

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS**  
**E ENGENHARIA DE PESCA**

**ANTONIO FRANCISCO CAMPANHA DA SILVA**

Inclusão de aditivo *Bacillus subtilis* e blend de bactérias em dietas para tilápia  
do Nilo

Toledo  
2020

**ANTONIO FRANCISCO CAMPANHA DA SILVA**

Inclusão de aditivo *Bacillus subtilis* e blend de bactérias em dietas para tilápia  
do Nilo

Exame Geral de Qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Aldi Feiden

Toledo

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Da Silva, Antonio Francisco Campanha  
Inclusão de aditivo *Bacillus subtilis* e blend de bactérias em dietas para tilápia do Nilo / Antonio Francisco Campanha Da Silva; orientador(a), Aldi Feiden, 2020.  
38 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2020.

1. Ciências Agrárias . 2. Engenharia de Pesca. 3. Aquicultura . 4. Nutrição. I. Feiden, Aldi . II. Título.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANTONIO FRANCISCO CAMPANHA DA SILVA**

Inclusão de aditivo *Bacillus subtilis* e blend de bactérias em dietas para tilápia  
do Nilo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

---

Prof. Dr. Aldi Feiden  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

---

Prof. Dr. Altevir Signor  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester  
Universidade Federal do Paraná

Aprovada em: 21 de Maio de 2020.

Local de defesa: Sala de treinamento do Gemaq/*Campus* Toledo.

## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro Campanha da Silva e Maria Pereira da Silva pelo apoio incondicional, com amor e ensinamentos em toda etapa da minha vida, sendo sempre meu porto seguro.*

A Deus por tudo que ele tem proporcionado em minha vida!

A meus pais Pedro Campanha da Silva e Maria Pereira da Silva, por todo amor, força, confiança, ensinamentos e por sempre acreditarem em mim e apoiarem minhas decisões. Muito obrigado, amo vocês!

Meus irmãos Ronaldo, Elizabete, Francisca, Rejane, Cristina, por todo apoio e companheirismo em todas as etapas da minha vida.

Minha esposa, namorada e amiga Francisca Mikaele, por caminhar junto comigo nessa nova jornada.

Aos meus amigos do Piauí Rayana, Valdir, Karla, Tiago Fernandes.

Aos amigos Débora, Maryana, Jakeline, Daniel, Pauliana.

Ao José Rafael que trabalhou diariamente no experimento um agradecimento especial.

A toda equipe de ATER de Altos-PI com quem trabalhei e sempre me incentivaram para em uma nova jornada.

Ao professor Dr. Aldi Feiden, pela confiança e orientação. Muito obrigado, professor Aldi Feiden, foi uma honra trabalharmos juntos!

Aos professores Altevir Signor e Wilson Rogério Boscolo, pelos incentivos, pela amizade, disposição em sempre passar seus conhecimentos e por contribuir em minha formação.

Muito Obrigado, professores!

Ao Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura (GEMAQ), pela disponibilização das estruturas para a realização de pesquisas e por contribuir na minha formação;

Aos amigos do GEMAQ, os quais eu tive prazer de conviver, pela amizade, pelo auxílio nas pesquisas e atividades do grupo, companheirismo.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

A CAPES pelo auxílio da bolsa de estudos.

À Biotecnal pelo fornecimento do probiótico.

A todos demais que não citei que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho e na minha formação.

## Lista de tabelas

Tabela 1. Aditivos aprovados pelo MAPA para uso na alimentação animal .....	13
Tabela 2. Níveis de garantia apresentado no rótulo da ração comercial .....	27
Tabela 3. Desempenho zootécnico da tilápia do Nilo submetida a um blend de bactérias e <i>Bacillus Subtilis</i> .....	31
Tabela 4. Composição centesimal da tilápia do Nilo durante 54 dias de experimento com adição de probióticos .....	32
Tabela 5. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo submetida a um blend de bactérias e <i>Bacillus subtilis</i> .....	33
Tabela 6. Parâmetros morfológicos do intestino de tilápia do Nilo submetidos ao blend de bactérias e <i>Bacillus subtilis</i> .....	34
Tabela 7. Características morfométricas dos núcleos dos hepatócitos de tilápia do Nilo submetida ao blend de bactérias e <i>Bacillus subtilis</i> .....	35

## SUMÁRIO

<b>1.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>09</b>
<b>1.1 História do uso do probiótico .....</b>	<b>09</b>
<b>1.2 Probióticos na Aquicultura.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Monitoramento de produtos comercial de probióticos .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Atividades dos probióticos .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Aditivos probióticos liquido/pó .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>16</b>
<b>Artigo: Inclusão de aditivo <i>Bacillus subtilis</i> e <i>blend</i> de bactérias em dietas para tilápia do Nilo.....</b>	<b>23</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2.MATERIAL E METODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Material Biológico .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Análises centesimal.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Análises biológicas.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Hematologia .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Histologia.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 HISTÓRIA DO USO DE PROBIÓTICOS

A partir do conhecimento de que microrganismos são favoráveis a saúde humana, em 1960, Richard Parker utilizou pela primeira vez o termo probiótico, com o significado de “a favor da vida”, de acordo com a origem grega do termo (VIEIRA, et al., 2007). Para FULLER (1989), esses microrganismos vivos adicionados no intestino animal, traz benefícios ao hospedeiro. Atualmente, a definição de probióticos utilizada pela Organização Mundial de Saúde e Organização de Agricultura e Alimentos é a seguinte: “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (JOINT FAO/WHO, 2002). Recentemente (YANG et al., 2017) se refere aos probióticos, como microrganismos vivos que podem promover a homeostase da microbiota intestinal, afetando a interação interespecífica na comunidade microbiana.

Alguns grupos de bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*), de bactérias gram-negativo (*Escherichia coli* não patogênica) e de leveduras (*Saccharomyces*) são estudados ou já comercializados como probióticos (VIEIRA et al, 2007).

O uso desses organismos surgiu no oriente médio como alimentos funcionais, usados para terapias contra infecções do trato gastrointestinal e também como estimulante para o apetite (LODDI, 2001). Na década de 80, esses alimentos foram introduzidos com parte de uma dieta normal, evidenciando benefícios, na redução dos riscos de doenças crônicas, entretanto, não substituindo o uso de medicamentos para o tratamento de doenças (RAIZEL et al., 2011). Diversas pesquisas mostram os efeitos positivos da utilização de probióticos em humanos, estendendo-se o uso em animais de produção como suínos, ruminantes e peixes, caracterizando-se pela inclusão do aditivo preferencialmente via alimentação, promovendo o estímulo do sistema imunológico dos animais (VIEIRA et al., 2017).

Nos últimos anos, tem-se intensificado pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de alimentos funcionais para aquicultura, sendo em sua maioria, as bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus*), o gênero *Bacillus*, as bactérias fotossintéticas (*Rhodobacter sphaeroides*) e as leveduras *Pseudomonas* ou *Vibrio* (WANG, 2011). Muitos microrganismos foram reconhecidos como probióticos potentes para práticas de aquicultura, contudo, o grupo dominante são as bactérias gram-positivas, especialmente os

grupos *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CRUZ et al., 2012). Os *bacillus*, são caracterizados como um grupo diversificado de bactérias gram-positiva em forma de bastonetes, capaz de produzir esporos robustos, mantendo-se estável no ambiente gástrico pois não é afetado pelas secreções gástricas (LEE et al., 2013). O uso de probiótico composto por *Bacillus subtilis* melhora as respostas imunes e a resistência a doenças e afeta positivamente as atividades de enzimas digestivas, capacidade anti-inflamatória e antioxidante em peixes cultivados (ADDO et al., 2017; CEREZUELA et al., 2012; HE et al., 2013; ZAINELDIN et al., 2018). Além disso, *B. subtilis* pode ser resistente a alta pressão e alta temperatura durante o processamento na fase de incorporação a substrato na fase de granulação (ZHANG et al., 2014).

Os esporos que são estáveis ao calor têm várias vantagens em relação a outros formadores de não esporos, como *Lactobacillus spp.*, esse produto pode ser armazenado à temperatura ambiente sem qualquer efeito prejudicial sobre a viabilidade, uma segunda vantagem é que o esporo é capaz de sobreviver ao baixo pH da barreira gástrica, o que não é o caso de todas as espécies de *Lactobacillus*, portanto, em princípio, uma dose especificada de esporos pode ser armazenada indefinidamente sem refrigeração e toda a dose de bactérias ingeridas atingirá o intestino delgado intacto (SPINOSA et al., 2000; BARBOSA et al., 2005; TUOHY et al., 2007)

O processo de seleção de cepas microbianas como probióticos é baseado em etapas críticas, porque a escolha inadequada pode levar a efeitos indesejáveis no hospedeiro (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2015). Para o uso comercial os microrganismos devem passar por uma triagem e uma seleção, para atenderem todas às necessidades de segurança, tecnológicas, funcionais e fisiológicas (MORELLI, 2007; VASILJEVIC, et. al 2008). A segurança de um probiótico incluem origem documentada, atividade metabólica e ausência de características como patogenicidade, infecciosidade e fatores de virulência, incluindo a resistência aos antibióticos (SAARELA et al., 2000; MUÑOZ et al., 2014; RUBIO et al., 2014). Recomenda-se o isolamento e desenvolvimento de probióticos associados ao hospedeiro, pois as bactérias autóctones são mais persistentes no intestino e podem ser mais eficazes do que outros probióticos comerciais não associados ao hospedeiro (RIDHA e AZAD, 2016; DOAN et al., 2018).

Os probióticos são parte integrante das práticas de aquicultura para obter um alto rendimento da produção (CAPILLO et al., 2018; HOSSEIN et al., 2018). A aplicação de probióticos na nutrição, beneficia o crescimento, modulação imunológica, resistência a

doenças, imunização e outras vantagens em peixes (ANJUGAM et al., 2018; VAN DOAN et al., 2018; ELUMALAI et al., 2019).

## 1.2 PROBIÓTICOS NA AQUICULTURA

O aumento da demanda no mercado por proteína animal, fez com que a piscicultura crescesse radicalmente, passando de uma atividade semi-intensiva para mais intensiva, gerando um ambiente de alto estresse tornando os animais mais susceptíveis a patógenos indesejados ou patógenos mais resistentes, causando transtorno no sistema imunológico aumentando a suscetibilidade a doenças bacterianas e parasitárias (HARIKRISHNAN et al. 2011; KIM et al., 2014; TELLI et al., 2014).

Embora existam inúmeras bactérias patogênicas, algumas delas são de ocorrência frequente e apresentam maior impacto econômico na produção comercial de peixes cultivados, como: *Aeromonas spp*, *Edwardsella spp*, *Flavobacterium columnare*, *Francisella spp*, *Streptococcus spp* (LEIRA., 2016; ZHANG et al., 2018; XU et al., 2019).

Para resolver a questão das doenças, surge então a administração preventiva ou terapêutica de antibióticos (HOSEINIFAR et al., 2017). A prevenção e o tratamento de doenças infecciosas no cultivo de tilápias incluem vacinas, antibióticos e quimioterápicos (ABARIKE et al., 2018). No entanto, a aplicação de antibióticos e quimioterápicos causou muitos problemas, como o surgimento de microrganismos resistentes a medicamentos e resíduos químicos, podendo se acumular nos tecidos dos animais pondo em risco a saúde humana (KERSARCODI-WATSON et al., 2008; TELLI et al., 2014). Para isso a vacinação foi instituída como a maneira mais eficaz de prevenir algumas doenças infecciosas, pois melhora a resposta imune nos peixes, contudo, observa-se, que, a vacina em peixes enfrenta algumas limitações: (1) Vacinas eficazes não foram desenvolvidas para alguns patógenos. (2) Uma única vacina é um agente contra um tipo de patógeno (ARDO et al. 2008).

Dentro deste contexto, a utilização de probióticos, prebióticos, simbióticos, entre outros têm recebido atenção por parte dos pesquisadores como possíveis substitutos dos antibióticos (MENTEN e PEDROSO 2005). Recentemente, novas estratégias surgiram como alternativas para prevenção de doenças e melhor desempenho na aquicultura, entre elas, os probióticos têm recebido grande atenção, pois podem ser administrados como aditivos à dieta ou simplesmente adicionados à água (ARAÚJO et al., 2017; DOAN ET AL., 2018; NAWAZ et al., 2018).

Segundo FERREIRA et al (2012) o uso de probióticos na aquicultura, vem sendo utilizado na perspectiva de substituírem os antibióticos, que na condição de combater as enfermidades apresentam um aumento da seleção de patógenos indesejáveis mais resistentes. A aplicação de probióticos na nutrição, crescimento, modulação imunológica, resistência a doenças e outras vantagens foram percebidas em estudos realizados por (ANJUGAM et al., 2018; VAN DOAN et al., 2018; ELUMALAI et al., 2019) quando testados em peixes.

Conforme NAKANDAKARE, et al., (2013) a inclusão de bactérias probióticas na dieta de peixes podem ser realizadas misturando-se, tanto, o pó (probiótico liofilizado) na ração na forma farelada/triturada para alimentar larvas e pós-larvas, como também misturada antes ou depois da peletização, em que não haja temperaturas superiores a 60°C, no processamento.

Nesse contexto, para controlar possíveis patógenos, melhorar a eficiência alimentar e fortalecer a saúde dos peixes é o uso de bactérias probióticas (GATESOUBE, 1989; GATESOUBE, 1991; MAEDA, 1992; CARNEVALI et al., 2004; CARNEVALI et al., 2006).

### **1.3 MONITORAMENTO DE PRODUTO COMERCIAL DE PROBIÓTICOS**

Para o uso comercial, esses microrganismos para serem usados requerem uma triagem e uma seleção, atendendo todas às necessidades de segurança, tecnológicas, funcionais e fisiológicas (MORELLI, 2007; VASILJEVIC, *et al.* 2008). A segurança de um probiótico incluem origem documentada, atividade metabólica e ausência de características como patogenicidade, infecciosidade e fatores de virulência, incluindo a resistência aos antibióticos (SAARELA et al., 2000; MUÑOZ et al., 2014; RUBIO et al., 2014).

Segundo a legislação brasileira, para os aditivos probióticos beneficiar saúde ao ser humano, a Anvisa estabelece concentrações mínimas de  $10^8$  a  $10^9$  UFC de microrganismos por grama de produto. Esses aditivos, necessitam de uma previa avaliação segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa nº 241, de 26 de julho de 2018, contempla três elementos: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do microrganismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico, devem estarem em concentrações adequadas para atingir os resultados almejados, e devem estar registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como aditivo probiótico (ANVISA, 2008, MAPA, 2018).

**Tabela 1:** Aditivos aprovados pelo MAPA para uso na alimentação animal

<b>FAMÍLIA</b>	<b>GÊNERO</b>	<b>ESPÉCIE</b>
<b>Trichocomaceae</b>	<i>Aspergillus</i>	<b>ORYZAE</b>
<b>Bacillaceae</b>	<i>Bacillus</i>	<b>AMYLOLIQUEFACIENS</b>
<b>Bacillaceae</b>	<i>Bacillus</i>	<b>CEREUS</b>
<b>Bacillaceae</b>	<i>Bacillus</i>	<b>COAGULANS</b>
<b>Bacillaceae</b>	<i>Bacillus</i>	<b>LICHENIFORMIS</b>
<b>Bacillaceae</b>	<i>Bacillus</i>	<b>PUMILUS</b>
<b>Bacillaceae</b>	<i>Bacillus</i>	<b>SUBTILLIS</b>
<b>Bifidobacteriaceae</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<b>ANIMALIS</b>
<b>Bifidobacteriaceae</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<b>BIFIDUM</b>
<b>Bifidobacteriaceae</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<b>LONGUM</b>
<b>Bifidobacteriaceae</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<b>PSEUDOLONGUM</b>
<b>Bifidobacteriaceae</b>	<i>Bifidobacterium</i>	<b>THERMOPHILUM</b>
<b>Clostridiaceae</b>	<i>Clostridium</i>	<b>BUTYRICUM</b>
<b>Enterococcaceae</b>	<i>Enterococcus</i>	<b>FAECALI</b>
<b>Enterococcaceae</b>	<i>Enterococcus</i>	<b>FAECIUM</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Pediococcus</i>	<b>ACIDILACTICI</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>ACIDILACTICI</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>CASEI</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>PARACASEI</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>REUTERI</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>HELVETICUS</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>RHAMNOSUS</b>
<b>Lactobacillaceae</b>	<i>Lactobacillus</i>	<b>LACTIS</b>
<b>Veillonellaceae</b>	<i>Megasphaera</i>	<b>ELSDENII</b>

Fonte: MAPA, (2019)

#### 1.4 ATIVIDADE DOS PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos vivos capazes de estabelecer, multiplicar e colonizar o intestino do hospedeiro, a fim de promover um equilíbrio benéfico dos microrganismos, inibem a proliferação de agentes nocivos na mucosa intestinal, melhoram a digestibilidade e absorção de nutrientes, como também promovem a síntese de vitaminas e melhoram o desempenho dos animais, aumentando a porcentagem de sobrevivência e a qualidade da água ( NAYAK, 2010; LEE et al., 2013; CHI et al., 2014; MOHAPATRA et al., 2014; WU et al., 2014).

Mesmo não sendo completamente compreendido a atividade dos probióticos na microflora intestinal, o mecanismo de ação dos probióticos pode envolver exclusão competitiva com os microrganismos patogênicos fazendo com que melhore a flora bacteriana intestinal, competição por locais de adesão no trato digestivo, estimulação do sistema imunológico na produção de substâncias inibidoras e melhora na digestibilidade dos alimentos, produzindo enzimas digestivas (MERRIFIELD et al., 2010; GARCIA-MARENGONI et al., 2015; DAWOOD et al., 2017;).

Alguns estudos revelam modulação da histomorfologia intestinal por aditivos alimentares microbianos, com aumento da superfície de absorção das vilosidades (GISBERT et al., 2013) e melhora da barreira epitelial (VASANTH et al. 2015).

A inclusão dessas bactérias no intestino do hospedeiro, irá proporcionar uma competição pela colonização da mucosa intestinal, produzindo substâncias bacteriostáticas e estimulando a produção de bactérias benéficas, ocupando o lugar de bactérias que são prejudiciais ao hospedeiro, reforçando os mecanismos de defesa (SAAD, 2006). Tais bactérias podem ser do gênero *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pseudoaeromonas sp.*, e *Archromobacter sp.* por exemplo, possuem características, de liberar enzimas digestivas, na qual acelera a degradação de componentes orgânicos em determinadas condições (ZHOU et al., 2009). O uso desses microrganismos também tem aplicabilidade como biorremediadores, processo que consiste na degradação, desintoxicação, mineralização e transformação de contaminantes ou matéria orgânica presentes no meio contaminado (AZUBUIKE et al., 2016).

Estudos realizados sugeriu que os probióticos promovem efeito benéfico ao hospedeiro nos processos digestivos, de animais aquáticos, porque as cepas probióticas sintetizam enzimas extracelulares como proteases, amilases e lipases, além de fornecer fatores de crescimento, como vitaminas, ácidos graxos e aminoácidos, como também ajudam na produção de antimicrobianos (HAROUN et al., 2006; BALCAZAR et al., 2015; KIRON, 2015). Sua colonização no intestino é de suma importância, uma vez que esse órgão terá como função de digerir e absorver os alimentos, é fundamental para o equilíbrio osmótico, a regulação endócrina da digestão, o metabolismo e a imunidade (IBRAHEM., 2015).

### **1.5 ADITIVOS PROBIÓTICOS LÍQUIDOS/PÓ**

Os probióticos usados na aquicultura, podem ser encontrados na forma líquida ou pó. A incorporação dessas bactérias (probiótico liofilizado) na ração é realizada antes ou após a peletização, isso porque dessa forma as temperaturas não passam de 60 °C, diferente da extrusão que são superiores a 100°C, outra forma de incorporação é feita com adição de óleo, em seguida postos para secar em estufa ou em temperatura ambiente (FURUYA et al, 2012). A inclusão do probiótico líquido na ração é feita através da homogeneização com água, para depois ser aspergidos na ração, ou homogeneizados em misturadores ou adicionados diretamente na água ( SOUZA et al., 2010; RAMIREZ et al.,

2013; FERREIRA et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; FERREIRA., 2018; NAKANDAKARE et al., 2018).

## 2. REFERÊNCIAS

ABARIKE, E. D.; CAI, J.; LU, Y.; YU, H.; CHEN, L.; JIAN, J.; KUEBUTORNYE, F. K. A. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 82, 229–238, 2018.

ADDO, S.; CARRIAS, A. A.; WILLIAMS, M. A.; LILES, M. R.; TERHUNE, J. S.; DAVIS, D. A. Effects of *Bacillus subtilis* Strains on growth, immune parameters, and *Streptococcus iniae* Susceptibility in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 48, 257–267, 2017.

ALMEIDA JUNIOR W. L. G.; DA SILVA FERRARI I.; DE SOUZA J.V.; BARBOSA A. L., DA COSTA M. M.; MENEZES D. R.; DIAS F. S. Principal criteria for selection of lactic acid bacteria for potential use as probiotics in foods. **African Journal of Microbiology Research**. 9 (10), 671–686, 2015.

ARAÚJO, E. R. L.; BARBAS, L. A. L.; ISHIKAWA, C. M.; DIAS, D. C.; SUSSEL, F. R.; MARQUES, H. L. A.; TACHIBANA, L. Prebiotic, probiotic, and synbiotic in the diet of Nile tilapia post-larvae during the sex reversal phase. **Aquaculture International**, 26, 1–13, 2017.

ARDO LG, YIN P, XU L, VARADI G, SZIGETI Z, JENEY G Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, 275: 26–33, 2008.

ANJUGAM, M.; VASEEHARAN, B.; ISWARYA, A.; GOBI, N.; DIVYA, M.; THANGARAJ, M. P.; ELUMALAI, P. Effect of  $\beta$ -1, 3 glucan binding protein based zinc oxide nanoparticles supplemented diet on immune response and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish and shellfish immunology**, 76, 247-259, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegação de propriedade funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedades funcional aprovadas. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/35903rdc.pdf>. Acesso em: 30 Nov. 2019.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, 180, 2016.

BALCÁZAR, J. L.; SUBIRATS, J.; BORREGO, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1216, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 44, de 15 de Novembro de 2015. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União. Brasília, s. 1. p. 07. 17 Dez. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos->



[agropecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas.pdf](#)>. Acesso em 01 Novembro 2019.

BARBOSA, T. M.; SERRA, C. R.; LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J.; HENRIQUES, A. O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2), 968-978, 2005.

CAPILLO, G.; SAVOCA, S.; COSTA, R.; SANFILIPPO, M.; RIZZO, C.; LO GIUDICE, A.; FAGGIO, C. New insights into the culture method and antibacterial potential of *Gracilaria Gracilis*. **Marine drugs**, 16(12), 492, 2018.

CARNEVALI, O.; ZAMPONI, M.C.; SULPIZIO, R.; ROLLO, A.; NARDI, M.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; CAGGIANO, M.; POLZONETTI, A. M.; CRESCI, A. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development, **Aquaculture International**, 12, 377–386, 2004.

CARNEVALI, O.; DE VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI G.; OLIVOTTO I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.) with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression, *Aquacult. Int.* 258 (1-4) 430–438, 2006.

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F. A.; GONZALEZ, P.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 33(2): 342–349, 2012.

CHI, C.; JIANG, B.; YU, X. B.; LIU, T. Q.; XIA, L.; WANG, G. X.. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. **Fish Shellfish Immunol**, 36: 9-18, 2014.

CRUZ, P. M.; IBANEZ, A. L.; MONROI-HERMOSILLO, O. A.; SAAD, H. C. Use of probiotics in aquaculture. **International Scholar Research Notes Microbiol**, 2012.

DOAN, H. V.; HOSEINIFAR, S. H.; KHANONGNUCH, C.; KANPIENGJAI, A.; UNBAN, K.; KIM, V. V.; SRICHAISO, S. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, 491, 94–100, 2018.

DAWOOD M.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA M.; YOKOYAMA S.; EL BASUINI, M. F.; HOSSAIN, M. S. Dietary supplementation of β-glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, 23(1): 148–159, 2017.

ELUMALAI, P.; PRAKASH, P.; MUSTHAFI, M. S.; FAGGIO, C. Effect of alkoxy glycerol on growth performance, immune response and disease resistance in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in veterinary science**, 123, 298-304, 2019.

FERREIRA, A.; GERHARD, P.; CYRINO, J. E. Diet of *Astyanax paranae* (Characidae) in streams with different riparian land covers in the Passa-Cinco River basin, southeastern Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, 102(1), 80-87, 2012.

FERREIRA, C. M.; ANTONIASSI, N. A. B.; SILVA, F. G.; POVH, J. A.; PONTENÇA A.; MORAES, T. C. H.; SILVA, T. K. S. T.; ABREU, J. S. Características histomorfológicas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 34(12):1258-1264, dezembro 2014.

FERREIRA, A. H. C.; BRITO, J. M. D.; LOPES, J. B.; SANTANA JÚNIOR, H. A. D.; BATISTA, J. M. M.; SILVA, B. R.; AMORIM, I. L. D. S. Probiótico na alimentação de pós-larvas de tilápias-do-Nilo submetidas a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 16(2) 430-43, 2015.

FERREIRA, A. H. C.; LOPES, J. B.; ARARIPE, M. N. B. A.; MONTEIRO, C. A. B.; ANDRADE, F. T. Probiotic addition effect assessment in the diet of fingerling and juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) created in treated sewage. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, 23(4), 665-674. 2018.

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

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; CYRINO, J.E.P. Exigências nutricionais e alimentação em tilápia. In: FRACALOSSO, D.M. e CYRINO, J.E.P. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira-NUTRIAQUA. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia aquática, 2012. **Gráfica e Editora Copiart Ltda**. p. 255-268, 2012.

GARCIA-MARENGONI, N.; CÉZAR DE MOURA, M.; ESCOCARD DE OLIVEIRA, N. T.; BOMBARDELLI, R. A.; MENEZES-ALBUQUERQUE, D. Uso de los probióticos *Bacillus cereus* var. *toyoi* y *Bacillus subtilis* C-3102 en la dieta de juveniles de tilapia del Nilo cultivada en jaulas. **Latin american journal of aquatic research**, 43(3), 601-606, 2015.

GATESOUBE, F.J. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L, in: N. De Paw, E. Jaspers, H. Ackefors, N. Wilkins (Eds.), *Aquaculture – A Biotechnology in Progress*, European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, 1989.

GATESOUBE, F. J. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. **Aquaculture**, 96(3-4), 335-342, 1991.

GISBERT E.; CASTILLO M.; SKALLI A.; ANDREE K. B.; BADIOLA I. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. **Journal of Animal Science** 91, 2766–2774, 2013.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, 317 (1-4), 1-15, 2011.

HAROUN. E. R.; GODA. A. S.; KABIR. A. M.; CHOWDHURRY, M. A. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance

and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, 37: 1473–80, 2006.

HE, S.; ZHANG, Y.; XU, L.; YANG, Y.; MARUBASHI, T.; ZHOU, Z.; YAO, B. Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀×*Oreochromis aureus* ♂. *Aquaculture*, 412–413, 125–130, 2013.

HOSEINIFAR, S. H.; SUN, Y. Z.; CAIPANG, C. M. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: An updated view. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1380-1391, 2017.

HOSSEIN, S.; YOUSE, S.; CAPILLO, G.; PAKNEJAD, H.; KHALILI, M.; TABARRAEI, A.; VAN DOAN, H.; SPANÒ, N.; FAGGIO, C. Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebra fish (*Danio rerio*) fed on *Gracilariagracilis* powder. *Fish Shell and fish Immunol.* 83, 232–237, 2018.

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of advanced research**, 6(6), 765-791, 2015.

JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, FAO/WHO, 11 p. April 30 and May 1, 2002.

KIM, T.; LEE, J.; FREDRIKSSON, D. W.; DECEW, J.; DRACH, A.; MOON, K. Engineering analysis of a submersible abalone aquaculture cage system for deployment in exposed marine environments. **Aquacultural engineering**, 63, 72-88, 2014.

KERSARCODI-WATSON, A., H.; KASPAR, M. J.; LATEGAN, M. J.; GIBSON, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1-14, 2008.

LEE, N.-K., KIM, S.-Y., CHOI, S.-Y., & PAIK, H.-D Probiotic *Bacillus subtilis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, 22: 1–5, 2013.

LEE, J., S. RHEEM, B. YUN, AHN, Y. JOUNG, J. LEE, S.J. OH, S. CHUN, T. RHEEM, I. YEA, H.S. LIM, K.S. CHA, J.M. KIM, S. Effects of probiotic yoghurt on symptoms and intestinal microbiota in patients with irritable bowel syndrome International. **Journal of Dairy Technology**, 66: 243-255, 2013.

LEIRA, M. H.; DE ASSIS LAGO, A.; BOTELHO, H. A.; MELO, C. C. V.; MENDONÇA, F. G.; NASCIMENTO, A. F.; DE FREITAS, R. T. F. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil, Uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, 3(1), 44-59, 2016.

LODDI, M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.32, p.51-56, 2001.

MAEDA, M.; LIAO, I. C. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**, 25-29, 1992.

MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia do probióticos. *Anais-vol. 1*, 41-47, 2005.

MERRIFIELD D.L.; DIMITROGLOU A.; FOEY A.; DAVIES S. J.; BAKER R.T.M.; BOGWALD J.; CASTEX M.; RINGO E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302, 1–18, 2010.

MIDHUN, S. J.; NEETHU, S.; ARUN, D.; VYSAKH, A.; DIVYA, L.; RADHAKRISHNAN, E. K.; JYOTHIS, M. Dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* HGA8B improves growth parameters, enzymatic profile and gene expression of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, 505, 289-296, 2019.

MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**, 17(11): 1278-1283, 2007.

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; PRUSTY, A.; PANIPRASAD K.; MOHANTA. K. Beneficial effects of dietary probiotics mixture on hemato-immunology and cell apoptosis of *Labeo rohita* fingerlings reared at higher water temperatures. PLoS ONE, 9(6): 1-9, 2014.

MUÑOZ, M. C. C.; BENOMAR, N.; LERMA, L.L.; GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. **International journal of food microbiology**, 172, 110-118, 2014.

NAKANDAKARE, I. B., IWASHITA, M. K. P., de Carla, D., & ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, 39(2), 121-135, 2013.

NAKANDAKARE, I. B.; IWASHITA, M. K. P.; DIAS, D.C.; TACHIBANA, L.; PAIVA, M. J. T. R.; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto De Pesca**. São Paulo. 39(2), 121-135, 2018.

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

NAWAZ, A.; JAVAID, A. B.; IRSHAD, S.; HOSEINIFAR, S. H.; XIONG, H. The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. **Fish and Shellfish Immunology**, 76, 272–278, 2018.

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

RAMIREZ, N. B.; SEIFFERT, W. Q.; VIEIRA, F. N.; MOURIÑO, J. L. P.; JESUS, G. F. A.; FERREIRA, G. S.; ANDREATTA, E. R. Dieta suplementada com prebiótico, probiótico e simbiótico no cultivo de camarões marinhos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 48, n. 8, p. 913-919, Agosto 2013.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. Efeitos de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciências e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RIDHA, M. T.; AZAD, I. S. Effect of autochthonous and commercial probiotic bacteria on growth, persistence, immunity and disease resistance in juvenile and adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, 47(9), 2757–2767, 2016.

RUBIO, R.; JOFRÉ, A.; MARTÍN, B.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. **Food Microbiology**, 38, 303-311, 2014.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; vol. 42, n. 1, jan./mar. 2006

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; SANDHOLM, T. M. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, 84(3): 197-215, 2000.

SPINOSA, M.R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; DE FELICE, M.; MORELLI, L.; POZZI, G.; OGGIONI, M.R. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Research in Microbiolog.** 151(5): 361 e 368, 2000.

SOUZA, R. M.; MOURIÑO, J. L.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C. C.; ANDREATTA, E. R.; SEIFFERT, W. Q.; CERQUEIRA, V. R. Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). **Boletim do Instituto da Pesca**. São Paulo. 30(1), 17-24, 2010.

TELLI, G. S.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; D. CARLA DIAS, D.; SUSSEL, F. R.; ISHIKAWA C. M.; TACHIBANA, L. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. **Fish and Shellfish Immunol.**, 39: 305-311, 2014.

TUOHY, K.M.; PINART-GILBERGA, M.; JONES, M.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. **Journal of applied microbiology**, 102(4), 1026-1032, 2007.

VAN DOAN, H.; HOSEINIFAR, S. H.; FAGGIO, C.; CHITMANAT, C.; MAI, N. T.; JATURASITHA, S.; RINGO, E. Effects of corncob derived xylo oligosaccharide on innate immune response, disease resistance, and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture**, 495, 786-793, 2018.

VASANTH G, KIRON V, KULKARNI A, DAHLE D, LOKESH J AND KITANI Y. A microbial feed additive abates intestinal inflammation in Atlantic salmon. **Frontiers in Immunology**, 6, 409, 2015.

VASILJEVIC, T. SHAH, N. P. Probiotics-from Metchnikoff to bioactive. **Internacional Dairy Journal**, 18 (7): 714-728, 2008.

VIEIRA, L. Q.; PENNA, F. J.; FILHO, L. A. P.; NICOLI, J. R. Uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções e inflamações gastrintestinais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 17, n. 1/2, p. 45-53, 2007.

VIEIRA, B. B.; PEREIRA, E. L. Potencial dos probióticos para o uso na aquicultura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p 1223-1241, 2017.

YANG, G.; PENG, M.; TIAN, X.; DONG, S. Molecular ecological network analysis reveals the effects of probiotics and florfenicol on intestinal microbiota homeostasis: An example of sea cucumber. **Scientific reports**, 7(1), 1-12, 2017.

WANG, Y. (Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*CtenopharyngodonIdella*) fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 17. p 372-378, 2011.

WU, H. J.; SUN, L. B.; LI, C. B.; LI, Z. Z.; ZHANG, Z.; WEN, X. B.; HU, Z.; ZHANG, Y. L.; LI, S. K. Enhancement of the immune response and protection against *Vibrio parahaemolyticus* by indigenous probiotic *Bacillus strains* in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Fish Shellfish Immunol**, 41: 156- 162, 2014.

XU, J.; XIE, Y. D.; LIU, L.; GUO, S.; SU, Y. L.; LI, A. X. Virulence regulation of cel-EIIB protein mediated PTS system in *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia. **Journal of Fish Diseases**, 42, 11–19, 2019

ZHANG, Q.; YU, H.; TONG, T.; TONG, W.; DONG, L.; XU, M.; WANG, Z. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructo oligosaccharide enhance the growth, non-specific immunity of juvenile ovate pompano, *Trachino tusovatus* and its disease resistance against *Vibrio vulnificus*. **Fish and Shellfish Immunology**, 38: 7–14, 2014.

ZHANG, Z.; LAN, J.; LI, Y.; HU, M.; YU, A.; ZHANG, J.; WEI, S. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. **Microbial Pathogenesis**, 122, 39–45, 2018.

ZHOU, Q.; LI, K.; JUN, X.; BO, L. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource technology**, 100 (16), 3780-3786, 2009.

## Artigo

### Artigo: Inclusão de aditivo *Bacillus subtilis* e blend de bactérias em dietas para tilápia do Nilo

#### RESUMO

Objetivo-se avaliar a inclusão de dois tipos de probiótico comercial sendo um blend de bactérias e o outro contendo apenas *Bacillus Subtillis* em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. Foram investigados o efeito destes produtos sobre o desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos, concentração de glicose, morfologia dos vilos intestinais e histomorfometria dos núcleos dos hepatócitos do fígado. Foram utilizados 96 juvenis, com peso médio inicial de  $4,87 \pm 0,64$  g e  $6,50 \pm 0,2$  cm de comprimento total, distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com capacidade de 18 L e com oito peixes em cada unidade experimental em um período de 53 dias, alimentados com diferentes tratamentos: (C) Controle; (BB) ração com blend de bactérias; (BS) ração com *Bacillus subtilis*. Entre os grupos que receberam e o grupo que não recebeu probióticos não diferiram no desempenho zootécnico da tilápia do Nilo entretanto para comprimento intestinal médio teve diferença entre os tratamentos. Para os parâmetros hematológicos, verificou-se diferença entre os grupos tratados para o número de eritrócitos, onde o grupo tratado com BB teve os maiores valores a frente do grupo controle e grupo tratado somente com BS, porém não teve alteração para os outros parâmetros sanguíneos. Na análise da composição centesimal não foi observado diferença significativa entre os tratamentos. As histomorfometrias das vilosidades intestinais foram maiores para BB em altura e largura dos vilos, porém na espessura da túnica foi maior no grupo tratado com BS. Nas análises histomorfométrica dos núcleos dos hepatócitos, os peixes tratados com BB teve maiores valores para área ( $\mu\text{m}^2$ ), perímetro ( $\mu\text{m}$ ) e volume ( $\mu\text{m}^3$ ) dos núcleos. Os probióticos *B. subtilis* e o blend de bactérias, incluídos na dieta para tilápia do Nilo, não produziu diferenças significativas no desempenho zootécnico, composição centesimal e hematologia, mas modificou a estrutura do intestino e células do fígado.

**Palavras chave:** Aquicultura, Aditivo, Desempenho, Probiótico, Tilapicultura.

## Inclusion of additive *Bacillus subtilis* and blend of bacteria in diets for Nile tilapia

### ABSTRACT

The objective is to evaluate the inclusion of two types of commercial probiotics being a blend of bacteria and the other containing only *Bacillus Subtillis* in diets for Nile tilapia juveniles. The effect of these products on zootechnical performance, hematological parameters, glucose concentration, intestinal villus morphology and histomorphometry of liver hepatocyte nuclei were investigated. 96 juveniles were used, with an initial average weight of  $4.87 \pm 0.64$  g and  $6.50 \pm 0.2$  cm in total length, randomly distributed in 12 tanks with a capacity of 18 L and with eight fish in each experimental unit in a period of 53 days, fed with different treatments: (C) Control; (BB) feed with bacteria blend; (BS) feed with *Bacillus subtilis*. Between the groups that received and the group that did not receive probiotics did not differ in the zootechnical performance of tilapia-do-Nile however for mean intestinal length there was a difference between the treatments. For the hematological parameters, there was a difference between the groups treated for the number of erythrocytes, where the group treated with BB had the highest values ahead of the control group and the group treated only with BS, but had no change for the other blood parameters. In the analysis of the centesimal composition no significant difference was observed between the treatments. The histomorphometries of intestinal villi were higher for BB in height and width of the villi, but in the thickness of the tunic was higher in the group treated with BS. In the histomorphometric analysis of hepatocyte nuclei, fish treated with BB had higher values for area ( $\mu\text{m}^2$ ), perimeter ( $\mu\text{m}$ ) and volume ( $\mu\text{m}^3$ ) of nuclei. The probiotics *B. subtilis* and the bacteria blend, included in the Nile tilapia diet, did not produce significant differences in zootechnical performance, centesimal composition and hematology, but modified the structure of the intestine and liver cells.

**Keywords:** Aquaculture, Additive, Performance, Probiotic, Tilapiculture.



## 1. INTRODUÇÃO

A produção de pescado no Brasil através da aquicultura vem aumentando a cada ano na frente dos outros setores de produção de alimento de origem animal, sendo uma forma de gerar renda, emprego, segurança alimentar para população e sustentabilidade para o meio ambiente. Segundo a FAO (2018) a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a quarta espécie mais produzida no mundo, devido o vasto conhecimento sobre sua biologia e o avanço nas novas tecnologia desenvolvida para criação de peixes.

No Brasil os principais produtores de pescado são os estados do Paraná, Rondônia, São Paulo, Mato Grosso e Santa Catarina (IBGE, 2018). Estes estados vêm crescendo na produção de alimento e se destacando no território nacional (IBGE, 2017). Entre estes estados o Paraná é principal produtor de Tilápia do Nilo, principalmente na sua região oeste, onde se concentra a maior produção do país (SCHULTER e VIEIRA FILHO, 2017; IBGE, 2018).

Com o crescimento no setor aquícola, começaram a utilizar os antibióticos para combater as enfermidades e melhorar a produção, contudo, alguns microrganismos ficaram resistente a estes antibióticos, por falta de conhecimento técnico para uso ideal e/ou indiscriminado dos fármacos (DA COSTA et al., 2008; AMARANTE et al., 2018; KHATI et al., 2018). Em contrapartida ao surgimento destes problemas, o desenvolvimento de estudos com uso de aditivos probióticos mostrou-se importante para aquicultura. Atualmente na criação de peixes o uso de bactérias probióticas estão desempenhando papel importante no desenvolvimento e metabolismo dos peixes (RIBEIRO et al., 2008; REGO et al., 2012; FERREIRA et al., 2015; IBRAHEM, 2015).

Os probióticos agem no desempenho dos peixes aumentando a digestão dos alimentos, diminuindo o estresse em sistema de alta densidade e melhorando o sistema imunológico, além disso, reduz a quantidade de composto nitrogenados e fosforo da água de cultivo (IBRAHEM, 2015).

Porém, no mercado existem vários produtos de probiótico, podendo ser comercializados em forma de líquido ou em pó, contendo uma bactéria ou várias bactérias em sua composição. No entanto, os dois tipos são usados na criação de peixes devido a seus pontos positivos. O produto líquido é mais fácil para o piscicultor incorporar na ração e na água de cultivo como biorremediador (VAN HAI, 2015), enquanto, que o produto em pó precisa de mais técnica para misturar o probiótico na ração, pois precisa utilizar uma porcentagem de 2% a 3% óleo vegetal ou animal em relação com o peso da ração, contudo,

as duas formas de apresentação do produto precisam de orientação técnica (CARVALHO et al., 2011; NAKANDAKARE et al., 2013). Vale ressaltar que segundo (BRITO et al., 2014) ainda não existem um tipo de composição ideal de probiótico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar dois tipos de probiótico comercial, sendo um blend de bactérias e o outro contendo apenas *Bacillus Subtilis* em de juvenis de tilápia do Nilo.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Material biológico e procedimentos**

Foram utilizados 96 juvenis de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*, com peso médio inicial de  $4,87 \pm 0,64$  g e  $6,50 \pm 0,2$  cm de comprimento total, distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com capacidade de 18 L e com oito peixes em cada unidade experimental, com renovação de água constante. O experimento foi realizado no laboratório de aquicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) campus de Toledo-PR, durante o período de 54 dias. O sistema utilizado era independente, mantinha um fluxo de água sem a reutilização, com fonte de oxigenação contínua promovida por um soprador de ar central conectado por mangueiras porosas e pedras porosas em cada aquário, a drenagem era realizada com mangueira de 40mm no período da tarde.

A alimentação dos peixes foi realizado quatro vezes ao dia até saciedade aparente, com ração comercial extrusada (tamanho 2,0 mm e 35% de proteína bruta), onde os peixes foram submetidos aos tratamentos controle (C) não contendo probiótico; (BB) ração com blend de bactérias; (BS) ração com probiótico *Bacillus subtilis*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e composto por três tratamentos e quatro repetições.

A composição da ração fornecida no rotulo de fabricante foi: farelo de milho desengordurado, milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), metionina, lisina, antifúngico, premix vitamínico e mineral. Na tabela 1 encontram-se os níveis de garantia da ração comercial.

**Tabela 2:** Níveis de garantia apresentado no rótulo da ração comercial.

Níveis de Garantia			
<b>Umidade</b>	120,0 g/kg	<b>Vitamina B6</b>	6,0 mg/kg
<b>Proteína bruta</b>	350,0 g/kg	<b>Vitamina B12</b>	10,0 µg/kg
<b>Extrato etéreo</b>	50,0 g/kg	<b>Biotina</b>	0,5 mg/kg
<b>Matéria fibrosa</b>	50,0 g/kg	<b>Antioxidante</b>	120,0 mg/kg
<b>Matéria mineral</b>	80,0 g/kg	<b>Ác. Nicotínico</b>	30,0 mg/kg
<b>*Energia bruta</b>	4.127,5 kcal/kg	<b>Ác. Pantotênico</b>	10,0 mg/kg
<b>Calcio (mínimo)</b>	10,5 g/kg	<b>Ác.Fólico</b>	0,5 mg/kg
<b>Calcio (máximo)</b>	15,0 g/kg	<b>Ferro</b>	40,0 mg/kg
<b>Fosforo</b>	5.000,0 mg/kg	<b>Cobre</b>	8,0 mg/kg
<b>Vitamina C</b>	450,0 mg/kg	<b>Manganês</b>	70,0 mg/kg
<b>Vitamina A</b>	8.000,0 UI/kg	<b>Zinco</b>	50,0 mg/kg
<b>Vitamina D3</b>	2.100,0 UI/kg	<b>Iodo</b>	1,2 mg/kg
<b>Vitamina E</b>	100,0 UI/kg	<b>Selênio</b>	0,12 mg/kg
<b>Vitamina K3</b>	3,0 mg/kg	<b>Colina</b>	500,0 mg/kg
<b>Vitamina B1</b>	2,0 mg/kg		
<b>Vitamina B2</b>	4 mg/kg		

**Fonte:** Kowalski: Ração para peixe. \*Energia bruta calculada de acordo com o valor do calor de combustão de 9,44; 4,11 e 5,64 kcal/g para lipídeos, carboidratos e proteínas, respectivamente (BLAXTER, 1989).

A mensuração da temperatura (°C) da água foi diariamente pela tarde. Sendo observado os parâmetros, tais como pH, oxigênio dissolvido (mg/l) e condutividade elétrica(µs/cm) da água e sólidos totais dissolvidos(mg/l), que foram mensurados com um multiparametro (Hanna HI98196), sempre antes do sifonamento dos tanques.

Utilizou-se dois tipos de probióticos comerciais. O probiótico comercial em pó (liofilizado) utilizado nessa presente pesquisa, continha um blend de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus* e *Lactococcus lactis*) na concentração de  $1,25 \times 10^8$  UFC/g. Efetivou-se o procedimento para a inclusão nas rações experimentais pelo método de aspersão, misturando-se em 3% de óleo de soja referente ao peso da dieta, para melhorar a estabilidade. Enquanto o probiótico comercial líquido, apresentava em sua composição a bactéria (*Bacillus subtilis*) na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC/ml, sendo acrescentada em um teor de 2,5 ml/ kg da ração experimental, conforme recomendado pelos fabricantes. Ambas foram homogeneizada por 10 minutos.

No início e final do experimento foi realizada a biometria para obtenção das medidas individuais de peso e comprimento total dos peixes, que posteriormente foram empregadas no cálculo e avaliação das variáveis zootécnicas. Foram determinados por: Sobrevivência (SO) = (n° de peixes no final/número de peixes inicial) x 100; Ganho de peso (GP) = peso final - peso inicial; Eficiência alimentar (EA)= (ganho de peso(g)/consumo de ração (g)) /100; Taxa de crescimento específico (TCE)= (ln peso final - ln peso inicial) / tempo de experimento) x100; Índice viscerossomático (IVS)= (peso das vísceras/peso corporal) x100; Índice hepatossomático (IHS)= (peso do fígado/ peso corporal) x100.

## **2.2 Análise centesimal**

A composição corporal foi realizada no laboratório de qualidade de alimento (Lqa) com peixes inteiro de cada tratamento. Onde foi realizada a pré-secagem das amostras biológica em temperatura de 55° C durante 72 horas em estufa com ventilação forçada. Após a secagem, passaram por uma moagem em moinho, com objetivo de analisar a umidade, extrato etéreo, proteína bruta e matéria mineral, segundo a Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1995) e o carboidrato de acordo com SILVA e QUEIROZ (2002).

## **2.3 Amostras biológicas**

No final do experimento três peixes de cada unidade experimental por tratamento foram anestesiados com eugenol diluído na água (100 mg L<sup>-1</sup>) para os procedimentos de coletas de amostras de sangue dos peixes, utilizando seringas de 1,0 ml banhadas com anticoagulante EDTA (3,0%). O sangue foi coletado por meio de punção caudal, sendo armazenado em eppendorf individual para cada indivíduos e duas lâminas por indivíduos foram empregadas para confecção do esfregaço do sangue para posteriores análises hematológicas. Posteriormente foram mensurados o comprimento total e o peso total com uma trena métrica e uma balança de precisão (0,001g), além disso, foram retirados o intestino, fígado para serem mensurados peso e comprimento e a gordura visceral com materiais cirúrgicos (tesoura, pinça e bisturi), os órgãos de cada peixe foram colocados em placa de Petri para avaliação dos índices somáticos.

O intestino e o fígado foram conservados em Alfac durante 24 horas e posteriormente transferida para o álcool 70 até o momento do processamento histológico.

## 2.4 Hematologia

O número de eritrócitos foi contado através de uma câmara de Neubauer pelo método de hemocítômetro, utilizando-se o líquido de Hayem (1:200) em pipeta automática, sendo os valores obtidos utilizados para calcular o número total de leucócitos.

A contagem diferencial e total dos leucócitos foi através de duas lâminas por peixe de cada tratamento, realizado o esfregaço do sangue e em seguida coradas com corantes hematológicos com May-Grünwald Giemsa. A contagem e identificação das células foi através de microscópio (P1 *Olympus* BX 50, Manila, Filipinas), na objetiva de 100 vezes e percorrendo toda a lâmina em “zig-zag” conforme descrito por TAVARES-DIAS e MORAES (2004). Para contagem diferencial foram contadas 200 células, sendo estabelecido um percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos. Na contagem total foram contadas 2000 células e identificando o número de leucócitos.

Para realizar a análise bioquímica plasmática da glicose ( $\text{mg. dL}^{-1}$ ) de cada peixe, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por cinco minutos e depois conservadas em eppendorf em um freezer, para ser analisado com o uso de “kit de glicose” específicos (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil) através do método Enzimático-colorimétrico, conforme as instruções do fabricante.

## 2.5 Histológicas

Os intestinos e fígados foram preparados no Laboratório de histologia do Gemaq, na UNIOESTE/Campus Toledo/PR. Amostras do intestino médio e do fígado foram desidratadas em série ascendente de álcoois (70%, 80%, 90%, 100 I %, 100% II, 100% III), diafanizadas em xilol, e colocadas em parafina histológica, para a realização dos cortes semisseriados de  $7\mu\text{m}$ .

Para a coloração das lâminas do intestino e fígado foram preparadas uma lâmina por indivíduo, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), para as análises da morfologia dos vilos e morfometria dos núcleos dos hepatócitos.

As análises dos cortes histológicos foram realizadas em Microscópio óptico (P1 *Olympus* BX 50, Manila, Filipinas), acoplado a câmera BEL Capture, utilizando as objetivas de 40X e 100X para as capturas de imagens dos cortes de intestino e fígado respectivamente. Um sistema de análises de imagens Eureka 3.0 Plus foi utilizado para mensuração dos vilos e dos núcleos dos hepatócitos.

A histomorfometria das vilosidades intestinais foi realizada medindo a altura de dez vilosidades (da base para o topo) e a largura das dobras (próximas à região do

ápice) por amostra, e a espessura da túnica muscular (músculo liso) em dez pontos por amostra, usando 40x e Lente 100x. A histomorfometria foi realizada de acordo com Rodrigues et al. (2017), a partir de cinco fotos selecionadas aleatoriamente com uma ampliação de 1000x. A área ( $\mu\text{m}^2$ ), perímetro ( $\mu\text{m}$ ), e o diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) dos núcleos dos hepatócitos foram mensuradas em 50 células aleatoriamente por lâminas para calcular o volume do núcleo do hepatócito  $V_{nh} (\mu\text{m}^3) = 4/3 \pi.r^3$ , onde  $r$  é o raio nuclear segundo (STRÜSSMANN et al., 1990).

## 2.6 Estatística

Todos os dados obtidos no experimento foram submetidos aos testes de normalidade, homocedasticidade e quando constatada distribuição normal, com à análise de variância unifatorial (One-way ANOVA), e posteriormente o teste de comparação de médias de Tukey. Para os dados que não seguiram distribuição normal, foram realizadas as transformações (Log, Raiz e Rank), e quando a normalidade não pode ser atendida, aplicou-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado nos testes foi de 5% e todas foram realizadas utilizando-se o Software STATISTICA 7.0.

## 3. Resultados e Discussão

Foram registradas às variáveis físico-químicas da água, de temperatura  $25\pm 1^\circ\text{C}$ ; pH  $7,0\pm 1,0$ ; oxigênio dissolvido  $5,0\pm 1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ; sólidos totais dissolvidos =  $223\pm 98 \text{ mg/L}$  e a condutividade elétrica =  $352\pm 173 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Entre os tratamentos e ao longo do experimento não apresentaram diferenças que pudessem interferir nos resultados obtidos, pois os mesmos permaneceram dentro da faixa ideal recomendada para produção de peixes de clima tropical (BOYD, 1990; SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Analisando o desempenho zootécnico da tilápia do Nilo, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no peso médio final, no ganho de peso e comprimento do intestino (Tabela 3). GUIMARÃES et al. (2019) testando *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* em larvas de tilápia do Nilo durante a fase de inversão sexual, não constaram efeito significativo no desempenho, os mesmos autores relatam que alguns probióticos requerem um agente estressor para demonstrar os seus efeitos benéficos. Porém BRITO et al. (2019) ao testar cepas probióticas comercial (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides*, *megatherium*) por 30 dias em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com desafio sanitário, não encontraram resultados que

puddessem expressar diferenças estatísticas no ganho de peso entre os tratamentos. Porém em um trabalho realizado por ALY et al. (2008) ao utilizar probiótico comercial (*B. pumilus* e Organic Green™) no cultivo de tilápias do Nilo submetidas a infecção por *Aeromonas hydrophila* ( $10^8$  bactérias mL<sup>-1</sup>), por 2 meses de cultivo obteve resultado significativo no ganho de peso.

A sobrevivência dos juvenis de tilápia do Nilo não diferiu entre os tratamentos, assim como a taxa de crescimento específico. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por ALBUQUERQUE (2011) ao adicionar na alimentação probióticos para juvenis de tilápia do Nilo, linhagem GIFT e AZEVEDO et al., (2016) ofertando prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui em duas densidades de estocagem. Já RAMIREZ et al. (2016) ao testar o efeito da inclusão de probióticos microencapsulado (*Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa* e *Lactobacillus delbueckii*) em tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.), em concentração de  $1,2 \times 10^5$  UFC/g, encontraram resultados positivos ( $p < 0,05$ ) para taxa de sobrevivência e taxa de crescimento específico, o mesmo ainda afirma que o uso de microorganismos endógenos, melhora o desempenho zootécnicos em peixes.

A adição do blend de bactérias e *Bacillus subtilis* também não influenciaram ( $p > 0,05$ ) os índices hepatossomático e viscerossomático entre os tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo submetida ao blend de bactérias e *B. subtilis*.

Variáveis	Tratamentos			Valor-p
	C	BB	BS	
PMI (g)	4,87±0,64	4,91±0,80	5,09±0,29	NS
PMF (g)	22,83±4,90	23,85±	21,40±3,81	NS
CI(cm)	34,60±6,50	36,99±6,97	32,45±7,86	NS
SO (%)	81,25±16,13	78,12±27,71	68,75±16,13	NS
CAA(g)	1,62±0,39	1,98±0,84	1,99±0,56	NS
GP(g)	17,95±5,14	18,94±1,37	16,31±3,82	NS
EA	0,10±0,02	0,09±0,01	0,09±0,01	NS
TCE (%)	2,83±0,54	2,93±0,16	2,63±0,35	NS
IVS (%)	4,88±0,63	5,06±1,54	4,23±0,43	NS
IHS (%)	1,56±0,67	1,53±0,17	2,08±0,70	NS

Valores apresentados como média ± desvio padrão para dados normalmente distribuídos. C = tratamento controle; BB = adição de blend de bactérias; BS = adição de probiótico *B. subtilis*; NS= não houve diferença significativa; \*= diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis. Peso Inicial (PMI); Peso Final (PMF); Comprimento do intestino (CI); Sobrevivência (SO); Conversão Alimentar Aparente (CAA); Ganho de Peso (GP); Eficiência Alimentar (EA); Taxa de Crescimento Específico (TCE); Índice Viscerosomático (IVS); Índice Hepatossomático (IHS).

A inclusão de probiótico comercial adicionados à dieta para juvenis de tilápia do Nilo, não influenciou, na composição centesimal para umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral (Tabela 4). Este trabalho está de acordo com o encontrado por ALBUQUERQUE et al. (2015) que também não observaram diferenças para proteína bruta, extrato etéreo, umidade e matéria mineral ao adicionar dois produtos comerciais *B. subtilis* C-3102 e *Bacillus cereus* var. *Toyoi* em juvenis de tilápia, variedade gift.

Logo Schwarz et al. (2016) encontraram diferenças, somente para proteína bruta na composição corporal em juvenis de tilapa do Nilo com a inclusão de 0,25% levedura *S. cerevisiae*.

**Tabela 4.** Composição centesimal da tilápia-do-Nilo durante 54 dias de experimento com adição de probióticos.

Variáveis	Inicial	Tratamento			Valor-p
		C	BB	BS	
Umidade (%)	79,52±0,02	76,46±0,02	76,76±0,04	76,05±0,005	NS
Proteína bruta (%)	11,82±0,02	12,45±0,15	12,21±0,35	13,16±0,22	NS
Extrato etéreo (%)	5,13±0,08	5,79±0,10	5,51±0,17	5,67±0,10	NS
Matéria mineral (%)	3,40±0,08	3,58±0,06	3,62±0,01	3,79±0,02	NS

Valores apresentados como média ± desvio padrão para dados normalmente distribuídos. C = tratamento controle; BB = adição de blend de bactérias; BS = adição de probiótico *B. subtilis*; NS= não houve diferença significativa pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis.

Nenhum efeito foi verificado nos números de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Além disso, para concentração de glicose também não foi observado diferença (Tabela 5). Já para os número de eritrócito a análise de variância evidenciou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados. Para o grupo com blend de bactérias foi observado maiores números de eritrócitos do que os grupos Controle e *B. subtilis*, porém não é possível afirmar causa ou implicação dessa diferença entre os dois grupos tratados com blend de bactérias e *B. subtilis*. Porém COSTA et al. (2014) observou valores superiores ao do presente trabalho, ao adicionar diferentes fontes de óleos na alimentação de tilápia do Nilo. Já PÁDUA et al. (2013) notou uma redução nos níveis de eritrócitos entre os grupos tratados ao testar dois anestésicos para o manejo de tambaqui (*Colosoma Macropomum*). Entretanto diferente destes trabalhos citados no presente estudo não houve diferenças nos demais parâmetros sanguíneos.



**Tabela 5.** Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo submetida ao blend de bactérias e *B. subtilis*.

Variáveis	Tratamento			Valor-P
	C	BB	BS	
Eritrócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2,7x10 <sup>6</sup> ±2,0x10 <sup>6</sup> ab	3,3x10 <sup>6</sup> ±1,5x10 <sup>6</sup> a	1,6x10 <sup>6</sup> ±5,2x10 <sup>5</sup> b	*
Leucócitos( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2,6x10 <sup>5</sup> ±210846	2,5x10 <sup>5</sup> ±116071	1,5x10 <sup>5</sup> ±51214	NS
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2,6x10 <sup>5</sup> ±210234	2,4x10 <sup>5</sup> ±115050	1,5x10 <sup>5</sup> ±50636	NS
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	1522±1058	2523±1336	2526±1379	NS
Neutrófilos( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2035±1413	2755±1502	3103±2186	NS
Glicose (mg/dL)	0,0688±0,0440	0,0472±0,0157	0,0420±0,0167	NS

Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para dados normalmente distribuídos. C = tratamento controle; BB = adição do blend de bactérias; BS = adição de *B. subtilis*; NS= não houve diferença significativa; \*= diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis.

A análise do intestino revelou diferença significativa na altura e largura dos vilos dos tratamentos com *B. subtilis* em relação ao blend de bactérias e controle, já para a espessura da túnica o grupo tratado com o Mix probiótico teve o maior valor médio em relação ao que recebeu probiótico com *B. subtilis* (Tabela 6). Segundo AZEVEDO et al. (2016) a capacidade de absorção do intestino está ligada ao tamanho e o número das vilosidades, sendo essas estruturas modificadas por fatores antinutricionais ou microorganismos, evidenciando um desequilíbrio e alteração nos vilos.

As vilosidades são estruturas que podem sofrer alterações em sua morfologia e histologia, em função dos ingredientes que compõem a dieta (SCHWARZ et al. 2011). Essas alterações no comprimento das vilosidades e larguras do vilos, irá proporcionar melhor absorção de nutrientes (CASPARY, 1992; BATISTA et al., 2016).

Em estudo realizado por MELLO et al. (2013) foi observado que o incremento de 4,0g kg<sup>-1</sup> de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* na dieta de juvenis de tilápia, promoveu um maior percentual de sobrevivência relativa no grupo tratado de (89,47%) em relação ao grupo controle (76,61%), ocasionados pelo aumento da altura e largura das vilosidades, o que aumentou a área de absorção. Resultados significativos para altura dos vilos e espessura do epitélio também foram encontrados por (CARVALHO et al., 2011) ao adicionar pré (0,5% de MOS), e probióticos (4,15 X 10<sup>7</sup> UFC de *Bacillus subtilis*) na alimentação de juvenis de tilápias do Nilo. SILVA (2014), REDA e SELIM (2015) também perceberam mudanças na vilosidades ao adicionarem probiótico em ração comercial para tilápia-do-Nilo cultivada em tanque-rede. WANG et al. (2017) observaram

melhora no estado imunológico em tilápias do Nilo, após serem tratados com *Bacillus cereus* na água e na ração.

O Tempo de alimentação, os tipos de microorganismos utilizado e a quantidade administradas, são fatores que interferem no sucesso do uso do probiótico para a dieta (KHOJASTEH, 2012 e RAMOS et al. 2017).

No presente estudo foi observado uma túnica mais espessa no tratamento com blend de bactérias, diferente dos tratamentos que continha *B. subtilis* e controle. Destaca-se que para esse estudo, os animais utilizados, não foram submetidos a desafios. No presente estudo mesmo constatado uma diferença significativa na morfologia do intestino, isso não foi o suficiente para alterar dados de desempenho zootécnico, ou parâmetros imunológicos.

SHIRAISHI et al. (2009), identificou um aumento na túnica muscular de 3,3% em frangos submetidos a infecção por *Toxoplasma gondii*, sendo esse estrato um importante indicador imunológico. BAUER (2008) ressalta que macrófagos e leucócitos contidos na túnica muscular de roedores, são responsáveis pela expulsão de endotoxinas secretadas por microrganismos patogênicos.

**Tabela 6.** Parâmetros morfológicos do intestino de tilapia do Nilo submetida à blend de bactérias e probiótico *Bacillus subtilis*.

Variáveis	Tratamentos			valor-p
	C	BB	BS	
Altura dos vilos(µm)	183,19±76,41ab	112,35±20,81b	209,19±72,42 <sup>a</sup>	*
Largura dos vilos (µm)	90,34±27,60b	42,57±7,52c	94,83±11,40 <sup>a</sup>	*
Espessura da túnica(µm)	20,90±8,92c	30,07±4,75a	21,18±3,21b	*

Valores apresentados como média ± desvio padrão para dados normalmente distribuídos. T0 = tratamento controle; T1 = adição de blend de bactérias; T2 = adição de *B. subtilis*; \*= houve diferença significativa pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis.

Nas análises morfometrias dos núcleos dos hepatócitos de tilapia do Nilo, o tratamento que continha blend de bactérias, obteve maiores valores para as variáveis mensuradas, área (µm<sup>2</sup>), perímetro (µm) e volume (µm<sup>3</sup>) dos núcleos dos hepatócitos apresentaram diferença significativa (p<0,05) entre os tratamentos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Característica morfométrica dos núcleos dos hepatócitos de tilápia do Nilo submetida ao blend de bactérias e *B. subtilis*.

Variáveis	Tratamentos			valor-p
	C	BB	BS	
Perímetro do Núcleo ( $\mu\text{m}$ )	8,49 $\pm$ 0,53b	8,96 $\pm$ 0,69a	8,01 $\pm$ 0,71c	*
Área do Núcleo ( $\mu\text{m}^2$ )	18,08 $\pm$ 2,26b	20,14 $\pm$ 3,06a	15,40 $\pm$ 2,11c	*
Volume do núcleo ( $\mu\text{m}^3$ )	41,21 $\pm$ 7,44b	47,97 $\pm$ 10,63a	34,48 $\pm$ 9,43c	*

Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para dados normalmente distribuídos. T0 = tratamento controle; T1 = adição de blend de bactérias; T2 = adição de probiótico *B. subtilis*; \*= houve diferença significativa pelo teste de Tukey e Kruskal-Wallis.

Segundo CABALLERO et al. (2004) e RASKOVIC et al. (2011), o aumento do tamanho do núcleo dos hepatócitos foram observados por elevados níveis de proteína e lipídios na dieta, revelando alterações no metabolismo e o aparecimento de necrose hepática ou esteatose. Proteína na dieta em excesso, necessitará de maiores níveis de energia para serem metabolizadas, e a parte não metabolizada se concentrará em forma de gordura no fígado, sobrecarregando suas funções (ALMEIDA et al. 2011). Já RODRIGUES et al. (2017) constataram a redução no metabolismo dos hepatócitos, ao submeter híbrido de surubim a uma dieta inadequada, e por consequência a diminuição da área do núcleo. Da mesma forma CABALERRO et al. (2004) viu alterações histológicas ao aumentar níveis de óleo de soja em rações para “sea bream” (*Sparus aurata* L.), resultando no aparecimento de esteatose nos hepatócitos.

O fígado é fundamental para o metabolismo dos nutrientes e nos dá respostas do estado nutricional em peixes, essas alterações podem ser resultado de uma dieta desbalanceada, exposição a substâncias químicas ou drogas, respondendo com adaptações, lesão ou morte celular (BOLLA et al., 2011; RASKOVIC et al., 2011; HONORATO et al., 2014).

#### 4. Conclusão

De acordo com os dados coletados, não há diferenças significativas entre aplicar apenas *B. subtilis* ou o blend de Bacterias, mesmo sendo observado diferenças significativas na estrutura do intestino e nas células do fígado entre os grupos.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, D. M. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 em dietas para e alevinos de tilápia do Nilo, linhagem GIFT. ALMEIDA, L. C.; AVILEZ, I. M.; HONORATO, C.A.; MORAES, G. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, 17(2), e253-e262, 2011.
- ALMEIDA L. C.; AVILEZ I. M.; HONORATO C. A.; MORAES G. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed diets level of protein and lipid. *Aqua. Nutr.* 17:283-262, 2011.
- ALBUQUERQUE, D. M.; MARENGONI, N. G.; MAHL, I.; MOURA, M. C.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; RIBEIRO, R. P.. *Bacillus cereus* var. *toyoi* e *Bacillus subtilis* C-3102 em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, linhagem GIFT. **Bioscience Journal**. v. 31, n. 2, p. 532-540, 2015.
- ALY, S.M.; MOHAMED, M.F.; JOHN, G. Effect of probiotic on the survival, growth and challenge infection in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) **Aquaculture Research**, v.39, n.6, p. 647-656, 2008.
- AMARANTE, J. F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A. I.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M., AMARANTE, T. A. B. Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. **Ciência Animal Brasileira**, 19(1): 1-7, 2018.
- AZEVEDO, R. V.; FOSSE FILHO, J. C.; PEREIRA, S. L.; CARDOSO, L. D.; JÚNIOR, M. V. V.; ANDRADE, D. R. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51(1), 9-16, 2016.
- BAUER, A. J. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility, **Neurogastroenterol Motility**, v. 20 pg.81-90, 2008.
- BOLLA, S.; NICOLAISEN, O.; AMIN, A. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) female. Histological and biochemical aspects. **Aquaculture**, v. 312, n. 1-4, p. 117-125, 2011.
- BOYD, C. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama: Birmingham. p. 482, 1990.
- BRITO, J. M.; FERREIRA, A. H. C.; JÚNIOR, H. A. S.; OLIVEIRA, A. P. A.; SANTOS, C. H. L.; OLIVEIRA, L. T. S. Desempenho zootécnico de juvenis de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com cepas probióticas e submetidos a desafio sanitário. **Ciência Animal Brasileira**, 20, 1-9, 2019.
- BATISTA, S; MEDINA, A; PIRES, M.A; MORINIGO, M.A; SANSUWAN, K; FERNANDES, J.M.O; VALENTE, L.M.P; OZÓRIO, R.O.A. Innate immune response, intestinal morphology and microbiota changes in Senegalese sole fed plant protein diets with probiotics or autolysed yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 16, p. 7223-7238, 2016.

CABALLERO, M. J.; IZQUIERDO, M. S.; KJØSVIK, E.; FERNÁNDEZ, A. J.; ROSENLUND, G.; Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L. caused by short-or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal of Fish Diseases**. v. 27, p. 531-541, 2004.

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

CASPARY W.F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 55:299-308, 1992.

COSTA, D. V. D.; FERREIRA, M. W.; NAVARRO, R. D.; ROSA, P. V.; MURGAS, L. D. S. Parâmetros hematológicos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de óleo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 15(3), 754-764, 2014.

DA COSTA, M. M.; PEIXOTO, R. D. M.; DE LIMA, C.; BOIJINK, L. C.; MEURER, F.; DE VARGAS, A. C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(10):477-480, 2008.

DE BRITO, J. M.; FERREIRA, A. H. C.; JUNIOR, A.; ARARIPE, M.; LOPES, J.; DUARTE, A.; RODRIGUES, V. 2014 Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes, revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**, 11(1): 3070-3084, 2014.

FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals.

FERREIRA, A. H. C.; BRITO, J. M. D.; LOPES, J. B.; SANTANA JÚNIOR, H. A. D.; BATISTA, J. M. M.; SILVA, B. R.; AMORIM, I. L. D. S. Probiótico na alimentação de pós-larvas de tilápias do Nilo submetidas a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 16(2) 430-43, 2015.

GUIMARAES, M. C.; DE CARLA DIAS, D.; DE ARAUJO, F. V. A. P.; ISHIKAWA, C. M.; TACHIBANA, L. Probiotic *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* in diet of Nile tilapia. **Boletim do Instituto de Pesca**, 45(1), 2019.

GUTIÉRREZ RAMIREZ, L. A.; DAVID RUALES, C. A.; MONTOYA CAMPUZANO, O. I.; BETANCUR GONZALEZ, E. Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). **Revista de Salud Animal**, 38(2), 112-119, 2016.

HONORATO, C. A., CRUZ, C. D., CARNEIRO, D. J., MACHADO, M. R., NASCIMENTO, C. A., & SATURNINO, K. C. Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 64-68, 2014.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2018; Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Acesso em: 23 out 2019.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, 2017. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2017\\_v45\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf) Acesso em: 23 out 2019.

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of advanced research**, 6(6): 765-791, 2015.

KHATI, A.; CHAUHAN, R. S; NAZIR, I. ARYA, P. Improved fish health: Key to succesful aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 6(2): 898-902, 2018.

KHOJASTEH, S. M. B. The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: A brief review. **International Journal of Aquatic Science**, 3, 71–88, 2012.

MELLO, H. DE; JULIETA R. E. DE M.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R. DE; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; ENGRACIA FILHO, J.R.; CLAUDIANO, G. S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(6),724-730, 2013.

MOLINA, G.; PELISSARI, F. M.; FEIRHMANN, A. C. Consequências da desnutrição protéica para o trato gastrointestinal. *Arquivos Do Museu Dinâmico Interdisciplinar*, 13(1/2/3), 12-24, 2013.

NAKANDAKARE, I. B.; IWASHITA, M. K. P.; DIAS, D. D. C.; TACHIBANA, L., RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, 39(2): 121-135, 2013.

PÁDUA, S. B. D.; DIAS NETO, J.; SAKABE, R.; CLAUDIANO, G. D. S.; CHAGAS, E. C.; PILARSKI, F. Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48(8), 1171-1174, 2013.

RAMOS, M. A.; BATISTA, S.; PIRES, M. A.; SILVA, A. P.; PEREIRA, L. F.; SAAVEDRA, M. J.; REMA, P. Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *animal*, 11(8), 1259-1269, 2017.

RAŠKOVIĆ, B. S.; STANKOVIĆ, M. B.; MARKOVIĆ, Z. Z.; POLEKSIĆ, V. D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences** 56: 87-100, 2011.

REDA, R.; SELIM, K. Avaliação de *Bacillus amyloliquefaciens* na composição desempenho de crescimento, morfologia intestinal, hematologia e corpo de tilápia, *Oreochromis niloticus*. **Aquicultura International**, 21 (1): 203-217, 2015.

REGO, M.; SILVA, E.; CALAZANS, N.; VOGLEY, J.; NERY, R.; SOARES, R.; PEIXOTO, S. Utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão Branco *Litopenaeus vannamei*. *Atlântica (Rio Grande)*, 34(2):137-143, 2012.

RIBEIRO, P. A. P.; COSTA, L. S.; LOGATO, P. V. R. Probióticos na aquicultura. **Revista Nutritime**, 6(1):837-846, 2008.

RODRIGUES, R. A.; SATURNINO, K. C.; FERNANDES, C. E. Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming. **Aquaculture Research**, 48(9), 5083-5093, 2017.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia (No. 2328). Texto para Discussão, 2017.

SCHWARZ, K. K.; NASCIMENTO, J. C.; GOMES, V. A. A.; SILVA, C. H.; SALVADOR, J. G.; FERNANDES, M. R.; NUNES, R. M. Desempenho zootécnico de alevinos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com levedura de *Saccharomyces cerevisiae*. *Holos*, 3 (1): 104-113, 2016.

SHIRAIISHI, C. S.; AZEVEDO, J. F. D.; SILVA, A. V. D.; SANT'ANA, D. D. M. G.; ARAÚJO, E. J. D. A. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, 39(7), 2146-2153, 2009.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 235, 2002.

SILVA, T. F. A.; PETRILLO, T. R.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARCUSO, P. F.; DA SILVA CLAUDIANO, G.; DE MORAES, F. R.; DE MORAES, J. R. E. Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 43(5), 963-971, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. S. Limnologia aplicada à aquicultura. Jaboticabal: Funep, p. 72, 1995.

STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). **Journal of Fish Biology**, v. 36, n. 1, p. 59-65, 1990.

VAN HAI, N. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. **Fish and Shellfish Immunology**, 45(2):592–597, 2015.

WANG, M.; LIU, G.; LU, M.; KE, X.; LIU, Z.; GAO, F.; YU, D. Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, 48(6): 3163-3173, 2017.