de avaliar o efeito do desafio com *Streptococcus*
432 *agalactiae* nos parâmetros hematológicos do tambaqui suplementados com
433 *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. No presente estudo não foi
434 observado sinais clínicos nem mortalidade após o desafio com a bactéria
435 *Streptococcus agalactiae*. Os parâmetros hematológicos apresentaram alterações
436 significativas ($p \leq 0,05$) no presente experimento. O estudo demonstrou que a
437 admissão desses incrementos tem efeitos benéficos para os animais
438 suplementados, reduzindo os efeitos danosos, mesmo quando desafiados com
439 bactéria patogênica.

440

441 **Palavras chave:** Bactérias, ação patogênica, *Streptococcus agalactiae*, efeitos
442 benéficos.

443

444

445

HAEMATOLOGICAL PARAMETERS OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SUPPLEMENTED WITH PROBIOTICS AND UNDERGOING HEALTH CHALLENGE

446

447

448

449

450

451

452

453

454

Abstract: Many of the growth fish species, including tambaqui are susceptible to infection, parasites and bacteria may cause mortality in different stages of animal growth. *Streptococcus* genus bacteria have pathogenic action for a wide variety of hosts. Studies on hematological parameters are intended to verify the possible action of pathogens on their hosts. This work was performed in order to evaluate the effect of challenge with *Streptococcus agalactiae* in hematological parameters of tambaquis supplemented with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

455 Our study has not observed clinical signs or mortality after challenge with the
456 bacteria *Streptococcus agalactiae*. Hematological parameters showed significant
457 changes ($p = 0.05$) in this experiment. The study showed that the admission of
458 these increments have beneficial effects for the supplemented animals, reducing
459 the harmful effects, even when challenged with pathogenic bacteria.

460 **Keywords:** Bacteria, pathogenic action, *Streptococcus agalactiae*, beneficial
461 effects,

462

463

464 1. INTRODUÇÃO

465 Nos últimos anos, estudos imunológicos, hematológicos, microbiológicos,
466 são frequentemente usados como apontadores do estado funcional de
467 imunoestimulantes na aquicultura. Diversas substâncias com tais características
468 despertaram interesse devido aos seus efeitos sobre os mecanismos de defesa
469 em peixes (FLORES-MIRANDA et al., 2011; HE et al., 2013; HAI, 2015). Com
470 destaque para as substâncias químicas sintéticas, biológicas, fatores nutricionais
471 (vitaminas C e E), hormônios, citocinas entre outros (SAJEEVAN et al., 2009;
472 SARLIN et al., 2011; PERAZA-GÓMEZ et al., 2014).

473 Parâmetros hematológicos vêm sendo utilizados para diagnosticar e
474 prognosticar condições mórbidas em peixes, análise do eritrograma permitem
475 conhecer a capacidade respiratória das diferentes espécies, assim como, auxiliam
476 no entendimento do sistema imunológico a partir da análise quantitativa e
477 qualitativa (morfológica) dos leucócitos, além de avaliar de condições de estresse
478 (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; CAMPBELL, 2007; DAVIS et al., 2008;
479 TAVARES-DIAS et al., 2008; SHAH et al., 2009). As variações sanguíneas em
480 animais estressados geralmente são seguidas de hiperglicemia, variação no
481 hematócrito, concentração da hemoglobina e número de linfócitos (URBINATI;
482 CARNEIRO, 2001; TAVARES-DIAS; MORAES, 2007). Autores destacam que os
483 conhecimentos das irregularidades existentes no sangue e órgãos instituem um
484 valioso e seguro meio para a avaliação das condições bioquímicas, biológicas e
485 patológicas nos peixes (ARAÚJO et al., 2009).

486 Embora, várias intervenções antibióticas, terapêuticas e quimioterapia são,
487 na prática, utilizadas para o controle de patógenos na água e no trato digestório

488 dos peixes, estas também podem vir a ocasionar efeitos deletérios sobre o meio
489 ambiente, assim como desenvolver cepas bacterianas resistentes a drogas
490 (CHANDER et al., 2007; WECKX, 2012). Por isso, as medidas de controle
491 biológico na forma de imunostimulantes tornaram-se popularmente mais
492 estudadas nos últimos anos (CHAGAS et al., 2013; TALPUR et al., 2014; RIDHA;
493 AZAD, 2015

494 Animais com problemas de desequilíbrio homeostático apresentam
495 alterações nos parâmetros sanguíneos, essas variações, em peixes, estão
496 submetidas as modificações influenciadas por fatores abióticos e bióticos, assim
497 como por sua atividade ecológica do animal (TAVARES-DIAS et al., 2008). Uma
498 das espécies de bactérias que vem trazendo problemas para as pisciculturas é a
499 *Streptococcus agalactiae*. Infecções por essa bactéria em peixes estão
500 associadas a morbidades e mortalidades significativas. Provavelmente, a
501 transmissão dessa bactéria entre peixes está relacionada ao contato entre
502 carreadores ou peixes infectados (EVANS et al. 2002; MIAN et al., 2009).

503 Os imunostimulantes atualmente vêm sendo estudados como alternativa
504 a utilização de antibióticos, estudos cada vez mais são preconizados para verificar
505 a possível atuação dos probióticos contra os efeitos nocivos dos patógenos em
506 animais aquáticos.

507 O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dois probióticos
508 (*Bacillus subtilis* 10⁹UFC/g e *Saccharomyces cerevisiae* 10⁹UFC/g) sobre os
509 parâmetros hematológicos em juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)
510 desafiados com *Streptococcus agalactiae* 10⁵UFC/g.

511

512 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

513 O experimento foi conduzido no laboratório do Núcleo de Aquicultura e
514 Pesca (NUCAP) situado na Unidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB),
515 Cruz das Almas - Bahia.

516

517 **2.1. Amostras**

518 Foram utilizados 60 juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*)
519 provenientes da Estação de piscicultura da Barragem Pedra do Cavalo, Rodovia
520 101, Km 12, município de Cachoeira - BA. Os peixes foram transportados em

521 sacos plásticos limpos até as instalações do NUCAP onde foram distribuídos
522 aleatoriamente nos 12 tanques. O sistema possuía recirculação constante com
523 filtragem mecânica e biológica.

524

525 **2.2. Delineamento experimental**

526 Os animais utilizados (60 juvenis) possuíam peso inicial médio de ($175 \pm$
527 36g), esses, passaram por um período de aclimação de cinco dias e foram
528 alimentados com ração comercial sem probiótico (35% de proteína). Durante o
529 período experimental a alimentação foi fornecida diariamente, três vezes ao dia
530 (8h, 14h e 19h). Antes de iniciar o experimento, os peixes permaneceram em
531 jejum por um período de 48h para limpeza do sistema gastrointestinal.

532 Os animais foram submetidos à analgesia com Eugenol (65mgL^{-1})
533 (ROUBACH, 2005) até a perda do equilíbrio para facilitar o manejo e evitar
534 possíveis danos físicos. Em seguida, foram pesados e medidos com o auxílio de
535 balança eletrônica e paquímetro e distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com
536 volume útil de 100L (5 animais por tanque). O sistema possuía temperatura
537 controlada por termostato e recirculação constante com filtragem mecânica e
538 biológica.

539 O período experimental foi de 63 dias e o delineamento inteiramente
540 casualizado (DIC), composto por três tratamentos e quatro repetições, onde foi
541 avaliado tempo e tratamento. Foi considerado como unidade experimental, cada
542 tanque com volume útil de 100L contendo cinco juvenis de tambaqui.

543

544 **2.3. Dieta Experimental**

545 Avaliaram-se três dietas experimentais ou tratamentos: T1= ração
546 controle isenta de probiótico, T2= rações controle + probiótico (*Bacillus subtilis*
547 10^9UFC/g) e T3= ração controle + probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*
548 10^9UFC/g). A dieta comercial (35% PB, 5% EE, cinzas e umidade) foi adquirida da
549 empresa Pratigi alimentos, Castro Alves, Brasil. Os probióticos comerciais foram
550 adquiridos na fábrica de rações Exato, situada na cidade de Santo Antônio de
551 Jesus-Ba e foram incorporados às rações por meio de um veículo oleoso (2% de
552 óleo de soja) de acordo com metodologia descrita por Dias et al., 2011 e
553 Nakandakare et al., 2013.

554

555 **2.4. Monitoramento da qualidade da água**

556 O monitoramento da qualidade da água foi realizado quinzenalmente onde foi
557 avaliada a temperatura da água, concentração de oxigênio dissolvido com
558 oxímetro, o potencial hidrogeniônico com pHmetro digital. Os parâmetros de
559 qualidade da água foram $30,40 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,85 \pm 0,26$, oxigênio dissolvido =
560 $7,82 \pm 2,41 \text{ mgL}^{-1}$. A qualidade da água permaneceu dentro dos padrões
561 recomendados para a criação de peixes de clima tropical (SIPAÚBA-TAVARES,
562 L.H, 1995).

563 **2.5. Análises hematológicas**

564 Os animais foram analgesiados e logo em seguida foi coletado cerca de
565 1,0 mL de sangue por animal através de punção do vaso caudal. O material
566 coletado foi depositado em tubos de Eppendorf devidamente identificados
567 contendo EDTA (anticoagulante), refrigerados em caixa de isotérmicas e levado
568 ao LCV (Laboratório Clínico Veterinário-UFRB) para realização do hemograma.

569

570 **2.6. Valor do Volume globular**

571 Amostras sanguíneas contidas nos tubos de Eppendorf foram
572 homogeneizadas e introduzidas em capilares para microhematócrito, uma das
573 extremidades foi selada e os capilares foram centrifugados por 5 minutos a 5.000
574 rpm para aferir o volume globular (GOLDENFARB et al., 1971). As avaliações dos
575 resultados foram feitas através da leitura em escala padronizada pela metodologia
576 utilizada.

577

578 **2.7. Proteína plasmática total**

579 O plasma remanescente da centrifugação hematócrito foi utilizado para
580 determinação da concentração de proteínas totais em refratômetro portátil.

581

582 **2.8. Contagem total de eritrócitos**

583 Alíquotas de sangue na proporção 20 μL de amostra de sangue total em
584 5,0 mL de solução de formol-citrato com azul de toluidina (OLIVEIRA JÚNIOR et
585 al., 2008) e após homogeneização, 0.1 μl da solução foi inserido na câmara de
586 Neubauer para a contagem de eritrócitos totais.

587

588 **2.9. Estimativa da concentração de hemoglobina**

589 Para dosar taxa de hemoglobina foi utilizado o método da cianometa-
590 hemoglobina descrito por Collier (1944), onde 20 μ L de sangue foram diluídos em
591 5mL do reagente de cor da hemoglobina, após 10 minutos (completa conversão
592 da hemoglobina em cianometa-hemoglobina) a amostra foi centrifugada a 10.000
593 RPM por 15 minutos para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, o sobrenadante
594 foi recolhido para leitura de absorvância em espectrofotômetro no comprimento
595 de onda 540 nm, os resultados foram expressos em g/L.

596 **2.10. Índices hematimétricos**

597 Os índices hematimétricos foram calculados utilizando a técnica descrita
598 por WINTROBE (1934), onde o volume corpuscular médio [VCM = (VG x 10) /
599 eritrócitos] e a concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM =
600 (Hb/VG) x 100].

601

602 **2.11. Desafio bacteriano**

603 Para o desafio bacteriano foram utilizadas cepas da bactéria
604 *Streptococcus agalactiae* fornecidas pelo LDI (Laboratório de doenças
605 infecciosas-UFRB). Para o preparo do material para o desafio, a bactéria *S.*
606 *agalactiae* foi semeada em TSB (caldo triptona de soja) e incubada por 24 horas
607 em estufa bacteriológica a 25°C. A concentração utilizada foi de 10⁻⁵ UFC
608 (unidades formadoras de colônias).

609 Após 60 dias os animais (188,97 \pm 52,78g) foram submetidos à analgesia
610 com Eugenol (65mgL⁻¹) até a perda do equilíbrio para facilitar o manejo e evitar
611 possíveis danos físicos. A inoculação da bactéria nos peixes foi realizada por
612 meio de injeção intraperitoneal, na concentração de 1,0 x10⁻⁵ UFC de
613 *Streptococcus agalactiae* (FILHO et al., 2009; ABUSELIANA et al., 2011). Após
614 12, 24, 48 e 72 horas os animais foram analgesiados com Eugenol (65mgL⁻¹) e
615 submetidos à coleta de cerca de 1,0 mL de sangue por animal através de punção
616 do vaso caudal. O material coletado foi depositado em tubos de Eppendorf
617 devidamente identificados, refrigerados em caixa de isotérmicas e levado ao LCV
618 (Laboratório Clínico Veterinário-UFRB) para realização do hemograma seguindo
619 os mesmos passos descritos anteriormente.

620

621 2.12. Análises estatísticas

622 Para resultados dos parâmetros hematológicos primeiramente foram feitos
623 testes de normalidade utilizando Shapiro Wilk ($p \leq 0,05$), em seguida os dados
624 foram analisados em GLM (Modelos Lineares Generalizados). Quando
625 encontrados efeitos significativos, foram realizados testes de média para as
626 comparações múltiplas pelo método de Bonferroni com 5% de probabilidade. O
627 Software utilizado na presente análise foi o SPSS 18.0.

628

629 3. RESULTADOS

630 No presente estudo não foi observada mortalidade após o desafio com a
631 bactéria *Streptococcus agalactiae*. Foram avaliados neste trabalho o efeito do
632 tempo e tratamento pós desafio. Na presente fase, mesmo não havendo quadro
633 clínico da infecção após o desafio bacteriano, houve uma redução do consumo
634 alimentar pelos animais, essa situação pode ter ocorrido devido aos distúrbios
635 provocados pela infecção bacteriana.

636 Durante o tempo experimental após a infecção: Para o número de
637 eritrócitos (Eri), T0 e o T2 (*Bacillus subtilis*) apresentaram redução ($p \leq 0.05$), o
638 grupo tratado com *Saccharomyces cerevisiae* não apresentou diferença. Foi
639 observado decréscimo do volume globular (VG), contudo, entre 24 e 48 horas
640 pós-desafio, ocorreu um aumento ($p \leq 0.05$) e posteriormente redução deste
641 parâmetro. Para o volume corpuscular médio (VCM), após o desafio ocorreu uma
642 redução ($p \leq 0.05$) e posteriormente aumento entre 24 e 48 horas. Foi observado
643 decréscimo ($p \leq 0.05$) na quantidade de hemoglobina (Hb) até as 24h após o
644 desafio para o grupo controle, e até 12h pós-desafio para os grupos tratados com
645 os probióticos, com posterior aumento. Para concentração de hemoglobina
646 corpuscular média (CHCM), ocorreu um aumento ($p \leq 0.05$), contudo, 48h após o
647 desafio houve uma redução para o grupo controle e grupo tratado com *Bacillus*
648 *subtilis*. Esse fato ocorreu 24h após o desafio para o grupo tratado com
649 *Saccharomyces cerevisiae*. Para proteína (PTT), houve uma redução ($p \leq 0.05$) na
650 concentração após 12h, com posterior aumento para o grupo controle e grupo
651 tratado com *Bacillus subtilis*. O grupo tratado com *Saccharomyces cerevisiae* não
652 apresentou diferença significativa ($p \geq 0.05$).

653 Entre os tratamentos após a infecção: Para o número de Eritrócitos não
 654 foi observado diferença ($p \leq 0.05$). Já para o VG, ocorreu incremento entre 24 e
 655 48h apenas para os animais que se alimentaram com as dietas que continham
 656 probióticos. Para o VCM, foi observada diferença ($p \leq 0.05$) do parâmetro em 48h e
 657 em 72h. Foi observado um incremento da Hb após 24h no grupo tratado com
 658 *Bacillus subtilis*. Para o parâmetro CHCM, não houve diferenças ($p \geq 0.05$) entre os
 659 grupos. Não houve diferenças ($p \geq 0.05$) entre os grupos para o parâmetro PTT. Os
 660 achados estão expressos na tabela 4.

661

Tabela 4: Interação (tratamento x tempo) dos parâmetros hematológicos (série vermelha) para o tambaqui após tratamento com dois probióticos (*B. subtilis* e *S. cerevisiae*) e desafiados com *Streptococcus agalactiae*.

PARÂMETROS ²	TRATAMENTOS ¹			
	COLETAS ³	T0 ⁴	T1 ⁵	T2 ⁶
Eri ($\times 10^6$) mL ⁻¹	C1	2,10 ± 0,2 aA	2,20 ± 0,2 aA	2,00 ± 0,2 aA
	C2	1,97 ± 0,2 aA	2,16 ± 0,2 abA	1,89 ± 0,2 aA
	C3	1,77 ± 0,2 abA	2,15 ± 0,2 abA	2,07 ± 0,2 aA
	C4	1,79 ± 0,3 abA	1,88 ± 0,2 abA	1,74 ± 0,2 aA
	C5	1,50 ± 0,2 bA	1,79 ± 0,2 bA	1,79 ± 0,2 aA
VG (%)	C1	33,87 ± 1,8 aA	36,80 ± 2,0 aA	34,00 ± 1,8 aA
	C2	28,67 ± 2,4 bcA	28,50 ± 2,1 bcA	26,00 ± 1,5 bA
	C3	27,75 ± 0,8 bA	30,80 ± 1,5 bB	31,00 ± 0,9 cB
	C4	30,00 ± 0,0 cA	26,50 ± 3,1 bcB	29,80 ± 0,7 cAB
	C5	28,25 ± 1,8 bcA	25,60 ± 1,5 cA	27,00 ± 1,5 bA
VCM (fL)	C1	163,47 ± 17,9 abA	171,50 ± 18,8 aA	173,74 ± 19,1 aA
	C2	145,47 ± 20,6 aA	132,13 ± 13,2 bA	139,1 ± 15,3 bA
	C3	156,83 ± 19,2 abA	145,42 ± 16,0 abA	154,32 ± 16,9 abA
	C4	167,20 ± 29,1 abAB	141,02 ± 14,1 abA	180,08 ± 19,8 abB
	C5	192,07 ± 23,6 bA	143,12 ± 15,7 abB	152,26 ± 16,7 abAB
Hb (g/dL)	C1	8,53 ± 0,5 aA	9,40 ± 0,5 abA	9,00 ± 0,5 aA
	C2	8,44 ± 0,6 aA	8,53 ± 0,4 aA	8,41 ± 0,5 aA
	C3	8,23 ± 0,5 aA	9,93 ± 0,6 bB	9,22 ± 0,5 aAB
	C4	8,87 ± 0,8 aA	8,36 ± 0,4 aA	8,92 ± 0,5 aA
	C5	8,74 ± 0,6 aA	8,51 ± 0,5 aA	8,92 ± 0,5 aA
CHCM (g/dL)	C1	25,15 ± 1,6 aA	25,55 ± 1,6 aA	26,50 ± 1,6 aA
	C2	29,5 ± 2,4 bA	30,01 ± 1,7 bA	32,4 ± 2,0 bA
	C3	29,68 ± 2,0 bA	32,49 ± 2,0 bA	29,75 ± 1,8 abA
	C4	29,55 ± 2,9 abA	31,80 ± 1,8 bA	29,93 ± 1,9 abA
	C5	30,91 ± 2,1 bA	33,47 ± 2,1 bA	33,14 ± 2,1 abA
PPT (g/dL)	C1	4,23 ± 0,2 aA	4,32 ± 0,2 aA	3,96 ± 0,2 aA
	C2	3,53 ± 0,2 bA	3,83 ± 0,2 bA	3,88 ± 0,2 aA

C3	3,75 ± 0,2 bA	3,85 ± 0,2 bA	3,95 ± 0,2 aA
C4	3,70 ± 0,3 bA	3,57 ± 0,2 bA	3,96 ± 0,2 aA
C5	3,70 ± 0,2 bA	3,76 ± 0,2 bA	4,08 ± 0,2 aA

¹Médias (±DS) seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna (diferença entre os tratamentos) e maiúsculas na linha (diferença no tempo), diferem estatisticamente entre si pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

²Eri = eritrócito; VG = volume globular; VCM = volume globular médio; Hb = hemoglobina; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PPT = proteína total.

³Tempo utilizado para realização das coletas pós desafio com *Streptococcus agalactiae*. T1= 0h, T2=12h, T3=24h, T4 = 48h, T5 = 72h.

⁴Dieta controle

⁵Dieta suplementada com *B. subtilis*

⁶Dieta suplementada com *S. cerevisiae*

662

663

664 4. DISCUSSÃO

665 Trabalhos envolvendo estudo hematológico, como parâmetro para
666 avaliação das respostas fisiológicas em animais alimentados com dietas artificiais
667 aditivadas, têm sido realizados para diversas espécies, essa é uma interessante
668 ferramenta para avaliar a eficiência de dietas em para ambientes cultiváveis
669 (CHAGAS et al., 2013; BELO et al., 2014; TELLI et al., 2014). Através dos
670 parâmetros hematológicos pode-se estimar, mesmo que indiretamente, as
671 condições nutricionais e imunológicas dos peixes (TAVARES-DIAS et al., 2007). A
672 precária nutrição ocasionada pelas dietas desequilibradas é uma das condições
673 prejudiciais para o equilíbrio homeostático dos organismos, isso pode contribuir
674 para o fracasso de um cultivo, animal mal nutrido poderá ter o sistema
675 imunológico alterado e ficará mais susceptível a adquirir doenças.

676 Diversas bactérias de importância para a piscicultura são consideradas
677 agentes oportunistas, por este fato, quando as situações ambientais no cultivo
678 são desfavoráveis, por exemplo, a baixa concentração de oxigênio, alta taxa de
679 amônia, variação de temperatura, infecção parasitária, as condições ao estresse
680 aumentam, com isso, a imunidade dos animais é reduzida e as susceptibilidades
681 dos peixes aumentam, o que pode ocasionar as infecções (GARCIA et al., 2009;
682 BARCELLOS et al., 2008).

683 Alterações hematológicas, como por exemplo, variações no número de
684 eritrócitos, volume globular (VG) e concentração de hemoglobina, decorrentes de
685 fatores estressantes, podem ocasionar processo de hemoconcentração ou
686 hemodiluição, ocasionando distúrbios osmorregulatórios (HOUSTON, 1996). Na

687 hemoconcentração, ocorre o aumento progressivo dos componentes
688 intravasculares devido à perda contínua de líquido plasmático da corrente
689 sanguínea, em peixes, podem ser originada pela liberação de eritrócitos por meio
690 do baço, já a hemodiluição é o contrário, onde o conteúdo vascular aumenta
691 devido ao ganho resultante de líquido proveniente do espaço intersticial, em
692 peixes ela pode ocorrer com a redução nos valores do VG (TAVARES-DIAS E
693 MORAES, 2004).

694 Estudos conduzidos com incremento de aditivos probióticos em rações
695 para peixes demonstraram que a administração de dietas suplementadas com
696 imunoestimulantes promove no animal uma maior resistência contra infecções
697 bacterianas e protozoárias (LAURIDSEN; BUCHMANN, 2010; DHAYANITHIA. et
698 al., 2015; YOGESHWARI et al., 2015). Este aumento na resistência se dá,
699 principalmente, pelo aumento dos mecanismos não específicos de defesa
700 (GOPALAKANNAN; ARUL, 2010).

701 Após o desafio com *S. agalactiae*, o grupo controle e o grupo alimentado
702 com o probiótico *Bacillus subtilis* apresentaram redução dos eritrócitos. O grupo
703 tratado com *S. cerevisiae* não apresentou diferença significativa para esse
704 parâmetro, mostrando um melhor parâmetro imunológico. A redução do número
705 de eritrócitos pode ter ocorrido devido o *Streptococcus agalactiae* produzir
706 hemolisina. A Hemolisina, substância sintetizada por esta espécie de bactéria, é
707 capaz de lisar eritrócitos e outras células do hospedeiro, induzindo resposta
708 inflamatória e apoptose, ela é a causadora mais comum de anemia hemolítica em
709 peixes (GROFF; ZINKL, 1999; CAMPBELL; ELLIS, 2007). Processos anêmicos
710 são atribuídos a modificações na perda e produção de eritrócitos, assim como,
711 pela hemólise dessas células (JAIN, 1986). De forma similar aos achados no
712 presente trabalho, houve uma redução no número de eritrócitos em tilápia do Nilo
713 (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Streptococcus iniae* (SHOEMAKER et al.,
714 2006; Guimarães et al., 2014). Martins et al (2011) verificou redução do número
715 de eritrócitos em tilápias do Nilo parasitadas e vacinadas contra *Streptococcus*
716 *iniae*. Harikrishnan et al., (2010), verificou tal redução quando desafiou goldfish
717 com *A. hydrophila*. Em contrapartida, ocorreu aumento no número de eritrócitos
718 em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com vitaminas C e D após o
719 desafio com *A. hydrophila* (GARCIA et al. 2007).

720 Estudos em peixes sobre células vermelhas no sangue como os eritrócitos,
721 volume globular e hemoglobina são importantes para a investigação da
722 capacidade carreadora de oxigênio e para a avaliação da sanidade e saúde dos
723 animais (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2008).

724 No presente estudo, após o desafio, o taxa de volume globular (VG)
725 reduziu em todos os grupos. A diminuição da alimentação pode inferir no volume
726 globular (VG), conseqüentemente, os animais podem demonstrar uma tendência
727 a condições anêmicas como resultado da infecção causada por patógenos
728 (TALPUR; IKHWANUDDIN, 2013). Os dados encontrados no presente estudo
729 corroboram com os achados de Tavares-Dias et al. (2001), os autores
730 descreveram redução significativa no valor do VG em tambaquis (*Colossoma*
731 *macropomum*) submetidos à agentes estressores. Os dados também apóiam os
732 encontrados por Talpur et al., (2014), onde snakehead (*Channa striata*) reduziram
733 os valores de eritrócitos e de VG em grupos desafiado com *Aeromonas*
734 *hydrophila*. Da mesma forma foi observado redução do VG após desafio
735 bacteriano em pacus e tilápias do Nilo alimentados com dietas suplementadas
736 contendo β -glucano e vitamina C (FALCON, 2007; BILLER, 2008). Contudo,
737 discordam dos encontrados por Yoo et al. (2007), que constataram maiores taxas
738 de VG para *Paralichthys olivaceus* suplementados com β -1,3 glucan quando
739 comparados com os animais do grupo controle.

740 O valor do VCM ao longo das coletas variou significativamente após a
741 infecção, isso ocorreu, pois o número de eritrócitos e VG apresentaram diferenças
742 significativas. O VCM está diretamente ligado à variação desses parâmetros, pois
743 ele diz respeito ao volume individual (tamanho) de cada eritrócito. Em peixes
744 submetidos a agentes estressores que estimulam a redução da população
745 eritrocitária, a possível presença de eritrócitos macrocíticos pode ser um
746 importante mecanismo de regulação em condições adversas para aumentar a
747 eficiência do transporte de oxigênio e manter a demanda energética (PULSFORD
748 et al., 1994).

749 O conteúdo de hemoglobina diminuiu após o desafio bacteriano para o
750 grupo tratado com *Bacillus subtilis*, contudo, após 24 horas esse parâmetro teve
751 um incremento com posterior redução quando comparado aos outros grupos. Esta
752 situação indica que os peixes encontravam-se fora da homeostasia, devido à

753 infecção pelo *S. agalactiae*. Com a diminuição do número de eritrócitos, o
754 conteúdo de hemoglobina pode vir a diminuir em peixes pós-desafiados (TALPUR
755 et al., 2014). A principal função da hemoglobina é transportar oxigênio, ela deve
756 ter a capacidade de se juntar fortemente ao oxigênio e liberá-lo quando for
757 necessário (PERUTZ 1978). Os eritrócitos são os tipos de células predominante
758 no sangue da maioria dos peixes e que são importantes para manter a
759 concentração de hemoglobina, já que ela é conteúdo presente nos eritrócitos. Em
760 função do tempo, o valor da concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM)
761 aumentou significativamente, a CHCM nada mais é que a concentração da
762 hemoglobina dentro de uma hemácia, quanto maior a variação da quantidade de
763 hemácias, maior será a variação da CHCM.

764 Os níveis de proteína total do sangue reduziram significativamente para o
765 grupo controle e para o grupo tratado com *B. subtilis* após o desafio bacteriano, o
766 grupo tratado com *S. cerevisiae* manteve a concentração de proteína plasmática.
767 Peixes infectados tanto por bactérias como por parasitos apresentam redução dos
768 níveis de proteínas sanguíneas (BOON et al., 1990). Os fatores que levam a essa
769 redução é a maior demanda deste nutriente para reposição de tecidos lesionados
770 em processos inflamatórios, onde a permeabilidade vascular aumenta e
771 conseqüentemente há o extravasamento das proteínas para os espaços extra-
772 vasculares (GARCIA; MORAES, 2009). Assim como, a diminuição do teor de
773 proteínas em peixes desafiados pode ser associada ao trauma induzido pelo
774 desenvolvido da bactéria. Durante o período da infecção, os peixes param ou
775 reduzem a alimentação, resultando na redução do teor de proteínas plasmática, o
776 aumento do teor de proteína em peixes pós-desafiado é suposto como resultado
777 da melhoria do sistema imunitário. (TALPUR et al, 2014). Os resultados
778 encontrados para proteínas assemelham-se aos achados de Garcia et al., 2007
779 ao desafiar com a bactéria *Aeromonas hydrophila* Pacus (*Piaractus*
780 *mesopotamicus*) suplementados com vitamina E e D. Assim como, reduções dos
781 valores de proteína plasmática foram observadas em animais suplementados com
782 os probióticos e prebióticos e desafiados com *A. hydrophila* em snakehead
783 (*Channa striata*) por Talpur et al., 2014. A avaliação deste parâmetro está
784 associada à condição de metabolismo protéico e à condição nutricional dos
785 animais, além disso, ocorre a variação desses parâmetros entre as diferentes

786 espécies e durante o ciclo biológico (JERÔNIMO et al., 2009; TAVARES-DIAS e
787 MORAES, 2010).

788 O decréscimo do número de eritrócitos, da taxa de volume globular,
789 conteúdo de hemoglobina e teor de proteína nos animais infectados, pode ser
790 atribuído à ativação da via alternativa do complemento por lipopolissacárido
791 (BRADLEY, 1979), aumento da fagocitose de células vermelhas do sangue por
792 endotoxinas-revestidas (KABIR et al., 1978) e/ou a lise direta das enzimas
793 bacterianas ou toxinas (RIGNEY et al., 1978). Outra razão possível pode ser que,
794 uma vez que o *Streptococcus agalactiae* invade o organismo do hospedeiro, pode
795 digerir substâncias, a exemplo da hemoglobina.

796 Apesar das variações dos parâmetros hematológicos, maiores valores de
797 eritrócitos, hemoglobina e proteína sérica, foram encontrados nos grupos tratados
798 com *S. cerevisiae*, indicando um possível efeito benéfico do probiótico.

799 Alterações hematológicas causadas por enfermidades bacterianas variam
800 de acordo com o agente etiológico, elas dependem da virulência e patogenicidade
801 da bactéria. Em função dos grandes prejuízos nos cultivos ocasionados pelos
802 patógenos a exemplo do *Streptococcus* nos últimos tempos, é de grande e
803 fundamental interesse o monitoramento do grau de infestação e adoção de boas
804 práticas de manejo pelos produtores para prevenção, redução e controle dos
805 principais patógenos que acometem os cultivos.

806

807 **5. CONCLUSÕES**

808 A administração dos probióticos em dietas para tambaquis não influenciou
809 na melhoria do desempenho produtivo e composição corpórea dos tambaquis
810 alimentados com probióticos. Após o desafio com *Streptococcus* foi possível
811 perceber uma variação dos parâmetros hematológicos, contudo, os animais que
812 receberam dieta aditivada mantiveram melhores valores nos parâmetros,
813 consequentemente, possivelmente menores são os efeitos deletérios que os
814 animais suplementados podem vir a evidenciar.

815 O estudo demonstrou que a admissão desses incrementos tem efeitos
816 benéficos para os animais suplementados, melhorando os parâmetros
817 hematológicos, mesmo quando desafiados com bactéria patogênica. Entretanto,
818 devem ser realizados novos estudos sobre a influência do probiótico nos

819 parâmetros produtivos e fisiológicos, assim como o aperfeiçoar os protocolos de
820 emprego destes produtos.

821

822 **6. CONSIDERACOES FINAIS**

823

824 Os resultados obtidos neste estudo poderão vir a ser utilizados como referência
825 para a espécie *Colossoma macropomum* com utilização de suplemento alimentar
826 n dieta. Todavia, outros estudos são de grande importância e necessários para
827 abranger melhor as consequências que o uso prolongado dos aditivos probióticos
828 pode acarretar aos animais aquáticos.

829

830 **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

831

832 ABUSELIANA, A.F.; DAUD, H.H.M.; AZIZ, S.A.; BEJO, S.K.; ALSAID, M.
833 Pathogenicity of *Streptococcus agalajh*
834 *ctiae* Isolated from a Fish Farm in Selangor to Juvenile Red Tilapia
835 (*Oreochromis* sp.). **Journal of Animal and Veterinary**.v. 10.7. p. 914-919,
836 2011.

837

838 ARAÚJO, C.S.O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.;
839 LEMOS, J.R.G.; OLIVEIRA, A.T.; CRUZ, W.R.; AFFONSO, E.G. Infecções
840 parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822
841 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M.
842 (Org). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá. p.
843 389-424. 2009.

844

845 BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; MOTTA,
846 A.C.; RITTER, F.; BEDIN, A.C.; SILVA, L.B. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia*
847 *quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a lesões
848 e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Intituto de Pesca**, v. 34, n. 3,
849 p. 355 – 363, 2008.

850

851 BELO M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADO, E.J.R; MORAES, J.R.E;
852 SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high
853 stocking density on the hematology response of pacus, during chronic
854 inflammatory reaction. **Aquaculture**, v. 422–423, 20, p. 124–128, 2014.

855

856 BILLER, J.D. **Respostas fisio - patológicas e desafio por *Aeromonas***
857 ***hydrophila* em pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β -**
858 **glucano**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
859 114p. 2008.

860

861 BOON, J. H.; CANNAETS, V. M. H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M. A. M.;
862 CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with

- 863 infective Larvae of *Anquillicola crassus* on haematological parameters of
864 European Eel (*Anguila anguila*). **Aquaculture**, v. 87, n. 3, p. 243-253, 1990.
- 865
- 866 Bradley, S.G. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial
867 endotoxins. **Annual Review in Microbiology**, v. 33, p. 67-94, 1979.
- 868
- 869 CAMPBELL, T.W.; ELLIS, C.K. Avian and exotic animal hematology and cytology.
870 **New York: Wiley-Blackwell**, 3rd, 287p. 2007.
- 871 CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MORAES, F.R. Desempenho
872 produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração
873 suplementada com β -glucano. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.8,
874 p.899-905, 2013.
- 875
- 876 CHANDER, Y.; GUPTA, S.C.; GOYAL, S.M.; KUMAR, K. Antibiotics: Has the
877 magic gone? **Jornal of the Science Food and Agriculture**, v. 87, p. 739-
878 742, 2007.
- 879
- 880 COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin
881 determinations. **Canadian Medical Assistance Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.
- 882
- 883 DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to
884 measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**,
885 v. 22, p. 760–772, 2008.
- 886
- 887 DHAYANITHIA, N.B.; AJITHKUMARA, T.T.; AROCKIARAJB, J.;
888 BALASUNDARAMC, C.; RAMASAMY, H. Immune protection by *Rhizophora*
889 *apiculata* in clownfish against *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v.446, p. 1–6,
890 2015.
- 891
- 892 DINA RAIKHWADA, A.K.; PAL, Z.P.; BHATHENA, N.P.; JHA S. A.;
893 MUKHERJEE, S.C. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific
894 immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. **Fish and**
895 **Shellfish Immunology**, v. 22(5), p. 477-486, 2007.
- 896
- 897 EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; GILBERT, P.M.; SHOEMAKER, C.A. AL SARAWI,
898 M.A.; LANDSBERG, J. DUREMDEZ, R.; AL MARZOUK, A.; AL ZENKI, S.
899 Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea
900 bream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait.
901 **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 9, p. 505-513, 2002.
- 902
- 903 FALCON, D.R. **Nível de suplementação de 1,3 β -glucano e vitamina C em**
904 **dietas para tilápia do Nilo:desempenho produtivo e parâmetros**
905 **fisiopatológicos**. 2007. 146p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual
906 Paulista, Jaboticabal.
- 907
- 908 FILHO, C.I.; MÜLLER, E.E.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; BRACARENSE,
909 A.A.P.F.R.L. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae*
910 infecion in nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Jornal of Veterinary**
911 **Pathology**, v. 2(1), p. 12–15, 2009.
- 912

- 913 FLORES-MIRANDA, M.C.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; CAMPA-CÓRDOVA, Á.I.; .
914 GONZÁLEZ-OCAMPO, H.A.; FIERRO-CORONADO, J.A.; PARTIDA-
915 ARANGURE, B.O. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp
916 (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. **Aquaculture**,
917 v. 320, n. 1–2, p. 51–55, 2011.
918
- 919 GARCIA, F., PILARSKI, F., ONAKA, E.M., MORAES, F.R., MARTINS, M.L.
920 Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C
921 and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, p. 39–46,
922 2007.
923
- 924 GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus*
925 *mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta**
926 **Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, p. 17-21, 2009.
927
- 928 GARCIA, F.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Challenge of pacu (*Piaractus*
929 *mesopotamicus*) fed diets supplemented with vitamins C and E by *Aeromonas*
930 *hydrophila* under different temperature. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
931 **Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 378-385, 2009.
932
- 933 GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; Brosious, E. Reproducibility in
934 the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal**
935 **of Clinical Pathology**, New York, v.56, p.35-39, 1971.
936
- 937 GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Enhancement of the innate immune system and
938 disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and
939 whole cell yeast. **Aquaculture Research**, v.41, p.884-892, 2010.
940
- 941 GROFF, J.M.; ZINKL, J.G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish.
942 Common carp and goldfish. **Veterinary Clinics North America Exotic Animal**
943 **Practice**, v. 2 n.3, , p. 741-746, 1999.
944
- 945 Guimarães, I.G.; Lim, C.; Yildirim-Aksoy, M.; Li, M.H.; Klesius, P.H. Effects of
946 dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and
947 resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. **Animal**
948 **Feed Science and Technology**. v. 188, p. 126–136, 2014.
- 949 HAI, N. V. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A
950 review. **Aquaculture**, v. 446, p. 88–96, 2015.
951
- 952 HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., HEO, M.S. Herbal supplementation
953 diets on the hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas*
954 *hydrophila*. **Fish Shellfish Immunol.** 28, 354–361, 2010.
955
- 956
- 957 HE, S.; ZHANG, Y.; XU, L.; YANG, Y.; MARUBASHI, T.; ZHOU, Z.; YAO, B.
958 Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine
959 expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis*
960 *niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂. **Aquaculture**, v. 412–413, p. 125-130, 2013.
961

- 962 HOUSTON, A.H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological
963 response in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, p. 339-347, 1996.
964
- 965 JERÔNIMO, G.T.; MARTINS, M.L.; BACHMANN, F.; GREINERT-GOULART, J.A.;
966 SCHIMITT-JÚNIOR, A.A.; GHIRALDELLI, L. 2009 Hematological parameters of
967 *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes: Pimelodiade) from polluted and non-polluted
968 sites in the Itajaí-Açu river, Santa Catarina State, Brasil. **Acta Scientiarum**
969 **Biological Sciences**, v.31, p. 179-183.
970
- 971 KABIR, S.; ROSENSTREICH, D.L.; MERGENHAGEN, S.E. Bacterial endotoxins
972 and cell membranes. In: J. Jeljaszewicz and T. Wadstrom (Eds.), **Bacterial**
973 **Toxins and Cell Membranes Academic press**, New York: p. 59-87, 1978.
974
- 975 KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4th ed. San Diego:
976 Academic Press, 1989.
977
- 978 LAURIDSEN, J.H.; BUCHMANN, K. Effects of short- and long-term glucan feeding
979 of rainbow trout (*Salmonidae*) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis*
980 infections. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v.40, p.61-66, 2010.
981
- 982 MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth
983 promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the
984 challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic**
985 **Sciences**, v. 9, p. 111-120, 2009.
986
- 987 MARTINS, M.L.; SHOEMAKER, C.A.; XU, D.; KLESIOUS, P.H. Effect of parasitism
988 on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture**, v.
989 314, p. 18–23, 2011.
990
- 991 MIAN, G. F.; GODOY, D.T.; LEAL, C.A.; YUHARA, T.Y.; COSTA, G.M.;
992 FIGUEIREDO, H.C. Aspects of the natural history and virulence of *S. Agalactiae*
993 infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, London, v. 136, n. 1/2, p. 180-
994 183, Apr. 2009.
- 995 PERAZA-GÓMEZ, V.; LUNA-GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ-PRIETO, J.M.;
996 FIERRO-CORONADO, A.; GONZÁLEZ-OCAMPO, H.A. Protective effect of
997 microbial immunostimulants and antiviral plants against WSSV in *Litopenaeus*
998 *vannamei* cultured under laboratory conditions. **Aquaculture**, v. 420–421, p. 160-
999 164, 2014.
1000
- 1001 PERUTZ, M.F. Hemoglobin structure and respiratory transport. **Scientific**
1002 **American**, V. 239 p.92-125, 1978.
1003
- 1004 PULSFORD, A.L.; LEMAIRE-GONY, S.; TOMLINSON, M.; COLLINGWOOD, N.;
1005 GLYNN, P.J. Effects os acute stress on the immune system of the dab, *Limanda*
1006 *limanda*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p.129-139, 1994.
1007
- 1008 RIDHA, M.T.; AZAD, I.S. Effect of autochthonous and commercial probiotic
1009 bacteria on growth, persistence, immunity and disease resistance in juvenile and
1010 adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, p. 1–11, 2015.

- 1011
1012 RIGNEY, M.M.; ZILINSKY, J.W.; ROUF, M.A. Pathogenicity of *Aeromonas*
1013 *hydrophila* in red leg disease in frog. **Current Microbiology**, v. 1, p. 175-179,
1014 1978.
- 1015
1016 ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as an
1017 efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier).
1018 **Aquaculture Research**, v.36, p. 1056-1061, 2005.
- 1019
1020 SAJEEVAN, T.P.; PHILIP, R.; SINGH, I.S.B. Dose/frequency: A critical factor in
1021 the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp (*P.*
1022 *monodon*) *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 287, p. 248–252, 2009.
- 1023
1024 SARLIN P.J., PHILIP, R. Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as
1025 immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: A comparative study.
1026 **Aquaculture**, v. 321,n. 3–4, p. 173-178, 2011.
- 1027
1028 SHAH, A.W.; PARVEEN, M.; MIR, S.H.; SARWAR, S.G.; YOUSUF, A.R. Impact of
1029 helminth parasitism on fish haematology of Anchar Lake, Kashmir. **Pakistan**
1030 **Journal of Nutrition**, v. 8, p. 42-45, 2009.
- 1031
1032 SHOEMAKER, C.A.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY,M.; WELKER, T.L.; KLESIOUS,
1033 P.H. Growth response and acquired resistance of Nile tilapia, *Oreochromis*
1034 *niloticus* (L.) that survived *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture Research**,
1035 v. 37, p. 1238-1245, 2006.
- 1036 SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal:
1037 Funet, 1995. 72p.
- 1038
1039
1040 TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M. Azadirachta indica (neem) leaf dietary effects
1041 on the immunity response and disease resistance of *Asian seabass*, *Lates*
1042 *calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish Shellfish Immunol.** v.34, p. 254–
1043 264, 2013.
- 1044
1045 TALPUR, A.D.; MUNIR, M.B.; MARY, A.; HASHIM, R. Dietary probiotics and
1046 prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and
1047 immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*
1048 in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 14–20,
1049 2014.
- 1050
1051 TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.
1052 Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to
1053 acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 43 – 48, 2001.
- 1054
1055 TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. 1ªed.
1056 Ribeirão Preto: FMRP, p. 131, 2004.
- 1057

- 1058 TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Haematological and biochemical reference
1059 intervals for farmed channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 383-388,
1060 2007.
- 1061
- 1062 TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Hematological assessment
1063 in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from
1064 Franca. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, p.89-196, 2008.
- 1065
- 1066 TAVARES-DIAS, MARCOS ; MORAES, F. R.. Biochemical parameters for
1067 *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* (Characidae) and hybrid
1068 tambacu (*P. mesopotamicus* X *C. macropomum*). **Ciência Animal Brasileira** ,v.
1069 11, p. 361-368, 2010.
- 1070
- 1071 TELLI, G.S.; RANZANI-PAIVA, M.J.; DIAS DDE C., SUSSEL, F.R.; ISHIKAWA,
1072 C.M.; TACHIBANA, L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology
1073 and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different
1074 stocking densities. **Fish Shellfish Immunol**, v. 39(2), p. 305-11, 2014
- 1075
- 1076 URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of the
1077 matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under
1078 the influence of benzocaine. **Journal of the Aquaculture in the Tropics**, v. 16(1),
1079 p. 75-85, 2001.
- 1080 .
- 1081 WECKX, L. Antibiotics: from use to abuse. **Braz J Otorhinolaryngol**. V.78(2), p.
1082 2, 2012.
- 1083
- 1084 WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes
1085 in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p. 32-49. 1934.
- 1086
- 1087 YOGESHWARI, G.; JAGRUTHIA, C.; ANBAZAHANA, S.M. MARIA, L.S.S.;
1088 SELVANATHANB, J.; ROCKIARAJC, J.; DHAYANITHID, N.B.; AJITHKUMARD,
1089 T.T.; BALASUNDARAME, C.; RAMASAMY, H. Herbal supplementation diet on
1090 immune response in *Labeo rohita* against *Aphanomyces invadans*. **Aquaculture**,
1091 v. 437, p. 351–359, 2015.
- 1092
- 1093 YOO, G.Y.; LEE, S.H.; KIM, Y.C.; OKORIE, O.E.; PARK, G.J.; HAN, Y.O.; CHOI,
1094 S.M.; KANG, J.C.; SUN, M.H.; BAI, S.C. Effects of dietary β -1,3 glucan and feed
1095 stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **J World Aquac Soc.**
1096 V.38, p. 138–145, 2007.
- 1097
- 1098 ZAR, JH. **Biostatistical Analysis**. 2° edition. New Jersey, Prentice Hall. 718p.
1099 1984.

ANEXO

Artigo submetido ao comitê editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira.

Probióticos: desempenho, composição corporal e interação “desafio x tempo” nos parâmetros hematológicos do tambaqui.

Alison Eduardo Melo da Paixão⁽¹⁾, Jéssica Cerqueira dos Santos⁽¹⁾, Juliana Lira Alves⁽¹⁾, Mariana Sampaio Pinto⁽¹⁾, Denise Soledade Peixoto Pereira⁽¹⁾, Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos⁽¹⁾, Robson Bahia Cerqueira⁽¹⁾, e Rodrigo Fortes da Silva⁽¹⁾.

⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, N° 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: alisoneduardo@ufrb.edu.br, jessy_fsa2@hotmail.com, juliralves@hotmail.com, marivetufrb@gmail.com, deni.soledade@gmail.com, carlosramos@ufrb.edu.br, robsonba@ufrb.edu.br, fortes@ufrb.edu.br.

Resumo: Avaliamos em duas etapas o efeito de dois probióticos (*Bacillus subtilis* 10⁹UFC/g e *Saccharomyces cerevisiae* 10⁹UFC/g) sobre o desempenho, composição corporal e parâmetros hematológicos de juvenis de tambaquis. Para a etapa 1, 108 animais (peso 2,13 ± 0,75g) foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques de 100L. Após 90 dias foram avaliados o peso, comprimento, consumo, conversão alimentar, ganho de peso, sobrevivência e composição corporal. Para a etapa 2, 60 animais (175,01 ± 36,73g) foram distribuídos em 12 tanques e mantidos nas mesmas condições laboratoriais da etapa anterior, alimentados com as mesmas dietas experimentais. Após 60 dias, os peixes foram desafiados utilizando cepas da bactéria *Streptococcus agalactiae* (1,0x10⁻⁵ UFC). Após a inoculação (0, 12, 24, 48 e 72 horas), os animais foram analgesiados e submetidos à coleta de 1,0 mL de sangue por meio de punção do vaso caudal. Os parâmetros analisados foram: eritrócitos, volume globular, hematócrito, taxa de hemoglobina, índices hematimétricos, concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, leucócitos total e diferencial e trombócitos. Não foi observada diferenças (p≥0,05) para o desempenho e composição corporal. Após o desafio bacteriano, não foi observada mortalidade nem sinais clínicos nos animais. Contudo, foi possível observar melhorias dos parâmetros hematológicos em animais suplementados com *Saccharomyces cerevisiae*.

Termos para indexação: *Bacillus subtilis*, Crescimento, Hematologia, Imunidade, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus agalactiae*.

39 **Probiotics: Performance, body composition and (time x challenge) ration on**
40 **the influence over tambaqui haematological parameters.**

41 **ABSTRACT:** Two probiotic (*Bacillus subtilis* 10⁹UFC/g e *Saccharomyces cerevisiae*
42 10⁹UFC/g) were evaluated for their effects on the performance, body composition
43 and hematological parameters of tambaqui juveniles. For step 1, 108 animals (2.13 ±
44 0.75 g weight) were randomly divided into 12 100-liters ponds. After 90 days, weight,
45 length, intake, feed conversion, weight gain, survival and body composition were
46 evaluated. For step 2, 60 animals (175.01 ± 36,73g) were distributed into tanks 12
47 and kept under the same laboratory conditions of the previous step, fed with the
48 same experimental diets. After 60 days, the fish were challenged using strains of the
49 bacterium *Streptococcus agalactiae* (1.0x10⁻⁵ UFC). After the inoculation (0, 12, 24,
50 48 and 72 hours), animals were anesthetized and submitted to collection of 1.0 ml of
51 blood via caudal. The analyzed parameters were: erythrocytes, globular volume,
52 hematocrit, hemoglobin concentration, hematimetric indexes, concentration of
53 average corpuscular hemoglobin, full and differential leukocytes and platelets. There
54 was no difference (p≥0.05) for performance and body composition. Following
55 bacterial challenge, there was no mortality or clinical signs in animals. However, we
56 observed improvements of haematological parameters in animals supplemented with
57 *Saccharomyces cerevisiae*.

58 **Index terms:** *Bacillus subtilis*, Growth, Hematology, Immunity, *Saccharomyces*
59 *cerevisiae*, *Streptococcus agalactiae*.

60

61 **Introdução**

62 A aquicultura brasileira vem crescendo na mesma proporção da aquicultura
63 mundial. Segundo dados mais recentes do Boletim Estatístico da Pesca e
64 Aquicultura do Ministério da Pesca (MPA), a produção nacional pesqueira alcançou
65 em 2011 quase 1,4 milhão de toneladas, onde 628.704,3 toneladas deste total foram
66 produzidas em cativeiro (Gonçalves, 2014).

67 Uma espécie com notório interesse comercial é a *Colossoma macropomum*,
68 conhecida vulgarmente como tambaqui é considerada uma das espécies nativa de
69 água doce de maior interesse na aquicultura brasileira atual (MPA, 2011; Fiúza et
70 al., 2015). Segundo Silva et al. (2007), essa espécie possui um grande valor de
71 mercado, devido a sua rusticidade e crescimento rápido. Entretanto, uma grande
72 parte das espécies cultivadas, inclusive o tambaqui são susceptíveis à infecção, a
73 exemplo de parasita e bactérias que podem causar mortalidade nos diversos
74 estágios de crescimento dos animais (Uzun & Ogu, 2015; Boijink et al. 2015; Dias et
75 al, 2015). A exemplo, bactérias patogênicas do gênero *Streptococcus* foram isoladas

76 em diversos sistemas de criação no Brasil (Salvador et al., 2012). Bactérias do
77 gênero possuem ação patogênica para uma grande diversidade de hospedeiros. A
78 evolução da doença é rápida, e a morte acontece dois a três dias após o início dos
79 sinais clínicos (Zamri-Saad et al, 2010). Resultados recentes revelaram melhorias no
80 desempenho de matrinxã (*Bryconamazonicus*) (Dias et al., 2012) com o uso de
81 probióticos e também nos parâmetros imunológicos em snakehead (*Channa striata*)
82 pós desafio com *Aeromonas hydrophila* (Talpur et al., 2014). Dessa forma, na
83 aquicultura intensiva, há a necessidade de estudos sobre melhorias nas condições
84 nutricionais e sanitárias.

85 Embora, várias intervenções antibióticas, terapêuticas e quimioterapia são, na
86 prática, utilizadas para o controle de doenças, estas também podem vir a ocasionar
87 efeitos deletérios sobre o meio ambiente, assim como desenvolver cepas
88 bacterianas resistentes a drogas (Chander et al., 2007; Weckx, 2012). Aditivos
89 alimentares vêm sendo estudados como o objetivo de conferir maior resistência e
90 saúde aos animais, a exemplo de alguns probióticos como o *Lactobacillus*,
91 *Pediococcus*, *Enterococcus*, (Govender et al., 2015; Ozorio et al., 2015). As
92 espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente usadas como
93 probióticos, além do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis*, com tudo,
94 ainda é possível observar uma grande variação destes resultados na literatura.
95 (Yempita & Yusra, 2014; Huang et al., 2015). Com relação aos probióticos utilizados,
96 os *Bacillus* possuem uma grande vantagem sobre as bactérias ácido lácticas, a sua
97 habilidade em esporular lhes confere uma maior sobrevivência durante o trânsito
98 estomacal e durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (Hoa et
99 al., 2000; Junqueira et al., 2009). Já o fungo *Saccharomyces* possui vantagens por
100 manter suas propriedades probióticas mesmo quando administrada em conjunto
101 com antimicrobianos (Rolfe, 2000; Coppola & Gil-Turnes, 2004). Algumas hipóteses
102 sobre a ação dos probióticos são aceitas, como por exemplo, a exclusão
103 competitiva, onde os organismos benéficos concorrem com os patógenos pelos
104 nutrientes e sítios de fixação do intestino, impedindo a atuação do patógeno
105 temporariamente (Pant et al., 2007; Barbosa et al., 2011). Os probióticos também
106 podem interferir na ação dos patógenos através da síntese de bacteriocinas,
107 promovendo um efeito letal bactericida, síntese de ácidos orgânicos voláteis e a
108 síntese de peróxido de hidrogênio (Ramírez & Otálvaro, 2008; Ballus et al., 2010;
109 Vanegas et al., 2010). Este trabalho foi realizado em duas etapas com os seguintes

110 objetivos: Etapa 1- avaliar o efeito de dois probióticos (*Bacillus subtilis* e
111 *Saccharomyces cerevisiae*) sobre o crescimento e composição corporal de juvenis de
112 Tambaqui (*Colossoma macropomum*); Etapa 2- avaliar o efeito do desafio com
113 *Streptococcus agalactiae* nos parâmetros hematológicos do tambaqui.

114

115

Material e Métodos

116 Este trabalho foi desenvolvido em acordo com o protocolo da Comissão de
117 Ética no uso de Animais (CEUA, 23007.003747/2014-69) da Universidade Federal
118 do Recôncavo da Bahia para uso de animais em experimentação. O experimento foi
119 conduzido no laboratório de Nutrição e Comportamento Alimentar de Peixes
120 (AquaUFRB) situado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz
121 das Almas - Bahia.

122 Avaliaram-se três dietas experimentais ou tratamentos: T1= dieta controle
123 isenta de probiótico, T2= dieta controle + 2g de probiótico / kg de dieta (*Bacillus*
124 *subtilis* 10⁹UFC/g) e T3= dieta controle + 2g probiótico / kg de dieta (*Saccharomyces*
125 *cerevisiae* 10⁹UFC/g). Estas concentrações (10⁹UFC/g) foram baseadas nos
126 seguintes trabalhos: Budiño et al. (2006); Das et al. (2008). A dieta comercial para
127 espécies onívoras continha a seguinte composição: 35% PB, 5% EE e 13% de
128 umidade, e foi adquirida da empresa Pratigi alimentos, Castro Alves, Brasil. Os
129 probióticos foram adquiridos na Fábrica de rações Exato, situada na cidade de Santo
130 Antônio de Jesus-Ba e foram incorporados às rações por meio de um veículo oleoso
131 (2% de óleo de soja) de acordo com metodologia descrita por Dias et al. (2011) e
132 Nakandakare et al. (2010). Este trabalho foi realizado em duas etapas como descrito
133 a seguir.

134

Etapa 1: Desempenho

136 Foram utilizados 108 juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) com
137 peso inicial médio de 2,13 ± 0,75g e comprimento inicial de 3,46 ± 0,43 cm
138 provenientes da Estação de piscicultura da Barragem Pedra do Cavalo, Rodovia
139 101, Km 12, município de Cachoeira - BA. Os animais foram distribuídos
140 aleatoriamente em 12 tanques com volume útil de 100L (9 animais por tanque),
141 possuindo um sistema de recirculação constante com filtragem mecânica e
142 biológica, temperatura controlada por termostato (Roxin, China (Mainland)).

143 O delineamento foi inteiramente casualizado com três tratamentos (T0, T1e
144 T2) e 4 repetições. Os animais foram alimentados (*Ad libitum*) três vezes ao dia (8,
145 14 e 19h) durante 90 dias com as dietas experimentais. A cada 15 dias foram
146 realizadas análises de qualidade da água. Os parâmetros de desempenhos
147 avaliados foram: peso e comprimento inicial e final, consumo de ração, conversão
148 alimentar, ganho de peso e sobrevivência. Os parâmetros de qualidade da água
149 foram $30,20 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,96 \pm 0,28$, oxigênio dissolvido = $7,96 \pm 2,48 \text{ mgL}^{-1}$. A
150 qualidade da água permaneceu dentro dos padrões recomendados para a criação
151 de peixes de clima tropical (Sipaúba-Tavares, 1995). Eventuais restos de ração no
152 fundo dos tanques foram coletados por sifonagem, secos em estufa e pesados para
153 o calculo do consumo por diferença do que foi ofertado.

154 Ao final de 90 dias, os animais foram anestesiados com Eugenol (65mg/L^{-1}),
155 protocolo recomendado para esta espécie de acordo com Roubach et al., (2005). As
156 carcaças dos peixes foram submetidas a análises bromatológica para medir os
157 efeitos dos tratamentos sobre a composição corporal dos animais. As análises foram
158 realizadas no laboratório de bromatologia da UFRB pela metodologia da Association
159 of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1995).

160

161 **Etapa 2: Parâmetros hematológicos do tambaqui desafiados com** 162 ***Streptococcus agalactiae***

163 Nesta etapa, 60 animais ($175,01 \pm 36,73\text{g}$) foram distribuídos em 12 tanques
164 (5 animais por tanque) e mantidos nas mesmas condições laboratoriais da etapa
165 anterior. A diferença do peso nesta etapa para a etapa anterior é devido à
166 necessidade de animais maiores para a coleta de sangue. Os animais foram
167 alimentados com as mesmas dietas experimentais (T1= ração controle isenta de
168 probiótico, T2= ração controle + probiótico (*Bacillus subtilis* 10^9UFC/g) e T3= ração
169 controle + probiótico (*Saccharomyces cerevisiae* 10^9UFC/g) por 60 dias. Devido à
170 variação encontrada na literatura sobre o tempo de ação dos probióticos em animais
171 aquáticos, 60 dias para expressão imunológica (Zokaeifar et al., 2012), 51 dias para
172 mortalidade (Nikoskelainen et al.,2001), foi estipulado o período de 60 dias de
173 tratamento para posterior desafio.

174 No primeiro dia da etapa 2 os animais foram submetidos à analgesia com
175 Eugenol (65mgL^{-1}), em seguida, foi coletado cerca de 1,0 mL de sangue por animal
176 através de punção do vaso caudal. O material coletado foi depositado em tubos de

177 Eppendorf contendo EDTA (anticoagulante), devidamente identificados e
178 refrigerados em caixa isotérmica, para posterior análise dos parâmetros
179 hematológicos.

180 Após 60 dias de alimentação com as dietas experimentais, os peixes foram
181 submetidos à analgesia e em seguida desafiados utilizando cepas da bactéria
182 *Streptococcus agalactiae* fornecidas pelo LDI (Laboratório de doenças infecciosas-
183 UFRB). A inoculação da bactéria nos peixes foi realizada por via intraperitoneal na
184 concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ UFC de *Streptococcus agalactiae* (Filho et al., 2009;
185 Salvador et al., 2012).

186 Após a inoculação da bactéria, os animais foram analgesiados e submetidos à
187 coleta de 1,0 mL de sangue por meio de punção do vaso caudal nos seguintes
188 tempos de coletas: T1= 0h; T2= 12h; T3=24h; T4=48h e T5=72h. No final do
189 experimento (após 60 dias), os animais foram coletados, a cada tempo, de um único
190 tanque, evitando-se assim o efeito do estresse nos parâmetros avaliados.

191 O sangue coletado foi analisado no LCV (Laboratório Clínico Veterinário-
192 UFRB) para realização do hemograma da série vermelha e série branca.
193 Primeiramente foi realizada a contagem de eritrócitos (Eri) com utilização da câmara
194 de Neubauer, em seguida foi aferido o volume globular (VB) para avaliar o
195 percentual de hematócrito. Para dosar taxa de hemoglobina (Hb) foi utilizado o
196 método descrito por Collier (1944). Já para o cálculo dos índices hematimétricos:
197 Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular
198 Média (CHCM) utilizou-se a técnica descrita por Wintrobe (1934). Após as análises
199 hematológicas, o sangue remanescente foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos
200 e utilizado para determinação das proteínas totais (PPT), por refratômetro. A
201 contagem dos leucócitos total (LEU) e diferencial (LEU= Linfócitos, MON=
202 Monócitos, NEU= Neutrófilos, CGE= Células Granulocíticas Especiais e EO=
203 Eosinófilos) e dos trombócitos (TRON) foi realizada segundo metodologia indireta,
204 proposta por Hrubc e Smith (1998). Para tanto, foram confeccionadas extensões
205 sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, utilizando o método sugerido por
206 Rosenfeld (1947).

207 Para resultados dos índices zootécnicos, composição corporal e dos
208 parâmetros hematológicos primeiramente foram feitos testes de normalidade
209 utilizando Shapiro Wilk ($p \leq 0,05$), em seguida os dados foram analisados em GLM
210 (Modelos Lineares Generalizados). Quando encontrados efeitos significativos, foram

211 realizados testes de média para as comparações múltiplas pelo método
212 de Bonferroni com 5% de probabilidade. O Software utilizado na presente análise foi
213 o SPSS 18.0.

214

215

Resultados e Discussão

216 Os achados neste trabalho apontam para uma melhoria das condições
217 sanitárias com a inclusão de probióticos na dieta e servirão para elaboração de
218 estratégias alimentares mais sustentáveis no cultivo do tambaqui.

219 No presente estudo, o desempenho produtivo dos animais alimentados com a
220 inclusão dos aditivos probióticos *B. subtilis* e *S. cerevisiae* durante 90 dias não
221 demonstraram diferença ($p \leq 0.05$) para os parâmetros de desempenho avaliados
222 (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho et al. (2011),
223 os quais forneceram dietas suplementadas com *B. subtilis* para juvenis de tilápias do
224 Nilo em um período de 70 dias. Da mesma forma, Chagas et al. (2013) verificaram
225 que a suplementação com β -glucano (derivado da *S. cerevisiae*) não exerceu
226 influência sobre o desempenho produtivo de tambaquis. Por outro lado, Dias et al.
227 (2012), observaram após suplementação com *B. subtilis* (5 g/kg^{-1} e 10 g/kg^{-1}),
228 melhoria nos parâmetros de desempenho zootécnicos para reprodutores de
229 matrinxãs (*Brycon amazonicus*). Dessa forma, é possível observar uma vasta
230 variação de resultados na literatura quanto ao desempenho dos animais. Essa
231 variação de resultados pode ser devido a vários aspectos, como por exemplo, a
232 proliferação e função do probiótico no trato digestivo do hospedeiro, ou então,
233 devido a diferenças interespecíficas individuais e de espécie para espécie (Mehrim,
234 2009).

235 Similar ao que foi observado para as variáveis de desempenho produtivo, as
236 variáveis mensuradas para composição bromatológica das carcaças dos juvenis de
237 tambaquis não demonstraram diferenças ($p \leq 0.05$) após realização da análise de
238 variância (Tabela 2). Os achados corroboram com Merrifield et al. (2010) e Ramos et
239 al. (2015), que suplementaram trutas arco-íris com probióticos, a exemplo de *B.*
240 *subtilis*, *Lactobacillus* SP e não observaram diferenças significativas para os
241 parâmetros avaliados de composição corporal.

242 Após o desafio com bacteriano (etapa 2) não foi observada
243 mortalidade. Mesmo não havendo quadro clínico da infecção após o desafio
244 bacteriano, foi observado uma redução no consumo alimentar pelos animais para

245 todos os tratamentos. Essa situação pode ter ocorrido devido aos distúrbios
246 provocados pela infecção bacteriana. Os resultados da influência dos tratamentos
247 “probióticos” e o efeito destes tratamentos no tempo pós-desafio com (*Streptococcus*
248 *agalactiae*) para os parâmetros hematológicos da serie vermelha e série branca
249 estão na tabela 3 e 4. O tratamento T0 (controle) e o T1 (*Bacillus subtilis*)
250 apresentaram redução ($p \leq 0.05$) para o número de eritrócitos (ERI). Já o grupo T2
251 (*Saccharomyces cerevisiae*) não apresentou diferença para esse parâmetro,
252 mostrando um melhor parâmetro imunológico. A redução do número de ERI pode ter
253 ocorrido devida uma possível produção de hemolisina pelo agente infeccioso
254 (*Streptococcus agalactiae*). A hemolisina, substância sintetizada por esta espécie de
255 bactéria, é capaz de lisar eritrócitos e outras células do hospedeiro, induzindo
256 resposta inflamatória e apoptose, ela é a causadora mais comum de anemia
257 hemolítica em peixes (Campbell & Ellis, 2007). Há anos os processos anêmicos são
258 conhecidos e são atribuídos a modificações na perda e produção de ERI, assim
259 como, pela hemólise dessas células (Jain, 1986). De forma similar aos achados no
260 presente trabalho, houve uma redução no número de ERI em tilápia do Nilo
261 (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Streptococcus iniae* (Martins et al., 2011;
262 Guimarães et al., 2014).

263 A redução na alimentação, ocorrido em nossos estudos, pode inferir no
264 volume globular (VG), consequentemente, os animais podem demonstrar uma
265 tendência a condições anêmicas como resultado da infecção causada pelo patógeno
266 (Talpur & IKhwanuddin, 2013). Foi observado decréscimo ($p \leq 0.05$) do VG após o
267 desafio, corroborando com os achados de Tavares-Dias et al. (2001). Estes autores
268 descreveram redução no valor do VG em tambaquis (*Colossoma macropomum*)
269 submetidos à agentes estressores. Os dados também corroboram com os resultados
270 encontrados por Talpur et al. (2014), onde snakehead (*Channa striata*) reduziram os
271 valores de eritrócitos e de VG em grupos desafiado com *Aeromonas hydrophila*.
272 Estes resultados discordam dos encontrados por Yoo et al. (2007), que constataram
273 maiores taxas de VG para *Paralichthys olivaceus* suplementados com β -1,3 glucan
274 quando comparados com os animais do grupo controle. Para o volume corpuscular
275 médio (VCM), após o desafio ocorreu uma redução ($p \leq 0.05$) e posteriormente
276 aumento entre 24 e 48 horas. O VCM está diretamente ligado à variação desses
277 parâmetros, pois ele diz respeito ao volume individual (tamanho) de cada eritrócito.

278 A variação no conteúdo de hemoglobina (Hb) indica que os peixes
279 encontravam-se fora da homeostasia, devido à infecção pelo *S. agalactiae*. No
280 presente estudo foi observado decréscimo ($p \leq 0.05$) na quantidade de Hb. Com a
281 diminuição do número de eritrócitos, a concentração de Hb pode vir a diminuir em
282 peixes pós-desafiados (Talpur et al., 2014). A principal função da Hb é transportar
283 oxigênio, ela deve ter a capacidade de se juntar fortemente ao oxigênio e liberá-lo
284 quando for necessário (Perutz, 1978). Os eritrócitos são células predominantes no
285 sangue da maioria dos peixes e que são importantes para manter a concentração de
286 Hb, já que ela é conteúdo presente nos eritrócitos. Para concentração de
287 hemoglobina corpuscular média (CHCM), ocorreu um aumento ($p \leq 0.05$), contudo,
288 48h após o desafio houve uma redução para o grupo controle e grupo tratado com
289 *Bacillus subtilis*. Esse fato ocorreu 24h após o desafio para o grupo tratado com
290 *Saccharomyces cerevisiae*, a CHCM nada mais é que a concentração da
291 hemoglobina dentro de cada eritrócito, quanto maior a variação da quantidade de
292 eritrócitos, maior será a variação da CHCM. Para proteína total (PTT), houve uma
293 redução ($p \leq 0.05$) na concentração após 12h, com posterior aumento para o grupo
294 T0 e grupo tratado com T1, o grupo tratado com T2 manteve a concentração de
295 PTT. Peixes infectados tanto por bactérias como por parasitas apresentam redução
296 dos níveis de proteínas sanguíneas (BOON et al., 1990). Os fatores que levam a
297 essa redução é a maior demanda deste nutriente para reposição de tecidos
298 lesionados em processos inflamatórios ou trauma induzido pelo desenvolvimento da
299 bactéria, onde a permeabilidade vascular aumenta e conseqüentemente há o
300 extravasamento das proteínas para os espaços extra-vasculares (Garcia & Moraes,
301 2009). Durante o período da infecção, os peixes diminuíam a alimentação, que
302 poderia resultar na redução do teor de proteínas plasmática. A diminuição do teor de
303 proteína em peixes implica em redução imunitária, ela tem como função regular a
304 resposta inflamatória e prover resistência à infecção, por este fato, em animais pós-
305 desafiado o nível mais alto de proteína sérica é suposto como resultado da melhoria
306 do sistema imunitário (TALPUR et al., 2014). Os resultados encontrados para
307 proteínas assemelham-se aos achados de Garcia et al. (2007) ao desafiar com a
308 bactéria *Aeromonas hydrophila*, pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados
309 com vitamina E e Talpur et al. (2014), ao suplementar snakehead (*Channa striata*)
310 com os probióticos e prebióticos e desafiar com *A. hydrophila*. Ambos os trabalhos

311 observaram redução do teor de proteínas plasmática. Os achados estão expressos
312 na tabela 3.

313 O decréscimo do número de eritrócitos, da taxa de volume globular, conteúdo
314 de hemoglobina e teor de proteína nos animais infectados, pode ser atribuído à
315 ativação da via alternativa do complemento por lipopolissacárido (Bradley, 1979),
316 aumento da fagocitose de células vermelhas do sangue por endotoxinas-revestidas
317 (Kabir et al., 1978) e/ou a lise direta das enzimas bacterianas ou toxinas (Rigney et
318 al., 1978). Apesar das variações dos parâmetros hematológicos, maiores valores de
319 eritrócitos, hemoglobina e proteína sérica, foram encontrados nos grupos tratados
320 com *S. Cerevisiae*, indicando um possível efeito benéfico do probiótico.

321 Os linfócitos (LIN) são produtores de anticorpos e estão relacionados à
322 rejeição e participam do processo inflamatório (Finn & Nielson, 1971; Turner, 1988).
323 No presente estudo a quantidade de LIN no sangue dos animais reduziram ($p \leq 0.05$)
324 apenas no grupo controle (tabela 4). Já para quantidade de trombócitos (TRON) o
325 grupo controle e grupo alimentado com *B. subtilis* apresentaram um incremento
326 ($p \leq 0.05$) com posterior redução, o grupo tratado com *S. cerevisiae* não demonstrou
327 variação para este parâmetro. Durante a fase aguda, diminuição no número de
328 TRON foi observada em pacus tratados com dexametasona (Claudiano et al., 2013).
329 Garcia et al., (2007) e Belo et al., (2014), observaram redução do número de
330 trombócitos e linfócitos pós-desafio em pacus suplementados com vitaminas. Martins
331 et al., (2011) verificou que não houve alterações no número de linfócitos após testar
332 a eficácia da vacina contra *Streptococcus iniae* em tilápias do Nilo parasitadas. Os
333 linfócitos participam no processo de coagulação do sangue e os trombócitos
334 contribuem com o mecanismo de defesa orgânico, representando um elo entre a
335 imunidade inata e adaptativa (Tavares-Dias et al., 2007; Reque et al., 2010;
336 Claudiano et al., 2013).

337 Casos de respostas inflamatórias aguda são caracterizados por neutrofilia e
338 monocitose no sangue, os neutrófilos (NEU) representam a primeira defesa contra
339 infecções e possuem um sistema de agentes microbicidas (Turner, 1988). No
340 presente estudo foi observada variação ($p \leq 0.05$) no número de (NEU) apenas para o
341 grupo tratado com *S. cerevisiae* na última coleta. Silva et al., (2009) e Martins et al.,
342 (2011) verificaram neutrofilia em tilápias infectadas por patógenos. A neutrofilia na
343 fase inicial da inflamação é comum entre os peixes teleósteos, essas células estão
344 envolvidas na imunidade celular e fagocitose (Iwama & Nakanishi, 1996; REQUE et

345 al., 2010). O número de monócitos (MON) reduziu ($p \leq 0.05$) no grupo controle e
346 grupo tratado com *B. subtilis*, o grupo tratado com *S. cerevisiae* teve uma redução
347 para esse parâmetro com posterior normalização, mostrando um melhor parâmetro
348 imunológico. Durante inflamações crônicas por corpos estranhos, os MON migram
349 para foco da inflamação e depois da diapedese estas células se diferenciam em
350 macrófagos que fagocitam os elementos estranhos (Martins et al., 2011; BELO et al.,
351 2014). Garcia et al., (2007), verificaram aumento no número de NEU e MON após
352 infectar pacus (*Piaractus mesopotamicus*) com *Aeromonas hydrophila*. Já Martins et
353 al. (2011) verificaram redução do número de MON quando testou a eficácia da
354 vacina contra *Streptococcus iniae* em tilápias do Nilo parasitadas.

355 Um número maior de células granulocíticas especiais (CGE) foi observado no
356 sangue dos animais que receberam dieta contendo *S. cerevisiae*, os demais grupos
357 sofreram redução ($p \leq 0.05$) neste parâmetro. Garcia et al. (2007), verificou aumento
358 no número de CGE em pacus após infecção. A função das CGE não está bem
359 estabelecida, embora haja evidências de que elas compartilham características
360 morfológicas e funcionais com os basófilos. Foi observada redução ($p \leq 0.05$) na
361 contagem de eosinófilos (EO) para todos os grupos. Os achados estão expressos na
362 tabela 4.

363 Bozzo et al. (2007) demonstraram a migração de células para o foco
364 inflamatório. Ao estudar a composição celular do exsudado inflamatório da bexiga
365 natatória de *P. mesopotamicus* infectadas com *A. hydrophila* e endotoxina (LPS) de
366 *Escherichia coli*, foi verificado que as células predominantes no foco inflamado foram
367 os trombócitos, seguidos em menor número pelos linfócitos, já os macrófagos e
368 granulócitos encontraram-se em quantidades baixas. Portanto, a hipótese de
369 migração de células para locais de inflamação pode ser confirmada em estudos de
370 composição celular do sangue dos peixes.

371 **Conclusão**

372 A administração dos probióticos em dietas para tambaquis não influenciou na
373 melhoria do desempenho produtivo e composição corporal. Após o desafio com
374 *Streptococcus agalactiae* foi observado uma variação benéfica dos parâmetros
375 hematológicos para animais suplementados com *Saccharomyces cerevisiae*. Os
376 resultados obtidos neste estudo revelam a necessidade de estabelecer critérios

377 experimentais e de uso de probióticos em aquicultura, considerando o tempo como
 378 fator primordial para a interação entre probióticos e patógenos.

379

380

Tabelas

381

Tabela 1: Parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a dietas suplementadas com probióticos.

Parâmetros	T0 (Grupo Controle)	T1 (<i>B. subtilis</i>)	T2 (<i>S. cerevisiae</i>)
Comprimento Médio Inicial (cm)	3,76 ± 0,42	3,76 ± 0,43	3,76 ± 0,40
Comprimento Médio Final (cm)	12,7 ± 3,25	13,1 ± 1,13	13,29 ± 1,16
Peso Médio Inicial (cm)	2,14 ± 0,72	2,13 ± 0,75	2,13 ± 0,73
Peso Médio Final (cm)	69,27 ± 12	74,14 ± 9,92	79,89 ± 3,29
Ganho Médio de Peso (g)	67,13 ± 11,28	72,01 ± 9,17	77,76 ± 2,56
Conversão Alimentar Aparente	2,63	2,19	2,39
Taxa de sobrevivência (%)	100	100	97,22

382

383

384

385

Tabela 2: Valores das variáveis bromatológicas para composição de carcaça de tambaquis (*Colossoma macropomum*) submetidos a dietas suplementadas com probióticos.

Parâmetros	T0(Grupo Controle)	T1 (<i>B. subtilis</i>)	T2 (<i>S. cerevisiae</i>)
Matéria Seca (%)	30,96 ± 1,29	31,28 ± 1,61	32,66 ± 1,90
Umidade (%)	69,04 ± 1,29	68,72 ± 1,61	67,34 ± 1,90
Proteína Bruta (%)	51,99 ± 0,40	52,31 ± 0,91	53,05 ± 0,79
Extrato Etéreo (%)	32,50 ± 0,61	34,20 ± 0,93	32,22 ± 1,49
Cinzas (%)	16,70 ± 0,20	16,80 ± 0,20	16,40 ± 0,50

Tabela 3: Interação (tratamento x tempo) dos parâmetros hematológicos (série vermelha) para o tambaqui após tratamento com dois probióticos (*B. subtilis* e *S. cerevisiae*) e desafiados com *Streptococcus agalactiae*.

PARÂMETROS ²	TRATAMENTOS ¹			
	COLETAS ³	T0 ⁴	T1 ⁵	T2 ⁶
Eri (x10 ⁶) mL ⁻¹	C1	2,10 ± 0,2 aA	2,20 ± 0,2 aA	2,00 ± 0,2 aA
	C2	1,97 ± 0,2 aA	2,16 ± 0,2 abA	1,89 ± 0,2 aA
	C3	1,77 ± 0,2 abA	2,15 ± 0,2 abA	2,07 ± 0,2 aA
	C4	1,79 ± 0,3 abA	1,88 ± 0,2 abA	1,74 ± 0,2 aA
	C5	1,50 ± 0,2 bA	1,79 ± 0,2 bA	1,79 ± 0,2 aA
VG (%)	C1	33,87 ± 1,8 aA	36,80 ± 2,0 aA	34,00 ± 1,8 aA
	C2	28,67 ± 2,4 bcA	28,50 ± 2,1 bcA	26,00 ± 1,5 bA
	C3	27,75 ± 0,8 bA	30,80 ± 1,5 bB	31,00 ± 0,9 cB
	C4	30,00 ± 0,0 cA	26,50 ± 3,1 bcB	29,80 ± 0,7 cAB
	C5	28,25 ± 1,8 bcA	25,60 ± 1,5 cA	27,00 ± 1,5 bA
VCM (fL)	C1	163,47 ± 17,9 abA	171,50 ± 18,8 aA	173,74 ± 19,1 aA
	C2	145,47 ± 20,6 aA	132,13 ± 13,2 bA	139,1 ± 15,3 bA
	C3	156,83 ± 19,2 abA	145,42 ± 16,0 abA	154,32 ± 16,9 abA
	C4	167,20 ± 29,1 abAB	141,02 ± 14,1 abA	180,08 ± 19,8 abB
	C5	192,07 ± 23,6 bA	143,12 ± 15,7 abB	152,26 ± 16,7 abAB
Hb (g/dL)	C1	8,53 ± 0,5 aA	9,40 ± 0,5 abA	9,00 ± 0,5 aA
	C2	8,44 ± 0,6 aA	8,53 ± 0,4 aA	8,41 ± 0,5 aA
	C3	8,23 ± 0,5 aA	9,93 ± 0,6 bB	9,22 ± 0,5 aB
	C4	8,87 ± 0,8 aA	8,36 ± 0,4 aA	8,92 ± 0,5 aA
	C5	8,74 ± 0,6 aA	8,51 ± 0,5 aA	8,92 ± 0,5 aA
CHCM (g/dL)	C1	25,15 ± 1,6 aA	25,55 ± 1,6 aA	26,50 ± 1,6 aA
	C2	29,5 ± 2,4 bA	30,01 ± 1,7 bA	32,4 ± 2,0 bA
	C3	29,68 ± 2,0 bA	32,49 ± 2,0 bA	29,75 ± 1,8 abA
	C4	29,55 ± 2,9 abA	31,80 ± 1,8 bA	29,93 ± 1,9 abA
	C5	30,91 ± 2,1 bA	33,47 ± 2,1 bA	33,14 ± 2,1 abA
PPT (g/dL)	C1	4,23 ± 0,2 aA	4,32 ± 0,2 aA	3,96 ± 0,2 aA
	C2	3,53 ± 0,2 bA	3,83 ± 0,2 bA	3,88 ± 0,2 aA
	C3	3,75 ± 0,2 bA	3,85 ± 0,2 bA	3,95 ± 0,2 aA
	C4	3,70 ± 0,3 bA	3,57 ± 0,2 bA	3,96 ± 0,2 aA
	C5	3,70 ± 0,2 bA	3,76 ± 0,2 bA	4,08 ± 0,2 aA

¹Médias (±DS) seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna (diferença entre os tratamentos) e maiúsculas na linha (diferença no tempo), diferem estatisticamente entre si pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$); ²Eri = eritrócito; VG = volume globular; VCM = volume globular médio; Hb = hemoglobina; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PPT = proteína total.; ³Tempo utilizado para realização das coletas pós desafio com *Streptococcus agalactiae*. T1= 0h, T2=12h, T3=24h, T4 = 48h, T5 = 72h; ⁴Dieta controle; ⁵Dieta suplementada com *B. subtilis*; ⁶Dieta suplementada com *S. cerevisiae*

Tabela 4: Interação (tratamento x tempo) dos parâmetros hematológicos (série branca) para o tambaqui após tratamento com dois probióticos (*B. subtilis* e *S. cerevisiae*) e desafiados com bactéria *Streptococcus agalactiae*.

PARÂMETROS ²	TRATAMENTO ¹			
	COLETAS ³	T0 ⁴	T1 ⁵	T2 ⁶
LEU (x10 ³ /μL)	C1	20, 1 ± 6,03 aA	17,62 ± 5,23 aA	18,93 ± 5,71 aA
	C2	15,95 ± 3,12 aA	8,92 ± 5,08 abA	11,20 ± 4,70 aA
	C3	7,88 ± 1,58 bA	8,87 ± 3,86 abA	10,31 ± 3,09 aA
	C4	10,70 ± 4,95 abAB	11,91 ± 1,09 aA	4,75 ± 1,25 bB
	C5	4,73 ± 1,89 bA	8,50 ± 1,09 bB	12,27 ± 4,72 aB
TRON (x10 ³ /μL)	C1	27,9 ± 6,22 aA	27,49 ± 8,29 abA	32,21 ± 11,50 aA
	C2	35,94 ± 2,56 abA	41,15 ± 12,63 bA	33,53 ± 19,94 aA
	C3	37,89 ± 9,99 abA	37,89 ± 12,98 abA	42,03 ± 15,36 aA
	C4	40,88 ± 7,62 bA	25,43 ± 8,25 abB	27,54 ± 7,22 aAB
	C5	23,93 ± 4,97 aA	21,03 ± 3,04 aA	26,33 ± 5,25 aA
LIN (x10 ³ /μL)	C1	16,12 ± 6,87 aA	12,81 ± 6,05 aA	14,21 ± 7,42 aA
	C2	12,77 ± 3,96 aA	5,12 ± 3,92 aA	6,71 ± 3,85 aA
	C3	5,72 ± 1,66 bA	5,40 ± 2,39 aA	6,81 ± 1,97 aA
	C4	4,93 ± 1,93 bA	7,90 ± 1,44 aA	5,22 ± 1,87 aA
	C5	3,91 ± 1,62 bA	6,42 ± 1,12 aA	7,45 ± 2,46 aA
MON (x10 ³ /μL)	C1	2,14 ± 0,84 aA	1,83 ± 0,74 aA	1,71 ± 0,91 aA
	C2	2,36 ± 0,7 aA	1,89 ± 1,32 abA	2,51 ± 1,06 aA
	C3	0,83 ± 0,15 bA	1,51 ± 0,36 aB	2,03 ± 0,72 aB
	C4	1,75 ± 0,99 abA	0,37 ± 0,34 bB	0,60 ± 0,10 b
	C5	0,30 ± 0,08 cA	0,82 ± 0,22 bB	1,71 ± 0,90 aB
NEU (x10 ³ /μL)	C1	0,98 ± 0,66 aA	1,57 ± 0,85 aA	1,09 ± 0,31 aA
	C2	0,74 ± 0,45 aA	1,70 ± 1,02 aA	1,30 ± 0,54 aA
	C3	1,15 ± 0,49 aA	1,81 ± 1,09 aA	1,27 ± 0,62 aA
	C4	1,56 ± 0,71 aA	1,41 ± 0,40 aA	0,85 ± 0,4 aA
	C5	0,50 ± 0,31 aA	1,20 ± 0,35 aA	2,90 ± 1,05 bB
CGE (x10 ³ /μL)	C1	0,15 ± 0,07 aA	0,19 ± 0,09 aA	0,18 ± 0,08 aA
	C2	0,09 ± 0,08 aA	0,15 ± 0,06 aA	0,13 ± 0,07 aA
	C3	0,06 ± 0,04 abA	0,10 ± 0,06 abA	0,10 ± 0,06 aA
	C4	0,04 ± 0,04 abA	0,11 ± 0,07 abA	0,07 ± 0,05 aA
	C5	0,02 ± 0,02 bA	0,02 ± 0,02 bA	0,09 ± 0,06 aA
EO (x10 ³ /μL)	C1	0,14 ± 0,03 aA	0,20 ± 0,11 aA	0,10 ± 0,08 aA
	C2	0 ± 0 cA	0,06 ± 0,04 bB	0,07 ± 0,06 aB
	C3	0,03 ± 0,02 bA	0,05 ± 0,04 bA	0,10 ± 0,08 aA
	C4	0,02 ± 0,01 bA	0,06 ± 0,05 bA	0 ± 0 bB
	C5	0 ± 0 cA	0,05 ± 0,03 bA	0,09 ± 0,05 aA

¹Médias (±DS) seguidas de letras distintas, minúsculas na coluna (diferença entre os tratamentos) e maiúsculas na linha (diferença no tempo), diferem estatisticamente entre si pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

²LEU = leucócito; TRON = trombócito; LIN = linfócito; MON = monócito; NEU = neutrófilo; CGE = células granulocíticas especiais; EO = eosinófilo.

³Tempo utilizado para realização das coletas pós desafio com *Streptococcus agalactiae*.
T1= 0h, T2=12h, T3=24h, T4 = 48h, T5 = 72h.

⁴ Dieta controle

⁵ Dieta suplementada com *B. subtilis*

⁶ Dieta suplementada com *S. cerevisiae*

387

388

389

Agradecimento

390 À Bahia Pesca por disponibilizar os animais, à empresa Fábrica de Rações Exato
391 por doar os probióticos. Este trabalho foi financiado pelo projeto REDES/FAPESB
392 (RED0004/2013) aprovado por RFS.

393

394

Referências bibliográficas

395

396 AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods**
397 **of analysis of AOAC International**. 16 ed. Gaitheersburg: AOAC, 1997.

398

399 BARBOSA, M.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; SILVA, B.C.; MOURINO, J.L.P.;
400 ANDREATTA, E.R.; SEIFFERT, W.Q.; CERQUEIRA, V.R. Cultivation of juvenile fat
401 snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory
402 conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p. 795-801, 2011.

403

404 BALLUS, C.A.; KLAJN, V.R.; CUNHA, M.F.; OLIVEIRA, M.L.; FIORENTINI, A.M.
405 Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na
406 elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de**
407 **Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.28, p.85-96, 2010.

408

409 BELO, M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADOA, E.J.R.; MORAES, J.R.E.;
410 SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high
411 stocking density on the hematology response of pacu, during chronic inflammatory
412 reaction. **Aquaculture**, v.422–423, p.124–128, 2014.

412

413 BOIJINK, C.L.; MIRANDAB, W.S.C.; CHAGAS, E.C. DAIRIKI, J. K.; INOUE L.A.K.A.
414 Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection.
415 **Aquaculture**, v.438, p.138–140, 2015.

415

416 BOON, J.H.; CANNAETS, V.M.H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M.A.M.;
417 CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective
418 Larvae of *Anquillicola crassus* on haematological parameters of European Eel
419 (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v.87, p.243-253, 1990.

419

420 BOZZO, F.R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; PEREIRA, G.T.; TAVARES-DIAS,
421 M.; ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced
422 by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg
423 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.38, p.302–308,
424 2007.

- 425 BRADLEY, S.G. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial
426 endotoxins. **Annual Review in Microbiology**, v.33, p.67-94, 1979.
427
- 428 BUDIÑO, F.E.L.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N. TUCCI, F.M.; FRAGA, A.L.;
429 SCANDOLERA, A.J.; HUAYNATE, R.A.R.; NADAI, A.; CORREIA, R.C. Efeito da
430 adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o
431 desempenho, incidência de diarreia e contagem de coliformes totais. **Brazilian**
432 **Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.59-67, 2006.
- 433 CAMPBELL, T.W.; ELLIS, C.K. **Avian and exotic animal hematology and**
434 **cytology**. New York: Wiley-Blackwell, 3rd, 287p. 2007.
- 435
- 436 CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; COSTA, D.S.P.; MOREIRA, E.L.T.; PINTO, L.F.B.;
437 ABREU, R.D.; ALBINATI, R.C.B. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal
438 de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou
439 mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12,
440 p.176-187, 2011.
441
- 442 CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKAB, R.; MORAES F. R. Desempenho produtivo e
443 respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com
444 β -glucano. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.48, p.899-905, 2013.
445
- 446 CHANDER, Y.; GUPTA, S.C.; GOYAL, S.M.; KUMAR, K. Antibiotics: Has the magic
447 gone? **Jornal of the Science Food and Agriculture**, v.87, p.739-742, 2007.
448
- 449 CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.;
450 LOUREIRO, B.A.; MARCUSO, P.F.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; MORAES,
451 F.R. Acute aero cystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and
452 pro-inflammatory cytokines. **Fish Shellfish Immunology**, v. 34, p.1057–1062, 2013.
453
- 454 COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian**
455 **Medical Assistance Journal**, v.50, p.550-552, 1944.
456
- 457 COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência**
458 **Rural**, v.34, Santa Maria, 2004.
459
- 460 DAS, S.; WARD, L.R.; BURKE, C. Prospect of using marine actinobacteria as
461 probiotics in aquaculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.419–
462 429, 2008.
463
- 464 DIAS, D.C.; FURLANETO, F.P.B.; AYROZA, L.M.S.; TACHIBANA, L.; LEONARDO,
465 A.F.V.; CORRÊA, C.F.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Utilização de
466 probiótico na dieta de reprodutoras de matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Boletim do**
467 **Instituto de Pesca**, v.37, p.135–141, 2011.
468
- 469 DIAS, D.C.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA, C. F.; BORDON, I. C.
470 A. C.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Effect of incorporating probiotics
471 in the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. **Journal of Applied**
472 **Ichthyology**, v. 28, p.40-45, 2012.
473

- 474 DIAS, M K.R.; NEVES, R.L.; MARINHO, R.G.B.; PINHEIRO, D.A.; TAVARES-DIAS,
475 M. Parasitism in tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*,
476 Characidae) farmed in the Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v.45, p.23 –238, 2015.
- 477
478 FILHO, C.I.; MÜLLER, E.E.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; BRACARENSE,
479 A.A.P.F.R.L. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection
480 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**,
481 v.2, p.12–15, 2009.
- 482
483 FINN, J.P.; NIELSON, N.O. The inflammatory response of Rainbow trout. **Journal**
484 **Fish Biology**, London, n.3, p.463-478, 1971.
- 485
486 FIÚZA L.S.; ARAGÃO N.M.; JUNIOR, H.P.R.; MORAES, M.G; ROCHA, I.R.C.B.;
487 NETO, A.D.L.; SOUSA R.R.; MADRID, R.M.M.; OLIVEIRA, E.G.; COSTA, F.H.F.
488 Effects of salinity on the growth, survival, haematological parameters and
489 osmoregulation of tambaqui *Colossoma macropomum* juveniles. **Aquaculture**
490 **Research**, v.46, p.1–9, 2015.
- 491
492 GARCIA, F.; PILARSKI, F; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.
493 Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and
494 E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.271, p.39–46, 2007.
- 495
496 GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus*
497 *mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta**
498 **Scientiarum Biological Sciences**, v.31, p.17-21, 2009.
- 499
500 GONÇALVES, Beatrice. Rede Cheia. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e**
501 **Aquicultura**. 2014, p.43.
- 502
503 GOVENDER, M.; CHOONARA, Y.E.; VAN VUUREN, S.; KUMAR P.; DU TOIT, L.C.;
504 PILLAY, V. A gastro-resistant ovalbumin bi-layered mini-tablet-in-tablet system for
505 the delivery of *Lactobacillus acidophilus* probiotic to simulated human intestinal and
506 colon conditions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.67, p. 939-50, 2015.
- 507
508 GUIMARÃES, I.G.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; LI, M.H.; KLESIOUS, P.H. Effects
509 of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and
510 resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. **Animal Feed**
511 **Science and Technology**, v.188, p.126–136, 2014.
- 512
513 HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A. Characterization of *Bacillus* species
514 used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders.
515 **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.5241-5247, 2000.
- 516
517 HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. 1998. Hematology of fish, p. 1120-1125. In: Feldman,
518 B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed.
519 Blackburg: Wiley-Blackwell.
- 520
521 HUANG, L.; RAN, C.; HE, S.; REN, P.; HU, J.; ZHAO, X.; ZHOU, Z. Effects of
522 dietary *Saccharomyces cerevisiae* culture or live cells with *Bacillus amyloliquefaciens*
523 spores on growth performance, gut mucosal morphology, hsp70 gene expression,

- 524 and disease resistance of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**,
525 v.438, p.33–38, 2015.
- 526
- 527 IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The Fish Immune System. **Academic Press**. California.
528 380p. 1996.
- 529
- 530 JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febeger,
531 1986.
- 532
- 533 JUNQUEIRA, O. M.; BARBOSA, L.C.G.S.; PEREIRA, A.A.; ARAÚJO, L.F.; NETO,
534 M.G.; PINTO, M.F. Uso de aditivos em rações para suínos nas fases de creche,
535 crescimento e terminação. **Aquaculture**, v.38, p.2394-2400, 2009.
- 536
- 537 KABIR, S.; ROSENSTREICH, D.L.; MERGENHAGEN, S.E. Bacterial endotoxins and
538 cell membranes. In: J. Jeljaszewicz and T. Wadstrom (Eds.), **Bacterial Toxins and**
539 **Cell Membranes Academic press**, New York: p.59-87, 1978.
- 540
- 541 MARTINS, M.L.; SHOEMAKER, C.A.; XU, D.; KLESIUS, P.H. Effect of parasitism on
542 vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. **Aquaculture**, v.314,
543 p.18–23, 2011.
- 544
- 545 MEHRIM, A.I. Effect of dietary supplementation of Biogen® (commercial probiotic) on
546 mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities.
547 **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.4, p.261, 2009.
- 548
- 549 MERRIFIELD, D.L.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M.; DAVIES, S.J. Probiotic
550 applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II.Effects on growth
551 performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria
552 postantibiotic treatment. **Aquaculture Nutrition**, v.6, p.496–503, 2010.
- 553
- 554 MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e**
555 **aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011.
- 556 NIKOSKELAINEN, S.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; BYLUND, G. Protection of
557 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*.
558 **Aquaculture**, v.198, p.229–236, 2001.
- 559
- 560 OZORIO R.O.A.; KOPECKA-PILARCZYK, J.; PEIXOTO, M.J.; LOCHMANN, R.;
561 SANTOS, R.J.; SANTOS, G.; WEBER, B.; CALHEIROS, J.; FERRAZ-ARRUDA, L.;
562 VAZ-PIRES, P.; GONÇALVES, J.F.M. Dietary probiotic supplementation in juvenile
563 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under cage culture production: effects
564 on growth, fish welfare, flesh quality and intestinal microbiota. **Aquaculture**
565 **Research**, p.1–16, 2015.
- 566
- 567 PANT N.; MARCOTTE H.; BRÜSSOW H., SVENSSON L.; HAMMARSTRÖM L.
568 Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus*
569 *rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiology**, v.7, p. 1-9, 2007.
- 570
- 571 PERUTZ, M.F. Hemoglobin structure and respiratory transport. **Scientific American**,
572 v. 239 p.92-125, 1978.
- 573

- 574 RAMÍREZ L.A.G.; OTÁLVARO E.V.A. Determination of the in vitro bactericide
575 potential of a native isolated of *Lactobacillus cassei* against *E. coli*. **Revista**
576 **Lasallista de Investigación**, v.5, p68-73, 2008.
- 577
578 RAMOS, M.A.; GONÇALVES, J.F.M.; BATISTA, S.; COSTAS, B.; PIRES, M.A.;
579 REMA, P.; OZORIO, R.O.A. Growth, immune responses and intestinal morphology of
580 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. **Fish**
581 **and Shellfish Immunology**, v. 45, p. 19-26, 2015.
- 582
583 REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E.; BELO, M.A.A.; MORAES, F.R. Inflammation
584 induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented
585 with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, v.300, p.37–42, 2010.
- 586
587 RIGNEY, M.M.; ZILINSKY, J.W.; ROUF, M.A. Pathogenicity of *Aeromonas*
588 *hydrophila* in red leg disease in frog. **Current Microbiology**, v.1, p.175-179, 1978.
- 589
590 ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal
591 health. **Journal of Nutrition**. Bethesda, v.130. p.396-402, 2000.
- 592
593 ROSENFELD, G. Dye panchromic for hematology and cytology clinic. Component of
594 the new constitution and May Grünwald Giemsa stain fast. **Memórias do Instituto**
595 **Butantã**, v.20, p.329-334, 1947.
- 596 ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; FONSECA, F.A.L.; VAL, A.L. Eugenol as an
597 efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier).
598 **Aquaculture Research**, v.36, p.1056-1061, 2005.
- 599
600 SALVADOR, R.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E. de; MORAES, F.R. Inflammatory
601 responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of
602 vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, p.
603 235-241, 2012.
- 604
605 SILVA, J.A.M.; PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B.A.S.; OLIVEIRAPEREIRA, M.I.
606 Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com
607 enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*,
608 Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v.37, p.157-164, 2007.
- 609
610 SILVA, B.C.; MARTINS, M.L.; JATOBA, A.; BUGLIONE-NETO, C.C.; VIEIRA, F.N.;
611 PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFER, W.Q.; MOURIÑO, J.L.P.
612 Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine
613 administration for diferente routes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.874–
614 880, 2009.
- 615
616 TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M. Azadirachta indica (neem) leaf dietary effects on
617 the immunity response and disease resistance of *Asian seabass*, *Lates calcarifer*
618 challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish Shellfish Immunol.**v.34, p. 254–264, 2013.
- 619
620 TALPUR, A.D.; MUNIR, M.B.; MARY, A.; HASHIM, R. Dietary probiotics and
621 prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and
622 immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in
623 snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**, v.426–427, p.14–20,2014.

- 624
625 TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes
626 oriundos de pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. I.
627 Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, p.67-79, 2001.
628
- 629 TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes
630 participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A
631 cytochemical study and ultrastructural analysis. **Ichthyology**, v.23, p.709–712, 2007.
632
- 633 TURNER, R.J. Amphibians In: ROWLEY, A. F., RATCLIFFE, N. N. A. **Vertebrate**
634 **blood cells**. New York, Cambridge University Press, p.129-209, 1988.
635
- 636 UZUN E.; OGUT H. The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass
637 (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. **Aquaculture**,v.437, p.30–37,
638 2015.
- 639 VANEGAS M.C.; GONZÁLEZ, L.M.; ARÉVALO, S.A. Antibiotic activity of
640 *Bifidobacterium sp.* isolated from breast milk and newborn faeces, against the main
641 causes for foodborne illnesses. **Infectio**,v.14, p.241–247, 2010.
642
- 643 YEMPITA E.; YUSRA. *Bacillus subtilis* Strain VITNJ1 Potential Probiotic Bacteria in
644 the Gut of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) are Cultured in Floating Net, Maninjau
645 Lake, West Sumatra. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.13, p.710-715, 2014.
646
- 647 WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in
648 the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49. 1934.
649
- 650 WECKX, L. Antibiotics: from use to abuse. **Brazilian Journal of**
651 **Otorhinolaryngology**, v.78, p.2, 2012.
652
- 653 YEMPITA EFENDI; YUSRA. *Bacillus subtilis* Strain VITNJ1 Potential Probiotic
654 Bacteria in the Gut of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) are Cultured in Floating Net,
655 Maninjau Lake, West Sumatra. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.13, p.710-715,
656 2014.
657
- 658 YOO, G.Y.; LEE, S.H.; KIM, Y.C.; OKORIE, O.E.; PARK, G.J.; HAN, Y.O.; CHOI,
659 S.M.; KANG, J.C.; SUN, M.H.; BAI, S.C. Effects of dietary β -1,3 glucan and feed
660 stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Jornal of the World**
661 **Aquaculture Society**, v38, p.138–145, 2007
662
- 663 ZAMRI-SAAD, M.; AMAL, M.N.A.; SITI-ZAHRAH, A. Pathological changes in red
664 tilapia (*Oreochromis spp*) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of**
665 **Comparative Pathology**, v.143, p.227-229, 2010.
666
- 667 ZOKAEIFAR, H.; BALCAZAR, J.L.; SAAD, C.R.; KAMARUDIN, M.S.; SIJAM, K.;
668 ARSHAD, A.; NEJAT, N. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance,
669 digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white
670 shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.33, p.683–689,
671 2012.