

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

**MARIANA LINS RODRIGUES**

Suplementação de Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para  
*Rhamdia quelen* e seus efeitos no desenvolvimento reprodutivo e  
zootécnico

Toledo  
2021

**MARIANA LINS RODRIGUES**

Suplementação de Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para  
*Rhamdia quelen* e seus efeitos no desenvolvimento reprodutivo e  
zootécnico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Altevir Signor

Toledo

2021

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

Rodrigues, Mariana Lins

Suplementação de Probiótico (Bacillus cereus e Bacillus subtilis) em dietas para Rhamdia quelen e seus efeitos no desenvolvimento reprodutivo e zootécnico / Mariana Lins Rodrigues; orientador(a), Altevir Signor, 2021.

97 f.

Tese (doutorado), 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, 2021.

1. Nutrição de peixes. 2. Probiótico. 3. Rhamdia quelen. 4. Piscicultura. I. Signor, Altevir . II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**MARIANA LINS RODRIGUES**

Suplementação de Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para *Rhamdia quelen* e seus efeitos no desenvolvimento reprodutivo e zootécnico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

---

Prof. Dr. Altevir Signor  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

---

Prof. Dr. Fábio Bittencourt  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dr. Aldi Feiden  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dra. Micheli Zaminhan Hassemer  
Universidade de Mogi das Cruzes

---

Prof. Dr. Diogo Bessa Neves Spanghero  
Universidade Federal de Alagoas

Aprovada em: 10 de Março de 2021.

Local de defesa: Banca realizada de forma remota.

*A minha querida mãe dona Lica, que sempre será o meu maior exemplo de mulher, força de vontade, amor incondicional, dedicação e honestidade.*

## **Agradecimentos**

À Deus, por ser o farol e guia em minha vida.

A minha querida e amada mãe *Lica* que representa tudo em minha vida, maior fonte de força e luta. Gratidão!

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo amor, incentivo e apoio constante.

Ao meu orientador Prof. Dr. Altevir Signor, um grande amigo e pai científico, sou infinitamente grata pelo incentivo, generosidade e confiança de sempre! Muito obrigada!

Ao Grupo de Estudos em Manejo na Aquicultura – GEMAAq pelo acolhimento e oportunidade de vivenciar grandes momentos, criar laços de amizade e compartilhar conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Bittencourt pela grande amizade, confiança e incentivos a vida acadêmica. As correções e sugestões nas pesquisas desenvolvidas, assim como as críticas construtivas.

Aos professores Dr. Wilson Boscolo e Dr. Aldi Feiden por ensinarem que a simplicidade e a troca de experiências são fundamentais para formação de bons profissionais!

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, em especial a Carla Regina Meurer e Uilian Simões assistentes do programa e a Capes pela bolsa de doutorado concedida.

Aos amigos dos dias de labuta, e em especial ao Ricácio, Bruno, Evandro, Danielle e Matheus, que além da troca de experiências em períodos experimentais e atividades em laboratório, foram criados laços de amizade com esperança, alegria, sorrisos e muito companheirismo, tornando nosso período de pós-graduandos mais leve!

E aqueles que contribuíram direta ou indiretamente ao desenvolvimento deste estudo.

A todos, os meus agradecimentos!

*“Todos estamos fadados à felicidade, à perfeição.  
O caminho a percorrer é longo, às vezes assinalado pela urze ou  
entulhado pelos calhaus.  
Todavia, o roteiro é igual para todos, porque ninguém existe que  
seja considerado como exceção.  
...alegre-te com o destino feliz que te aguarda e te alcançarás”.*

*(Joanna de Ângelis/Divaldo Franco).*

Suplementação de Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para *Rhamdia quelen* e seus efeitos no desenvolvimento reprodutivo e zootécnico

**RESUMO**

Bactérias probióticas atuam no intestino do hospedeiro para o equilíbrio da microbiota, desencadeando diferentes efeitos direcionados a homeostase. Nesse sentido, estudos relacionados ao uso de aditivo probiótico para o jundiá são de extrema relevância para o desenvolvimento produtivo de espécies nativas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de aditivo probiótico (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) em dietas para jundiá *Rhamdia quelen* sobre o desempenho produtivo, reprodutivo e respostas fisiológicas. Foram utilizados 300 juvenis de jundiá com peso inicial médio de  $17,35 \pm 0,97$ g, alimentados durante 90 dias com dietas contendo níveis crescentes do aditivo probiótico (0,15; 0,30; 0,45 e; 0,60 g. Kg<sup>-1</sup> de ração de *B. subtilis* e *B. cereus* nas concentrações de  $4 \times 10^{11}$  UFC) e uma dieta controle. O experimento foi dividido em duas etapas, sendo o ensaio 1: desempenho zootécnico e ensaio 2: desempenho reprodutivo. No desempenho produtivo, a composição centesimal, rendimento de carcaça, parâmetro bioquímicos séricos e estresse oxidativo apresentaram alterações quando utilizado probiótico nas dietas. O desenvolvimento das vilosidades intestinais dos jundiás foi influenciado pela inclusão do aditivo probiótico nas dietas, assim como a atividade de células muco-secretoras no tecido. O crescimento dos hepatócitos apresentou diferenciações quanto aos níveis de probiótico. Na avaliação do desenvolvimento reprodutivo dos peixes, nos machos o aditivo influenciou no volume seminal relativo, sobrevivência dos espermatozoides, índices gonadossomático, hepatossomático e gordura viscerossomática, frequência de batimento transposto, velocidade de deslocamento, taxa de motilidade e retilinearidade. Nas fêmeas, o uso do probiótico influenciou na proporção de fêmeas desovantes, taxa de fertilização e gordura viscerossomática. O uso do probiótico influenciou no desenvolvimento das células germinativas, integridade hepática e características de desenvolvimento dos hepatócitos. Portanto, a inclusão de 0,60g. kg<sup>-1</sup> de probiótico em dietas para jundiás proporciona o desenvolvimento dos peixes, maximizando processos fisiológicos, mantendo a saúde dos animais e melhorando o desempenho produtivo e reprodutivo.

**Palavras-chave:** bactérias não-patogênicas, biotecnologia, espécie nativa, imunomoduladores, piscicultura.

Probiotic supplementation (*Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*) in diets for *Rhamdia quelen* and its effects on reproductive development and productive

**ABSTRACT**

Probiotic bacteria act in the host's intestine to balance the microbiota, triggering different effects directed to homeostasis. In this sense, studies related to the use of probiotic additive for silver catfish are extremely relevant for the productive development of native species. The objective was to evaluate the effect of probiotic additive (*Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*) in diets for silver catfish *Rhamdia quelen* on the productive performance, reproductive and physiological responses. 300 silver catfish juveniles with an average initial weight of  $17.35 \pm 0.97$ g were used, fed for 90 days with diets containing increasing levels of the probiotic additive (0.15; 0.30; 0.45 and 0.60 g. Kg<sup>-1</sup> of feed of *B. subtilis* and *B. cereus* in concentrations of  $4 \times 10^{11}$  CFU) and a control diet. The experiment was divided into two stages, with trial 1: productive performance and trial 2: reproductive performance. In the productive performance, the centesimal composition, carcass yield, serum biochemical parameters and oxidative stress showed changes when using probiotics in diets. The development of the intestinal villi of the silver catfish was influenced by the inclusion of the probiotic additive in the diets, as well as the activity of mucus-secreting cells in the tissue. The growth of hepatocytes showed differences in terms of probiotic levels. In the evaluation of the reproductive development of fish, in males the additive influenced the relative seminal volume, sperm survival, gonadosomatic, hepatosomatic and viscerosomatic fat, frequency of transposed beating, displacement speed, motility rate and rectilinearity. In females, the use of probiotic influenced the proportion of spawning females, fertilization rate and viscerosomatic fat. The use of probiotic influenced the development of germ cells, liver integrity and development characteristics of hepatocytes. Therefore, the inclusion of 0.60g. kg<sup>-1</sup> of probiotic in diets for silver catfish provides the development of fish, maximizing physiological processes, maintaining the health of animals and improving the productive and reproductive performance.

**Keywords:** non-pathogenic bacteria, biotechnology, native species, immunomodulators, fish farming.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1: Revisão de Literatura.....

Figura 1. Mecanismos de ação do probiótico nos peixes e sua relação com os sistemas: imunológico, nutricional e fisiológico (desempenho produtivo e reprodutivo).....11

### Capítulo 2: Efeito do probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) no crescimento e respostas fisiológicas do jundiá (*Rhamdia quelen*).....

Figura 1. Desempenho produtivo e índice viscerossomático em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade.....46

Figura 2. Atividade de estresse oxidativo hepático em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. ....48

Figura 3. Índice de Bernet (A) e alterações celulares no fígado (B) de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....49

Figura 4. Histologia hepática de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. (HE, objetivo 40x). (A) congestão de sinusóides (quadrado preto); (B) melanomacrófago (seta preta); (C) Necrose (estrela); (D) Perda de limite celular (área circular).....50

**Capítulo 3: Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para jundiás (*Rhamdia quelen*) promovem melhoria em sua fisiologia reprodutiva.....**

Figura 1. Parâmetros espermáticos de jundiás (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de probiótico. A- Frequência de batimento transposto (BCF), B- Velocidade média de deslocamento (VAP) 10s pós-ativação. ....78

Figura 2. Parâmetros espermáticos de jundiás (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de probiótico. A- Taxa de motilidade (MOT), B- Retilinearidade (SRT) durante 20s. ....79

Figura 3. Índice de Bernet no fígado de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....81

Figura 4. Histologia hepática de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. (HE, objetivo 40x). (A) congestão de sinusóides (quadrado) e (B) perda de limite celular (área circular).....82

## Lista de Tabelas

### Capítulo 2: Efeito do probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) no crescimento e respostas fisiológicas do jundiá (*Rhamdia quelen*).....

Tabela 1. Composição química calculada e análise centesimal das dietas experimentais contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC para juvenis de jundiá *R. quelen*.....42

Tabela 2. Alterações hepáticas avaliadas em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....44

Tabela 3. Composição centesimal (base da matéria natural) de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926) e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. ....47

Tabela 4. Rendimento de carcaça em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. ....47

Tabela 5. Bioquímica plasmática em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. ....48

Tabela 6. Histomorfometria e histoquímica hepática em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....49

Tabela 7- Histomorfometria e histoquímica do intestino inicial e médio em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....50

**Capítulo 3: Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para jundiás (*Rhamdia quelen*) promovem melhoria em sua fisiologia reprodutiva.....**

Tabela 1. Composição química calculada e análise centesimal da dieta base experimental para a inclusão de níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC para juvenis de jundiá *R. quelen*.....73

Tabela 2. Alterações hepáticas identificadas em jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....77

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos de machos de *R. quelen* alimentadas com ração contendo diferentes níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....78

Tabela 4. Parâmetros reprodutivos de fêmeas de *R. quelen* alimentadas com ração contendo diferentes níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....80

Tabela 5. Histomorfometria gonadal em fêmeas de jundiá (*R. quelen*) alimentadas com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....80

Tabela 6. Histomorfometria hepática de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.....81

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1: Revisão de Literatura</b> .....	10
1. Conceitos e mecanismos de ação dos probióticos .....	10
2. Produção de probiótico.....	13
3. Uso de probiótico em nutrição .....	15
4. Microbiota intestinal de peixes.....	17
5. Uso do Bacillus ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> ).....	18
6. Efeito do probiótico na reprodução de peixes .....	20
7. Espécie nativa: jundiá <i>Rhamdia quelen</i> .....	21
8.Referências .....	24
<b>Justificativa</b> .....	35
<b>Objetivo</b> .....	36
Objetivos geral .....	36
Objetivos específicos .....	36
<b>Capítulo 2: Efeito do probiótico (<i>Bacillus cereus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>) no crescimento e respostas fisiológicas do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)</b> .....	38
<b>1. Introdução</b> .....	40
<b>2. Material e métodos</b> .....	41
<b>3. Resultados</b> .....	45
<b>4. Discussão</b> .....	51
<b>5. Conclusão</b> .....	58
<b>6. Referências</b> .....	58
<b>Capítulo 3: Probiótico (<i>Bacillus cereus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>) em dietas para jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>) promovem melhoria em sua fisiologia reprodutiva</b> .....	69
<b>1. Introdução</b> .....	71
<b>2. Material e métodos</b> .....	72
<b>3. Resultados</b> .....	77
<b>4. Discussão</b> .....	82
<b>5. Conclusão</b> .....	87
<b>6. Referências</b> .....	87
<b>Conclusão da tese</b> .....	92
<b>Considerações finais</b> .....	92

## Capítulo 1. Revisão de Literatura

### 1. Conceitos e mecanismos de ação dos probióticos

Nos últimos anos a aquicultura faz uso dos probióticos como ferramenta alimentar que proporciona melhor eficiência na absorção dos nutrientes das dietas, refletindo no melhor crescimento e, conseqüentemente, na saúde dos peixes (Nayak, 2010).

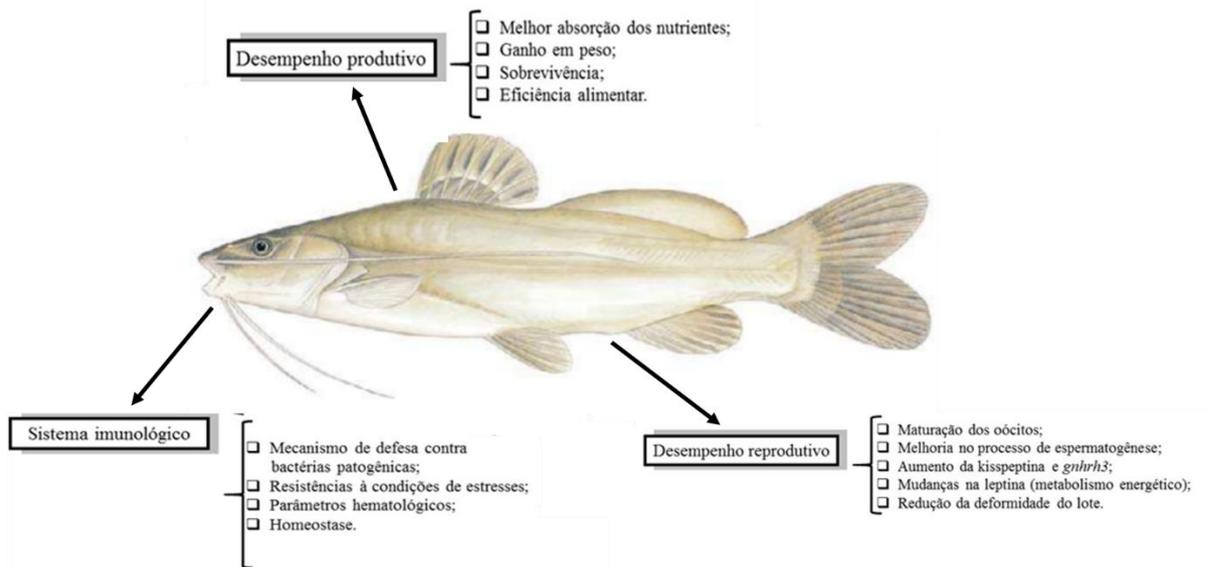
Parker (1974), define inicialmente o termo probiótico como, “Organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal”. Em 1989, o termo foi redefinido por Fuller como “Suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal”, enfatizando a importância de células vivas como um componente essencial de seu efeito.

A FAO/WHO (2001), definem os probióticos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro”. Segundo Schrezenmeir & De Vrese (2001), probiótico deve ser definido como preparações ou produtos viáveis que contenham microrganismos conhecidos em quantidade adequada para modificar a microbiota da mucosa intestinal via implantação ou colonização, produzindo como respostas benefícios a saúde do hospedeiro.

Ao longo do tempo, pôde ser verificado a amplitude de benefícios promovida pelo uso dos microrganismos em todo processo de desenvolvimento animal, ampliando sua definição para “composto de microrganismos vivos que atuam no intestino do hospedeiro proporcionando o equilíbrio da microbiota, com melhores efeitos no bem-estar animal, maior tolerância ao estresse, no sistema imunológico, crescimento, na digestibilidade, absorção de nutrientes e na fecundidade para peixes” (Martínez-Cruz et al., 2012; Mello et al., 2012).

Atualmente, o probiótico é caracterizado como “microrganismos vivos que produzem efeitos úteis sobre o hospedeiro, modificando os padrões associados ou comunidade de microrganismos, proporcionando uma melhor absorção das rações ou aumentando seu valor nutricional e, conseqüentemente, melhorando a resposta do hospedeiro à doença e ainda aumentando a qualidade microbiológica do ambiente exposto” (Ibrahim, 2015).

O mecanismo de ação do probiótico pode apresentar o espectro em três tipos de atividade no organismo: nutricionais, fisiológicos e imunológicos (Figura 1). O reconhecimento das bactérias probióticas pode ocorrer por fatores como a competição por sítios de ligação e nutrientes ou ainda por ativação do sistema imune. Quanto ao hospedeiro, as características genéticas, temperatura corporal, potencial eletroquímico e atividade das enzimas digestivas influenciam na colonização dos microrganismos probióticos (Balcazar et al., 2007).



**Figura 1-** Mecanismos de ação do probiótico nos peixes e sua relação com os sistemas: imunológico, nutricional e fisiológico (desempenho produtivo e reprodutivo). Ilustração adaptada de *Rhamdia quelen*. Fonte: Companhia energética de São Paulo, 2006.

O estabelecimento das bactérias probióticas na mucosa intestinal do hospedeiro ocorre nas etapas de atração aos sítios de adesão, em seguida ocorre a secreção de substâncias de ligação favorecendo a associação das bactérias não patogênicas e finalmente a ligação das células ao tecido (Balcazar et al., 2007).

A competição por nutrientes ocorre entre as bactérias que compõem a microbiota intestinal. A partir da degradação enzimática digestiva as bactérias probióticas se nutrem dos componentes disponíveis, gerando competição por fontes de energia e por locais de adesão, e assim limitando a manutenção das bactérias patogênicas pois diminui o substrato disponível para outras populações bacterianas (Roberfroid, 2000).

Os probióticos atuam na competição física com bactérias patogênicas no trato intestinal inibindo o seu desenvolvimento por bloqueio dos sítios de adesão (receptores ou pontos de ligação), protegendo e regenerando a mucosa intestinal do hospedeiro e assim, contribuindo para seu equilíbrio biológico (Chabrillon et al., 2005; Ringo et al., 2010).

A exclusão competitiva por ativação do sistema imune favorece os mecanismos naturais de defesa via atividade das bactérias probióticas pela produção de substâncias inibitórias, como bacteriocina (peptídeos antimicrobianos), sideróforo (moléculas que interagem com a absorção de íons), lisozimas, proteases (enzimas), ácidos orgânicos: ácido láctico, butírico, propírico, acético e o peróxido de hidrogênio, beneficiando os hospedeiros com

efeitos fisiológicos e imunológicos (Yan et al., 2002; Giorgio et al., 2010; Telli et al., 2014; Ramesh et al., 2015).

A produção de bacteriocinas, substâncias proteicas e antibióticas, apresenta atividade local capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas (Martínez-Cruz et al., 2012). Além disso, também são capazes de secretar enzimas tais como a  $\beta$ -glucuronidase e hidrolases, liberando compostos biliares de ação inibitória sobre as outras bactérias (Preter et al., 2008), e as enzimas amilase, tripsina, protease e lipase, que promovem melhor aproveitamento dos nutrientes das dietas, conseqüentemente melhoram o crescimento dos animais (Yang et al., 2018).

Outras substâncias como os ácidos orgânicos são produzidas pelas bactérias a partir do aproveitamento de nutrientes remanescentes das dietas e estes são direcionados para redução do pH intestinal e neutralização de enterotoxinas, inibindo o crescimento de agentes patogênicos (Jin et al., 1997; Ghadban, 2002; Martínez-Cruz et al., 2012). Além do adequado pH, os probióticos devem manter o equilíbrio microbiano para sobrevivência e estabilidade das bactérias quando expostos a secreção gástrica (Lee et al., 2013), para que assim possam manter o domínio da microbiota intestinal do hospedeiro.

A atividade das bactérias probióticas por apresentar efeito antagonista às demais espécies, proporcionada pela produção de substâncias antimicrobianas e na atuação das enzimas digestivas, promove alterações fisiológicas que impactam no desenvolvimento dos animais (Fontana et al., 2013; Brito et al., 2014).

A modulação do sistema imune a partir da atuação de bactérias probióticas ocorre pela interação molecular e o contato da parede celular das bactérias, que servem como receptores para o reconhecimento de agentes invasores no hospedeiro, promovendo as sinalizações imunes (Oelschlaeger, 2010; Dawood e Koshio, 2016). As respostas imunes são moduladas por bactérias probióticas de linhagens específicas, capazes de atuar na ativação e aumento celular de macrófagos, células T, citocinas e glicoproteínas (Ashraf e Shah, 2014).

A melhora da imunidade inata com o uso de probióticos ocorre pela interferência positiva nas atividades do sistema de complemento sérico sanguíneo, na atuação das lisozimas, no processo de fagocitose celular, atividade respiratória dos leucócitos e na modulação das citocinas liberadas pelas células imunes inatas e adaptativas (Lazado e Caipang, 2014; Srivastava e Pandey, 2015). Assim, os efeitos do probiótico como respostas imunológicas aumentam a resistência dos animais aquáticos em situações de estresse gerado pela rotina da atividade produtiva (Rahiman et al., 2010; Firouzbakhsh et al., 2011; Nimrat et al., 2012).

A suplementação de probiótico nas dietas auxilia no desempenho dos animais, estimula o apetite por promover a melhora na palatabilidade dos ingredientes otimizando seu uso e, conseqüentemente, melhorando a alimentação e ganho em peso (Saenz de Rodriguez et al., 2009; Giorgio et al., 2010; Al- Dohail et al., 2011).

A aquicultura atual tem como propósito aumentar sua produtividade em paralelo ao aprimoramento sustentável dos cultivos; o uso dos probióticos torna-se uma alternativa sustentável, melhorando o crescimento dos animais pois maximiza o aproveitamento dos nutrientes das dietas artificiais, estabiliza o estado de saúde por suas ações e efeitos na microbiota intestinal, respostas fisiológicas, imunidade sistêmica e ainda influencia no equilíbrio da microbiota do ambiente de cultivo (Dawood et al., 2018).

A intensificação nos ciclos produtivos e o aumento na densidade de peixes por área útil gera condições estressantes aos animais, porém, o uso de aditivos capazes de atenuar os prejuízos decorrentes dos estímulos adversos da criação, a exemplo dos probióticos, que promovem impulsos para o sistema imune e na fisiologia do organismo, promove melhor desempenho produtivo dos peixes (Merrifield et al., 2010; Hai, 2015), torna-se uma alternativa altamente viável quando comparado ao uso de produtos químicos e antimicrobianos (Akhter et al., 2015).

No ambiente de cultivo ocorre uma interação entre as células bacterianas do hospedeiro e ambiente por compartilharem o mesmo sistema ecológico (Cahill, 1990). As bactérias probióticas quando inseridas também exercem interação com a composição dos microrganismos estruturais terrestre, da água e da espécie, resultando no aumento da capacidade das bactérias benéficas em contraste das patogênicas (Verschuere et al., 2000).

A microbiota gastrointestinal de espécies aquáticas é particularmente dependente do ambiente de cultivo, pois o fluxo de água faz parte da atividade de alguns órgãos e no caso do trato intestinal ocorre devido à ingestão constante de água no momento da alimentação. As bactérias patogênicas ou não do ambiente também são ingeridas, podendo ser transitório o processo de desenvolvimento no intestino. Por esse motivo, recomenda-se a administração do probiótico desde os estágios larvais das espécies cultiváveis, contribuindo no decorrer dos estágios ontogenéticos (Kapareiko et al., 2011; Ariğ et al., 2013).

## **2. Produção de probiótico**

O controle de qualidade no processo de fabricação dos probióticos tem como premissa o monitoramento, estudo estrutural e a dinâmica da comunidade microbiana *in vivo*. Os microrganismos utilizados como probióticos no setor aquícola devem exercer atividade

antimicrobiana e ainda serem considerados seguros para os animais cultivados, ambiente e em especial ao homem, devido ao processo de manipulação do produto e não ser fonte de contaminação do alimento para o consumidor final (Kesarcodi-Watson, 2008).

No processo de seleção das cepas probióticas as bactérias selecionadas devem apresentar um perfil de segurança, como uma melhor resistência a antibióticos, não transmitir genes de resistência ou plasmídeos de virulência (Moubareck et al., 2005), tolerância a acidez gástrica e toxicidade biliar (Hyronimus et al., 2000). Na produção de probiótico para peixes, a microbiota natural que compõe o trato intestinal dos animais é considerada promissora para seleção de cepas e o desenvolvimento dos aditivos a partir dos processos de identificação, segurança e comprovação de sua eficácia no desenvolvimento dos peixes.

A aplicação combinada de diferentes bactérias na composição de probióticos pode possivelmente produzir maiores benefícios ao hospedeiro, satisfazendo as características intrínsecas do ambiente de cultivo, quando comparado a aplicação individual de bactéria probiótica (Saad, 2006).

Vários grupos probióticos são utilizados atualmente e são categorizados em bactérias vivas, gram-positivas e gram-negativas, algas unicelulares, bacteriófagos e leveduras. Os principais probióticos são: bactérias (*Bacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.* and *Weissella sp.*), microalgas (*Tetraselmis*) e leveduras (*Debaryomyces*, *Phaffia* and *Saccharomyces*) (Gatesoupe 1999; Ibrahim, 2015).

Avaliações subsequentes são realizadas para garantir que as espécies utilizadas na aquicultura estejam identificadas corretamente, garantindo a qualidade e segurança do probiótico (Kesarcodi-Watson, 2008).

Além das técnicas convencionais de avaliações microbiológicas utilizadas na fabricação dos probióticos, atualmente as metodologias de sequenciamento auxiliam na identificação filogenética dos microrganismos probiótico, como também a utilização de ferramentas moleculares (PCR, FISH, DGGE e bibliotecas genômicas), para identificações e análises de atividade das comunidades microbianas, mensurando a viabilidade e vitalidade durante o processamento das cepas, aumentando a confiabilidade de produção (Ben-Amor et al, 2007).

A metodologia de sua preparação do probiótico industrialmente é de fundamental importância, onde inicialmente as bactérias com capacidade probiótica são isoladas do seu habitat convencional e subcultivadas com a utilização de as tecnologias de fermentação, passando por processo de secagem e de microencapsulação das culturas, além disso, são realizados todos os testes de segurança *in vitro* e *in vivo* (Champagne, Gardner, Roy, 2005).

As indústrias aquícolas utilizam-se de tecnologias para proteção e eficiência das bactérias no sistema de cultivo e atualmente os probióticos comerciais estão disponíveis na forma de pó, proporcionando a imobilização das células especialmente pela técnica de microencapsulação (Martínez-Cruz et al., 2012).

No processamento de microencapsulação as células podem ser encapsuladas em diferentes matrizes como o alginato, quitosana, carboximetilcelulose, pectina, entre outros compostos ou polímeros, que tem como objetivo a proteção física e química dos microrganismos probióticos (Li et al., 2009; Burey et al., 2009). Os métodos comumente usados para microencapsulação de probióticos são spray drying, spray-congealing, leito fluidizado/suspensão a ar, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, inclusão molecular e polimerização interfacial coacervação complexa e eletrostático. Possuem diferenciada viabilidade e limitações de resistência das bactérias, características de cada metodologia (Suave et al., 2006; Menezes et al., 2015).

O processo de liofilização, considerado um método físico de encapsulação, também está sendo utilizado atualmente na fabricação de probióticos, e embora apresente um maior custo no processo de produção, possui vantagens para viabilidade, armazenamento e transporte do produto final, garantindo sua eficiência no trato digestivo das espécies aquáticas e, conseqüentemente, melhorando o desempenho da produção (Menezes et al., 2013).

Assim, a capacidade estimuladora dos probióticos pode ser delimitada por fatores como a fonte das cepas, tipo de bactérias, o volume de dose e a duração do tempo de suplementação, além disso, deve haver a manutenção de estabilidade das células bacterianas durante o processo de inoculação na ração, o tempo de armazenamento e o seu transporte (Nayak, 2010; Gabbay, 2012).

### **3. Uso de probiótico em nutrição**

A ascensão aquícola vem modificando o cenário produtivo com a utilização de recursos que direcionem a uma produção sustentável dos animais cultiváveis e a intensificação de pesquisas voltadas para práticas na aquicultura tem sido aplicada para manter altos níveis de produção, fornecendo proteína animal e segurança alimentar para a população mundial (El Basuini et al., 2017; Dawood et al., 2018; FAO, 2018).

A intensificação das práticas de produção levou ao aumento na densidade de animais no ambiente de confinamento, dando origem a condições de estresse, afetando a saúde dos animais e a qualidade da água do cultivo. Além disso, fatores como mudanças de temperatura e

intensidade do manejo, também exercem efeitos imunossupressores e respostas fisiológicas adversas nos peixes (Dawood et al., 2016; Hossaan et al., 2017).

Alternativas seguras e eficazes como o uso de suplementações e aditivos são cada vez mais utilizadas, melhorando eficientemente o desempenho dos peixes, pois apresentam propriedades de imunomodulação, aumentando a eficiência da resposta ao estresse nos organismos cultiváveis (Magnadottir, 2010; Abdelkhalek et al., 2017).

O uso dos probióticos nas dietas vem auxiliar na manutenção da saúde dos peixes e do ambiente de cultivo, refletindo no crescimento ótimo dos animais e ainda por não apresentar efeitos negativos sobre os consumidores (Dawood et al., 2017; Dawood et al., 2018).

A introdução de bactérias probióticas via alimentação torna-se uma ferramenta benéfica para manter o crescimento e funções normais dos animais aquáticos, auxiliando na melhor absorção de nutrientes, vitaminas e atividades digestivas pela atuação de enzimas, apresentando efeito positivo sobre a utilização de alimentos, consequentemente no desempenho dos animais (Dawood et al., 2014; Paixão e Castro, 2016; Nath et al., 2018).

Ressalta-se a importância das bactérias probióticas pela otimização do ambiente de produção, devido aos múltiplos usos da água de cultivo, que além de servir para manutenção vital de processos metabólicos (respiração), consiste também no local de disposição do alimento e depósito das excretas dos animais e, consequentemente, influenciando na homeostase dos peixes.

A suplementação de probiótico nas dietas dos peixes melhora a utilização nutricional dos alimentos devido a produção de enzimas amilases, proteases e lipases, que contribuem nos processos digestivos tornando mais eficiente a absorção de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas (complexo B e ácido fólico), proporcionando melhor desempenho produtivo dos peixes (Irianto & Austin, 2002; Bolasina e Yamashita, 2006; Leblanc, 2011; Shankar et al., 2017).

O efeito do uso de probióticos em dietas para tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* reflete no desenvolvimento produtivo desencadeando melhora em crescimento, sobrevivência e na saúde dos animais. Vários estudos buscaram identificar as ações das bactérias do gênero *Bacillus* em diferentes fases de vida (Apun-Molina et al., 2009; Nakandakare et al., 2013; Garcia-Marengoni et al., 2015).

Em tambaqui *Colossoma macropomum* o emprego dos probióticos *B. subtilis* e o *S. cerevisiae* influenciou no crescimento e composição centesimal, proporcionando ainda aos peixes uma maior resistência a doenças (Azevedo et al., 2016; Paixão et al., 2017). Em peixes ornamentais como o *Danio rerio*, a adição de *L. rhamnosus* nas dietas proporcionou efeitos

benéficos nas atividades específicas de enzimas digestivas, refletindo no crescimento e desenvolvimento reprodutivo dos animais (Gioacchini et al., 2011; Avella et al., 2012).

O procedimento de adição do probiótico nas rações deve ocorrer preferencialmente por aspersão após a extrusão das dietas, pois com o aumento da temperatura durante o processamento o composto probiótico pode perder sua estabilidade. A adição por aspersão pode ser realizada com o uso de óleo vegetal, água ou alginato de sódio, e em seguida, os peletes devem ser secos à 25°C. A incorporação do probiótico pode também ser realizada antes da extrusão das dietas, contudo, o processamento da ração não deve atingir temperaturas superiores a 60 °C (Bucio et al., 2005; Tapia-Paniagua et al., 2010; Dias et al., 2012).

Azevedo et al. (2015), avaliaram a viabilidade econômica da adição de probiótico composto por *B. subtilis* em ração de peixe antes do processo de extrusão, demonstrando sua eficiência de atuação e sem afetar significativamente o custo total da alimentação dos peixes, resultando em índices de eficiência econômica em média 14,92% maior em comparação com a dieta sem o uso do probiótico, considerando o efeito imunestimulante que proporcionou além do aumento de lucro operacional e a melhora nas taxas de sobrevivência dos peixes, devido a ação das bactérias probióticas em alta densidade de estocagem dos animais.

Portanto, o uso de probióticos na piscicultura pode ser considerado uma estratégia sustentável e promissora para a produção de proteína animal de alta qualidade em termos de sanidade e segurança alimentar (Paixão et al., 2017; Jesus et al., 2016; Ibrahim, 2015).

#### **4. Microbiota intestinal de peixes**

Nos organismos aquáticos a composição da microbiota intestinal possui relação direta com o ambiente a que está integrado, logo com a microbiota da água do sistema de cultivo, podendo ainda sofrer alteração por influência de propriedades físicas, químicas e biológicas (Silva et al., 2005; Pauxão et al., 2016).

As bactérias que fazem parte da microbiota dos peixes podem ser caracterizadas como aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias, atuando e contribuindo no desenvolvimento do seu hospedeiro via metabolismo, sistema imune e na resistência a doenças (Nayak, 2010; Makino et al., 2012).

No sistema digestivo, o intestino possui também funções múltiplas relacionadas a atividades metabólicas, imunológicas e respiratórias (Grosell et al., 2011). A mucosa intestinal serve para as bactérias como local de adesão, colonização e proliferação, beneficiando o hospedeiro, influenciando direta e indiretamente diversas funções fisiológicas (Gomez e Balcazar, 2008). A homeostase do intestino baseia-se na interação entre o epitélio, macrófagos

e células imunes (Sansonetie e Medzhitov, 2009), pois o intestino é local de geração de repostas do sistema imune da mucosa.

A relação da interação e a estabilização da comunidade microbiana intestinal fornece ao hospedeiro a produção de enzimas exógenas por bactérias podendo selecionar a composição da dieta ofertada ao hospedeiro, contribuindo para o equilíbrio funcional do sistema digestivo, e conseqüentemente no desenvolvimento dos peixes (Ringø et al., 2010; Nayak, 2010; Ray, Ghosh & Ringø, 2012).

A importância em conhecer a microbiota intestinal dos peixes promove condições de melhorar a qualidade, a aplicabilidade e a funcionalidade do probiótico a ser produzido com a finalidade proporcionar o efeito desejado de sua aplicação nos sistemas de cultivo.

## 5. Uso do *Bacillus* (*B. subtilis* e *B. cereus*)

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias saprófitas, aeróbicas, gram-positivas, em formato de bastonete, formadoras de esporos, encontradas em diversos ambientes como a água, solo, poeira e ar (Madigan et al., 2010).

São bactérias alóctones, ou seja, não são originadas da microbiota gastrintestinal natural dos peixes; os *Bacillus* são capazes de produzir e secretar toxinas, enzimas bacteriolíticas, subprodutos de vias metabólicas primárias, substâncias antibióticas e bactericidas, podendo ser usadas para a prevenção e controle de infecções, sendo poucas espécies consideradas patogênicas (Shulz, Bonelli e Batista, 2005; Liu et al., 2009; Amal e Saad, 2011; Widanarni e Tanbiyaskur, 2015).

Os benefícios do uso de *Bacillus* na piscicultura refletem no desempenho produtivo dos animais, aumento da sobrevivência, imunidade, aumento da resistência a doenças, melhora da conversão alimentar aparente e taxa de eficiência proteica (El-Dakar et al., 2007; Nayak et al., 2007; Bagheri et al., 2008; Merrifield et al., 2010).

As bactérias desse gênero quando incorporadas na alimentação animal são capazes de melhorar a digestibilidade das dietas pela ação dos *Bacillus* que atuam eficientemente na quebra de compostos como carboidratos, lipídios e proteínas em unidades menores (Ochoa-Solano & Olmos-Soto 2006; Bhaskar et al., 2007; Purwandari & Chen, 2013 Ariğ et al., 2013) justamente pela produção de enzimas catalíticas específicas (Martens et al., 2002). Ainda, auxiliam na síntese de algumas vitaminas (K e B12), e possuem a capacidade de produção da enzima fitase que promove a redução de fatores antinutricionais melhorando o aproveitamento do alimento, refletindo em aumento do crescimento dos peixes (Priyodip et al., 2017; Dowarah et al., 2018). Além disso, são consideradas bactérias biorremediadoras pois contribuem para a melhora da

qualidade da água promovendo a diminuição dos compostos nitrogenados tóxicos e matéria orgânica no ambiente de cultivo (Kolndadacha et al., 2011; Devaraja et al., 2013).

Os *Bacillus* têm sido amplamente utilizados como probióticos em formulações comerciais, pois além da maior facilidade de produção em larga escala, a sua inclusão nas dietas torna-se facilitada pela capacidade de esporulação das bactérias por meio da germinação de esporos, proliferação e re-esporulação, fatores característicos do ciclo de resistência quando as bactérias encontram-se em condições adversas (temperatura e pressão), fato que atribui maior resistência das bactérias às enzimas digestivas durante o trânsito intestinal (Hong et al., 2005; Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006; Vieira, 2010).

Dentre as espécies mais pesquisadas na aquicultura para o desenvolvimento de peixes e crustáceos destacam-se os *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (Mohapatra et al., 2013).

#### *Bacillus subtilis*

O uso de *B. subtilis* como probiótico em peixes promove a melhora no sistema imune, crescimento e a assimilação de nutrientes a partir da atividade das enzimas digestivas (Azevedo et al., 2016). Possui efeito bactericida e fungicida, aumenta as respostas imunes do hospedeiro e a resistência a doenças, como por exemplo a *Aeromonas hydrophila* e *Vibrio sp.* (Ramesh & Souissi, 2017). Os principais estudos com probiótico estão relacionados a melhoria da qualidade da água, com o uso de bactérias biorremediadoras que atuam promovendo a redução da composição das populações microbianas patogênicas presentes no meio (Li et al., 2006; Liu et al., 2017).

#### *Bacillus cereus*

Recentemente estudada o *B. cereus* possui ação promotora de crescimento em peixes (Albuquerque et al., 2015; Mohapatra et al., et al., 2013; Nakandakare et al., 2013; Wild et al., 2014), quando adicionado em dietas, a suplementação com células bacterianas melhora a utilização dos nutrientes, refletindo no crescimento, eficiência alimentar e modulação da flora gastrointestinal dos hospedeiros, consequentemente no desempenho adequado dos animais. As cepas bacterianas são suscetíveis a antibióticos e não possuem potencial patogênico, também são utilizadas como biorremediador (Coelho et al., 2015).

O uso de diferentes espécies na composição dos probióticos proporciona atuação contínua dos microrganismos no hospedeiro, pois, utilizando diferentes bactérias benéficas que atuam em diferentes gradientes intestinais, não competem pelos mesmos sítios de adesão e

ligam-se apenas aos que apresentem maior afinidade, proporciona ações múltiplas na fisiologia do hospedeiro, aumentando o efeito positivo no desenvolvimento dos animais.

## 6. Efeito do probiótico na reprodução de peixes

A influência dos probióticos no processo reprodutivo ocorre em especial na interação com o metabolismo energético e com os sensores responsáveis pela regulação dos processos de disponibilidade, como os neuropeptídios do eixo hipófise-hipotálamo-gônadas e mediadores moleculares periféricos (Carnevali, Maradonna & Gioacchini, 2016).

Os probióticos compostos por *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella baltica*, atuam na modulação do metabolismo lipídico em juvenis *Solea senegalensis*, reduzindo os níveis de ácido linoléico e linolênico do fígado (Tapia-Paniagua et al., 2014). Além disso, os níveis de glicose total foram alterados com a atuação do *Lactobacillus rhamnosus*, sugerindo que o metabolismo da glicose também pode ser direcionado para o desenvolvimento dos gametas (Falcinelli et al., 2016).

O benefício proporcionado pelas bactérias probióticas na absorção e síntese dos nutrientes está relacionado com a utilização mais eficiente da energia derivada da alimentação para o desenvolvimento dos animais (Carnevali, Avella & Gioacchini, 2013).

A utilização probiótica de *L. rhamnosus* em zebrafish *D. rerio* adulto beneficiou a maturação dos oócitos e o número de folículos vitelogênicos, alterando o índice gonadossomático e, conseqüentemente, o processo de ovulação das fêmeas. Ocorreu ainda, mudanças na expressão hormonal da leptina, o aumento de kisspeptina e níveis de GnRH3, demonstrando a eficiência de uso do probiótico para o desenvolvimento reprodutivo da espécie. A influência do probiótico ocorreu desde as fases iniciais dos peixes até a maturação sexual, interferindo positivamente no desenvolvimento larval da prole, acelerando o crescimento e a calcificação da espinha dorsal e ainda na antecipação da diferenciação sexual (Carnevali, Avella & Gioacchini, 2013).

No processo de espermatogênese o uso do *L. rhamnosus* induziu a ação de gonadotrofinas exógenas, resultando no aumento em volume e na motilidade espermática da enguia europeia. A estimulação hormonal promovida induziu a atividade das células de Leydig e células de Sertoli, como consequência favorecendo o início do processo de espermatogênese (Vílchez et al., 2015).

A produção de espermina e espermidina foram observadas a partir da utilização da levedura probiótica *Debaryomyces hansenii* no cultivo larval de *Dicentrarchus labrax*. Além disso, ocorreu o aumento significativo nas expressões dos genes kiss1 e kiss2, responsáveis

pelo controle da síntese de GnRH, desencadeando os processos reprodutivos a partir do aumento dos níveis da kisspeptina e a regulação dos níveis de GnRH3 com a administração de *L. rhamnosus* para *D. rerio* (Gioacchini et al., 2010; Giocchini et al., 2014).

Segundo Palermo et al. (2011), como resultado da síntese e absorção das bactérias probióticas, ocorre a influência na interação entre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e o sistema endocanabinóide, ambos envolvidos na modulação das respostas reprodutivas, adaptativas e ingestão alimentar, durante o desenvolvimento de *Solea solea*.

No desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas de *O. niloticus*, os probióticos melhoram o desempenho reprodutivo e as respostas fisiológicas dos peixes adultos, especialmente na produção de hormônios sexuais, desenvolvimento dos testículos e ovários, na qualidade espermática, refletindo na fecundidade relativa e absoluta (Mehrim, Khalil & Hasssan, 2015).

O efeito do uso de probiótico *B. subtilis* na viabilidade e desenvolvimento de embriões, no melhor crescimento, sobrevivência e redução da deformidade no lote tem sido demonstrado para várias espécies ornamentais (Ghosh et al., 2007). A excreção de substâncias pela atividade metabólica de *B. subtilis* age como promotor de substâncias antioxidantes como o SOD e GSH, que refletem na formação de gametas (Yang, Liu e Li, 2007). Apresenta, ainda, efeitos de aumento da fecundidade de fêmeas com uso de probiótico composto por *Lactobacillus acidopholus*, *Lactobacillus casei*, *E. faecium* e *Bifidobacterium thermophilus* (Abasali e Mohamad, 2011).

O uso de *L. rhamnosus* como probiótico influencia no processo de ovulação das fêmeas de *D. rario* e *Fundulus heteroclitus* proporcionando maior taxa de eclosão dos embriões, processo de desenvolvimento embrionário mais rápido, sobrevivência e desempenho produtivo (Gioacchini et al., 2010; Lombardo et al., 2011; Gioacchini et al., 2011). Atua ainda na modulação dos processos de autofagia, apoptose e dorsalização no desenvolvimento das fases iniciais (Miccoli et al., 2015).

## **7. Espécie nativa: jundiá *Rhamdia quelen***

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de bagre que pertence a ordem dos Siluriformes, possui característica de hábito alimentar onívoro com tendência a carnívora, especialmente nas fases iniciais de vida (Rodrigues et al., 2012; Fracalossi e Cyrino, 2013). Possui o trato digestório gastrointestinal simples (Baldisserotto et al., 2014), conseqüentemente apresenta melhor plasticidade a utilização de diferentes tipos de alimentos que podem ser utilizados em rações comerciais (Guerini, Prado e Passos, 2014). Apresenta um ótimo

aproveitamento de fontes proteicas de origem animal e vegetal, recomenda-se o uso de 30% de proteína e aproximadamente 3.250 kcal/kg na composição das dietas para juvenis de jundiá (Freitas et al., 2011).

A espécie possui ampla distribuição geográfica na América Latina, podendo ser encontrada do sudoeste do México a região sul da Argentina. No Brasil é nativa da região Sul do país, sendo considerada endêmica do rio Iguaçu (Freitas et al., 2011; Baldisserotto e Gomes, 2018). Por esta razão, adaptou-se a variadas amplitudes térmicas, apresentando crescimento satisfatório mesmo em períodos frios. O jundiá tolera temperaturas de 15° à 34°C, contudo, seu potencial ótimo produtivo ocorre em temperaturas de até 28,0°C em sistemas de criação (Chipary-Gomes, 2000; Baldissroto, 2002; Fracalossi et al., 2004).

O jundiá tornou-se uma espécie nativa amplamente estudada na piscicultura nacional por apresentar características de crescimento rápido podendo atingir de 600 a 800 g em 8 meses de criação a uma densidade de até 4 peixes m<sup>2</sup>, excelente conversão alimentar (1,3Kg:1,0Kg de peso vivo), ótimo rendimento de carcaça, viabilidade reprodutiva em cativeiro e tolerância ao manejo, fatores relevantes para os modelos de sistemas de criação, adaptando-se satisfatoriamente a tanques-rede ou viveiros escavados da fase de alevino até a terminação (Barcellos et al., 2004; Amaral Junior e Garcia, 2013). Além disso, a boa aceitação no mercado consumidor tem intensificado sua criação (Diemer et al., 2012; Signor et al., 2013; Amaral Júnior et al., 2015; Rodrigues et al., 2017).

Estudos relacionados a nutrição de espécies nativas como o jundiá ainda são reduzidos quando comparados a quantidade de informações pertinentes a espécies comercialmente estabelecidas, contudo, subsídios relativos aos eventos reprodutivos, desenvolvimento larval e desempenho produtivo (Signor et al., 2013; Diemer et al., 2014) são necessários a fim de atender suas exigências nutricionais com a elaboração de dietas completas, consequentemente melhorando seu desempenho zootécnico e resistência a doenças (Radünz Neto e Borba, 2013).

A nutrição de *R. quelen* reflete no desenvolvimento das gônadas, na qualidade dos gametas e consequentemente na viabilidade da prole quando ofertados níveis ideais de proteína bruta, energia digestível e concentração de lipídios nas dietas artificiais (Diemer et al., 2012; Rodrigues et al., 2017; Bittencourt et al., 2018).

No desenvolvimento do sistema digestivo de jundiá, morfologicamente as larvas apresentam características funcionais semelhantes aos juvenis a partir de 15 dias após sua eclosão, pois conseguem se alimentar de fontes exógenas antes da assimilação total do vitelo, sendo capazes de digerir e absorver eficientemente os nutrientes (Hernández et al., 2014).

As diferentes áreas no trato digestivo podem ser identificadas como a presença da cavidade orofaríngea, esôfago, estômago e intestino. As células da muco-secretoras estão distribuídas no esôfago e diferentes porções do intestino, com maior incidência de mucinas neutras em todo comprimento (Hernandez et al., 2009; Hernandez et al., 2014).

A utilização de dietas formuladas com fontes vegetais pode apresentar um menor aproveitamento (Rodrigues et al., 2017; Weiler et al., 2019; Pessini et al., 2019), pois o jundiá mesmo considerado uma espécie onívora, possui o intestino de tamanho reduzido, afetando a digestibilidade dos alimentos e conseqüentemente limitando o uso de ingredientes energéticos ricos em amido. Entretanto, destaca-se a atividade significativa das enzimas amilase e maltase no trato digestivo de jundiá como capacidade adaptativa da espécie quando ofertadas fontes vegetais nas formulações (Oliveira Filho & Fracalossi, 2006; Rodrigues et al., 2017; Gominho-Rosa et al., 2015, Baldisserotto, 2018).

A característica biológica reprodutiva de jundiá destaca-se por apresentar início da maturidade sexual após o primeiro ano de vida, com desova parcelada e períodos de pico no verão e primavera (Montanha et al., 2011; Andrade et al., 2015), facilitando sua reprodução em cativeiro a partir de induções artificiais.

O aumento produtivo do jundiá pode ser influenciado pela produção de monossexo na região Sul do Brasil, incentivando o desenvolvimento de tecnologias que maximizem a produtividade da espécie (Silveira et al., 2013; Poli et al., 2015; Garcia et al., 2017). As fêmeas de jundiá conseguem estocar a energia para o crescimento, sendo maiores que os machos (Amaral et al., 2008), a produtividade comercial pode ser impulsionada com o cultivo monossexo de fêmeas com a administração hormonal nas dietas ofertadas na fase larval de *R. quelen* (Silveira et al., 2013; Garcia et al., 2015).

Dentre os agentes infecciosos que acometem o jundiá destacam-se o parasita *Ichthyophthirius multifiliis*, causando altas taxas de mortalidade (Garcia et al., 2011; Martins et al., 2011), atualmente vacinas contra este parasita estão sendo estudadas para a espécie (Tancredo et al., 2015). Patógenos oportunistas como *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e *Edwardsiella* spp. ocasionam lesões ulcerativas e necrose em jundiá (Costa et al., 2008; Barcellos et al., 2008).

Estudos relacionados ao desenvolvimento de espécies nativas como o jundiá ainda são reduzidos quando comparado a quantidade de informações relacionadas a espécies comercialmente estabelecidas, contudo, informações relacionada as diferentes fases de desempenho produtivo, desenvolvimento larval e os eventos reprodutivos são necessárias a fim de atender suas exigências nutricionais com a elaboração de dietas completas,

consequentemente melhorando seu desempenho zootécnico e resistência a doenças (Signor et al., 2013; Radünz et al., 2013; Diemer et al., 2014).

## Referências

- ABASALI, H. AND MOHAMAD, S. (2010). Effect of Dietary Supplementation with Probiotic on Reproductive Performance of Female Livebearing Ornamental Fish. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2 (2), 11-15.
- ABDELKHALEK, N. K. M., EISSA, I. A. M., AHMED, E., KILANY, O. E., EL-ADL, M., DAWOOD, M. A., ABDEL-DAIM, M. M. (2017). Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 54, 99–104.
- AKHTER, N., WU, B., MEMON, A. M., MOHSIN, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741.
- ALBUQUERQUE, D. M., MARENGONI, N. G., MAHL, I, MOURA, M. C., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P., JULIANA MINARDI GALO, J. M., RIBEIRO, R. P. (2015). *Bacillus* em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, variedade gift. *Biosci. J.*, 31(2), 532-540.
- AL-DOHAIL, M. A., HASHIM, R., ALUYU-PAIKO, M. (2011). Evaluation the use *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish, *Clarias gariepinus*, juveniles. *Aquaculture Research*, 42, 196-209.
- AMAL, M. N. A. AND SAAD, M. Z. (2011). Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J Trop Agric Sci*, 34 (2), 195-206.
- AMARAL JUNIOR, H., GARCIA, S., WARMLING, P. F., SILVA, B. C. & MARCHIORI, N. C. (2015). *Assim cultivamos o Jundiá Rhamdia quelen no estado de Santa Catarina* (1ª ed., 78 p.). EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC, Camburiú, Santa Catarina, BR.
- AMARAL JUNIOR, H., NUNES, M. F. S., GARCIA, S. (2008). Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. *Revista Eletrônica de Veterinária*, 9(2), 1-7.
- AMARAL-JÚNIOR, H. E GARCIA, S. (2013). *O Jundiá Rhamdia quelen - Relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce nativo mais promissor da região sul do Brasil*. (Org.) – 1ª Edição - Camboriú SC. EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC. 60 p.
- APÚN - MOLINA, J. P., SANTAMARÍA- MIRANDA, A., LUNA-GONZALEZ, A., MARTÍNEZ-DÍAZ, S.F., ROJAS-CONTRERAS, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum. *Aquaculture Research*, 40, 887-894.
- APÚN-MOLINA, J. P., SANTAMARÍA- MIRANDA, A., LUNA-GONZÁLEZ, A., MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F., ROJAS-CONTRERAS, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8), 887–894.
- ARIĞ, N., SUZER, C., GÖKVARDA, A., BAŞARAN, F., ÇOBAN, D., YILDIRIM, S., KAMACI, H.O., FIRAT, K., SAKA, S. (2013). Effects of Probiotic (*Bacillus* sp.) Supplementation during Larval Development of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 407-414.
- ASHRAF, R., AND SHAH, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956.
- AVELLA, M. A., PLACE, A., DU, S.-J., WILLIAMS, E., SILVI, S., ZOHAR, Y., & CARNEVALI, O. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* Accelerates Zebrafish Backbone

- Calcification and Gonadal Differentiation through Effects on the GnRH and IGF Systems. *PLoS ONE*, 7(9), e45572.
- AZEVEDO, R. V., FOSSE FILHO, J. C., PEREIRA, S. L., CARDOSO, L. D., JÚNIOR, M. V. V.; ANDRADE, D. R. (2016). Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(1), 9-16.
- AZEVEDO, R. V., FOSSE FILHO, J. C., CARDOSO, L. D., MATTOS, D. C., VIDAL JÚNIOR, M. V., ANDRADE, D. R. (2015). Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia. *Revista Ciência Agronômica*, 46, (1), 72-79.
- BAGHERI, T., HEDAYATI, S., YAVARI, V., ALIZADE, M. AND FARZANFAR, A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 8, 43-48.
- BALCAZAR J. L., DE BLAS I., RUIZ-ZARZUELA I., VENDRELL D., CALVO A.C., MARQUEZ I., GIRONES O. & MUZQUIZ J.L. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97, 522-527.
- BALDISSEROTTO, B. (2002). *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: UFSM, 212 p.
- BALDISSEROTTO, B., CYRINO, J. E. P., URBINATI, E.C. (2014). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. FUNEP-UNESP Jaboticabal, São Paulo, BR.
- BALDISSEROTTO, B., GOMES, L. C. *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. 2ª ed. Santa Maria: UFSM, 2018. 608 p.
- BARCELLOS, L. J. G., KREUTZ, L. C., QUEVEDO, M. R., FIOREZE, I., CERICATO, L., SOSO, A. B., FAGUNDES, M., CONRAD, J., BALDISSERA, R. K., BRUSCHI, A., RITTER, F. (2004). Nursery rearing of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 232, 383-394.
- BARCELLOS, L. J. G., KREUTZ, L. C., RODRIGUES, L. B., SANTOS, L. R., MOTTA, A. C., RITTER, F., BEDIN, A. C., SILVA, L. B. (2008). *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspecto macroscópico e microscópico das lesões e perfis de resistência a antibióticos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(3), 355-363.
- BEM-AMOR, K., VAUGHAN, E. E., DE VOS, W. M. (2007). Advanced molecular, tools for the identification of lactic acid bacteria. *J Nutr*, 137(3), 741-7.
- BHASKAR, N., SUDEEPA, E. S., RASHMI, H. N., SELVI, A. T. (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus*-CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresour. Technol.*, 98, 2758-2764.
- BITTENCOURT, F., DAMASCENO, D., DIEMER, O., BOSCOLO, W., FEIDEN, A., ROMAGOSA, E. (2018). The effects of L-lysine in the diet of silver catfish (*Rhamdia voulezi*) female broodstock. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46, pp. 176-186.
- BITTENCOURT, F., DAMASCENO, D. Z., LUI, T. A., SIGNOR, A., SANCHES, E. A., NEU, D.H. (2018). Water quality and survival rate of *Rhamdia quelen* fry subjected to simulated transportation at different stock densities and temperatures. *Acta Sci., Anim. Sci.*, 40, e37285.
- BOLASINA, S., PÉREZ, A., YAMASHITA, Y. (2006). Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252, 503-515.
- BRITO, J., FERREIRA, A. H. C., SANTANA JÚNIOR, H. A., ARARIPE, M. N. B. A., LOPES, J. B., DUARTE, A. R., CARDOSO, E. S., RODRIGUES, V. L. (2014). Probiótico, prebiótico e simbiótico na alimentação de não-ruminantes. *Revista Eletrônica Nutrime*, 11(1), 3070-3084.

- BUCIO, A., HARTEMINK, R., SCHRAMA, J.W., VERRETH, J., ROMBOUTS, F.M. (2005). Survival of *Lactobacillus plantarum* 44a after spraying and drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(4), 221–227.
- BUREY, P. B. AND GIDLEY, M. (2009). Gel particles from spray-dried disordered polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 76, 206-213.
- CAHILL M.M. (1990). Virulence factor in motile Aeromonas: a review. *J. Appl. Bacteriol.* 16, 1-16.
- CARNEVALI O., AVELLA M. A., GIOACCHINI G. (2013). Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *Gen Comp Endocrinol*, 188, 297–302.
- CARNEVALI, O., MARADONNA, F., & GIOACCHINI, G. (2016). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, 472, 144–155.
- CHABRILLON M, RICO RM, BALEBONA MC, MORINIGO M. (2005). Adhesion to sole *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida. *J FishDis*, 28(22), 9-37.
- CHAMPAGNE, C., GARDNER, N., & ROY, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.
- CHAMPAGNE, C.P., GARDNER, N.J., ROY, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic culture to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.
- COELHO, L. M., REZENDE, H. C., COELHO, L. M., DE SOUSA, P. A. R., MELO, D. F. O., & COELHO, N. M. M. (2015). *Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms*. Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil.
- COSTA, M. M., PEIXOTO, R. M., BOJINK, C. L., CASTAGNA, L., MEURER, F., e VARGAS, A. C. (2008). Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(10), 477-480.
- COMPANHIA ENERGÉTICA DE SÃO PAULO. (2006). 40 peixes do Brasil: CESP 40 anos. José Caldas (fotografia); João Henrique Pinheiro Dias, Oscar Akio Shibatta (pesquisa e texto); Oscar Akio Shibatta (ilustrações). Rio de Janeiro: Doiis.
- DAWOOD, M. A. O., KOSHIO, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243–251.
- DAWOOD, M. A. O., KOSHIO, S., ABDEL-DAIM, M. M., VAN DOAN, H. (2018). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1-18.
- DAWOOD, M.A., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S., EL BASUINI, M.F., HOSSAIN, M.S., NHU, T.H., DOSSOU, S., MOSS, A.S. (2016). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 275-285.
- DAWOOD, M. A. O., KOSHIO, S. H., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S. (2015). Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) supplemental diets on growth performance, stress resistance and immune response of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 442, 29–36.
- DEVARAJA, T., BANERJEE, S., YUSOFF, F., SHARIFF, M., KHATOONA, H. (2013). holistic approach for selection of *Bacillus* spp. as a bioremediator for shrimp postlarvae culture. *Turk J Biol*, 37, 92-100.
- DIAS, D. C., LEONARDO, A. F. G., TACHIBANA, L., CORREA, C. F., BORDON, I. C. A. C., ROMAGOSA, E., RANZANI-PAIVA, M. J. T. (2012). Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1), 40-45.

- DIEMER, O., BITTENCOURT, F., BARCELOS, L. G., BOSCOLO, W. R., FEIDEN, A., ROMAGOSA, E. (2014). Lysine in the diet of *Rhamdia voulezi* male broodstocks confined in net cages. *Aquaculture*, 434, 93-99.
- DIEMER, O., NEU, D.H.; SARY, C., FINKLER, J.K., BOSCOLO, W.R., FEIDEN, A. (2012). Artemia sp. Na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Animal Brasileira*, 13, 175–179.
- DOWARAH, R., VERMA, A. K., AGARWAL, N., SINGH, P., SINGH, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLOS ONE*, 13(3), e0192978.
- EL BASUINI, M. F., EL-HAIS, A. M., DAWOOD, M. A. O., ABOU-ZEID, A. E.-S., EL-DAMRAWY, S. Z., KHALAFALLA, M. M. E.-S., ... DOSSOU, S. (2017). Effects of dietary copper nanoparticles and vitamin C supplementations on growth performance, immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1329–1340.
- EL-DAKAR A.Y., SHALABY S.M. & SAOUD I.P. (2007). Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, 13, 407-412.
- FALCINELLI, S., RODILES, A., UNNIAPPAN, S., PICCHIETTI, S., GIOACCHINI, G., MERRIFIELD, D. L., CARNEVALI, O. (2016). Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. *Scientific Reports*, 6(1).
- FAO (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Meeting the sustainable development goals. Rome.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2001). *Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina.
- FIROUZBAKHS, F., NOORI, F., KHALES, M.K., JANI-KHALILI, K. (2011). Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiol Biochem.*, 37, 833–842.
- FONTANA, L., BERMUDEZ-BRITO, M., PLAZA-DIAZ, J., MUÑOZ-QUEZADA, S., GIL, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(2), 35-50.
- FRACALOSS, D. M. & CYRINO, J. E. P. (2013). *Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aqüicultura brasileira* (375 p.). Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática/AQUABIO, Florianópolis, Santa Catarina, BR.
- FRACALOSS, D. M., MEYER, G., WEINGARTNER, M., SANTAMARIA, F. M., ZANIBONI FILHO, E. (2004). Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do Dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum*, 26(3), 345-352.
- FREITAS, J.M.A., SARY, C., LUCHESI, J. D., FEIDEN, A., BOSCOLO, W.R. (2011). Proteína e energia na dieta de jundiás criados em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 2628- 2633.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365-378.
- GABBAY, M.I. (2012). *Avaliação da suplementação alimentar com bactéria probiótica no crescimento e sanidade de Arapaima gigas em sistema de recirculação de água*. Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.
- GARCIA, L. DE O., BECKER, A. G., CUNHA, M. A., BALDISSEROTTO, B., COPATTI, C. E., & KOCHHANN, D. (2011). Effects of Water pH and Hardness on Infection of Silver

- Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(3), 399–405.
- GARCIA, S., AMARAL-JÚNIOR, H., YASUY, G. S., LIEBL, F., SOUTO, L. I. M., ZANIBONI-FILHO, E. (2017). Tetraploidia em *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) por choque térmico duplo (quente e frio). *B. Inst. Pesca*, 43(2), 257 – 265.
- GARCIA-MARENGONI, N., MOURA, M. C., OLIVEIRA, N.T.E., BOMBARDELLI, R.A., ALBUQUERQUE, D.M. (2015). Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(3), 601-606.
- GATESOUBE, FJ, (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- GHADBAN, G.S. (2002). Probiotics in Broiler production- a review. *Arch. Geflugelk*, 66(2), 49- 58.
- GHOSH, S., SINHA, A., SAHU, C. (2007). Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38(5), 518-526.
- GIOACCHINI, G., GIORGINI, E., VACCARI, L. E CARNEVALI, O. (2014). Can Probiotics Affect Reproductive Processes of Aquatic Animals? *Aquaculture Nutrition*, 12, 328–346.
- GIOACCHINI, G., LOMBARDO, F., MERRIFIELD, D. L., SILVI, S., CRESCI, A., AVELLA, M. A., CARNEVALI, O. (2011). Effects of Probiotic on Zebrafish Reproduction. *Journal of Aquaculture Research & Development*, s1.
- GIOACCHINI, G., LOMBARDO, F., MERRIFIELD, D.L., SILVI, S., CRESCI, A., AVELLA, M.A., CARNEVAL, O. (2011). Effects of Probiotic on Zebrafish Reproduction. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 1, 1-6.
- GIORGIO G, NINA C, YANTYATI W (2010). Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.*, 161, 480-487.
- GÓMEZ, G. D., & BALCÁZAR, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145–154.
- GOMINHO-ROSA, M. DO C., RODRIGUES, A. P. O., MATTIONI, B., DE FRANCISCO, A., MORAES, G., & FRACALOSSO, D. M. (2015). Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture*, 435, 92–99.
- GROSELL, M., FARRELL, A. P. AND BRAUNER, C. J. (ed.) (2011). *The Multifunctional Gut of Fish*. Fish Physiology, v.30, San Diego, CA: Academic Press.
- GUERINI, S., PRADO, G. P., DOS PASSOS, M. G.(2014). Hábito alimentar de *Rhamdia quelen* (siluriformes: pimelodidae) em um trecho do rio bonito no município de são domingos, Santa Catarina. *Revista uninga review*, 18 (2), 10-15.
- HAI, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935.
- HASSAAN, M. S., SOLTAN, M. A., JARMOŁOWICZ, S., & ABDO, H. S. (2017). Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 83–93.
- HERNÁNDEZ, D. R., PÉREZ GIANESELLI, M., DOMITROVIC, H. A. (2009). Morphology, histology and histochemistry studies of the digestive tract of South American catfish (*Rhamdia quelen*). *Int. J. Morphol.*, 27, 105-111.
- HERNÁNDEZ, D.R., SANTINÓN, J.J., SÁNCHEZ, S., DOMITROVIC, H.A. (2014). Estudio histológico e histoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(5): 1136-1147.

- HONG, H. A., HUANG, J.-M., KHANEJA, R., HIEP, L. V., URDACI, M. C., & CUTTING, S. M. (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 510–520.
- HYRONIMUS, B., LE MARREC, C., HADJ SASSI, A., DESCHAMPS, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61(2-3), 193–197.
- IBRAHEM, M. D. (2015). Review: Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives, *Journal of Advanced Research*, 6, 765–791.
- IRIANTO, A.; AUSTIN, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25, 633-642.
- JESUS, G. F. A., VIEIRA, F. D. N., SILVA, B. C., JUNIOR, M. M. D. S., USHIZIMA, T. T., SCHMIDT, E. C., BOUZOU, Z.L., PEREIRA, S.A, PEREIRAA, G.V., MARTINS, M.L., MOURIÑO, J. L. P. (2016). Probiotic bacteria may prevent haemorrhagic septicaemia by maturing intestinal host defences in Brazilian native surubins. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 484–491.
- JIN, L.Z., HO, Y. W., ZHAO, X. P (1997). Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal*. 53, 351-368.
- KAPAREIKO, D., LIM, H. J., SCHOTT, E. J., HANIF, A. AND G. H. WIKFORS. (2011). Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: II. Effects of a *Vibrio* sp. Probiotic Candidate Upon Survival of Oyster Larvae (*Crassostrea virginica*) in Pilot-Scale Trials. *J. Shellfish Res.*, 30, 617-625.
- KESARCODI-WATSON, A., KASPAR, H., LATEGAN, M. J., GIBSON, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1-14.
- KOLNDADACHA, O. D., ADIKWU, I. A., OKAEME, A. N., ATIRIBOM, R. Y., MOHAMMED A., MUSA, Y. M. (2011). The Role of probiotics in aquaculture in Nigeria– a review. *Continental J. Fisheries and Aquatic Science*, 5 (1): 8-15.
- LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. (2014). Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 990-998.
- LEBLANC, J. G., LAIÑO, J. E., DEL VALLE, M. J., VANNINI, V., VAN SINDEREN, D., TARANT, M. P., DE VALDEZ, G. F., GIORI, G. S.; SESMA, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1297–1309.
- LEE, N. K., KIM, S. Y., CHOI, S. Y., & PAIK, H. D. (2013). Probiotic *Bacillus subtilis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 22, 1-5.
- LI, B-Z., WANG, L-J., LI, D., BHANDARI, B., LI, S., LAN, Y., CHEN, X. D., MAO, Z. (2009). Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *Journal of Food Engineering*, 250-254.
- LI, J., TAN, B., MAI, K., AI, Q., ZHANG, W., XU, W., MA, H. (2006). Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture*, 253(1-4), 140–147.
- LIU, C.H., CHIU, C.S., HO, .PL., WANG, S.W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1081–1041.
- LIU, C.-H., WU, K., CHU, T.-W., & WU, T.-M. (2017). Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture International*, 26(1), 63–74.

- LOMBARDO, F., GIOACCHINI, G., CARNEVALI, O. (2011). Probiotic-Based Nutritional Effects on Killifish Reproduction. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2011(FAJ-33), 1-11.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (EDS.). (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed.
- MAGNADÓTTIR, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12(4), 361-379.
- MAKINO, L. C., FAUSTINO, F., PAES, M. C. F., BERALDO-MASSOLI, M. C., CARDOZO, M. V., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., NAKAGHI, L. S. O. (2012). Morfologia e quantificação da microbiota intestinal do curimatá (*Prochilodus lineatus*) e do cascudo cinza (*Pterygoplichthys anisitsi*) cultivados em cativeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(4), 916-926.
- MARTENS J. H., BARG H., WARREN M. J., JAHN D. (2002) Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 58, 275–285
- MARTÍNEZ-CRUZ, P., IBÁÑEZ, A. L., HERMOSILLO, O. A. M., SAAD, H. C. R. (2012). Review Article: Use of Probiotics in Aquaculture. *International Scholarly Research Network, ISRN Microbiology*, 2012, 1-13.
- MARTINS, M. L., XU, D. H., SHOEMAKER, C. A., & KLESIUS, P. H. (2011). Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), 774–780.
- MEHRIM, A. I., KHALIL, F. F., & HASSAN, M. E. (2014). Hydroyeast Aquaculture® as a reproductive enhancer agent for the adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(2), 371–381.
- MELLO, H. (2012). *Bacillus cereus e Bacillus subtilis na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (Oreochromis niloticus) e seu efeito probiótico*. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 57p.
- MENEZES, C.R., BARIN, J. S., CHICOSKI, A. J., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., FRIES, L. L. M., TERRA, N. N. (2013). Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas / Microencapsulation of probiotics: progress and prospects. *Ciênc. Rural*, 43(7), 1309-1316.
- MENEZES, M. F. S. C., RODRIGUES, L. Z., CAVALHEIRO, C. P., ETCHEPARE, M. A., MENEZES, C. R. (2015). Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina. *Ciência e Natura*, 37(5), 30-37.
- MERRIFIELD D. L., DIMITROGLOU A., BRADLEY G., BAKER R. T. M., DAVIES S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16, 504-510.
- MERRIFIELD, D.L., BRADLEY, G., BAKER, R.T.M., DIMITROGLOU, A. AND DAVIES, S.J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I: Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition* 16, 504–510.
- MICCOLI, A., GIOACCHINI, G., MARADONNA, F., BENATO, F., SKOBO, T., CARNEVALI, O. (2015). Beneficial bacteria affect *Danio rerio* development by the modulation of maternal factors involved in autophagic, apoptotic and dorsalizing processes. *Cellular Physiology Biochemistry*, 35(5), 1706-18.
- MOHAPATRA, S., CHAKRABORTY, T., KUMAR, V., DEBOECK, G., MOHANTA, K.N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97(3), 405-430.
- MONTANHA, F. P., NAGASHIMA, J. C., KIRNEW, M. D., ASTRAUSKAS, J. P., PIMPAO, C. T. (2011). Características Fisiológicas e Reprodutivas do *Rhamdia quelen*. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 1, 1-8.

- MOUBARECK, C., GAVINI, F., VAUGIEN, L., BUTEL, M. J., DOUCER- POPULARIE, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of Bifidobacteria. *J Antimicrob Chemo*, 55, 38–44.
- NAKANDAKARE, I. B., IWASHITA, M. K. P., DIAS, D. C., TACHIBANA, L., RANZANI-PAIVA, M. J. T., ROMAGOSA, E. (2013). Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol. Inst. Pesca*, 39(2), 121-135.
- NATH, A., MOLNÁR, M. A., CSIGHY, A., KÓSZEGI, K., GALAMBOS, I., HUSZÁR, K. P., VATAI, G. (2018). Biological Activities of Lactose-Based Prebiotics and Symbiosis with Probiotics on Controlling Osteoporosis, Blood-Lipid and Glucose Levels. *Medicina*, 54(6), 98.
- NAYAK S.K., SWAIN P., MUKHERJEE S.C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shelf. Immunol.*, 23, 892-896.
- NAYAK, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 2-14.
- NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary microbiology*, 159, 443-450.
- OCHOA-SOLANO, J.L.; OLMOS-SOTO, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519-525.
- OELSCHLAEGER, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International journal of medical microbiology: IJMM* 300(1), 57-62.
- OLIVEIRA FILHO, P.R.C. AND FRACALOSSO, D.M. (2006). Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1581-1587.
- PAIXÃO, A. E. M., SANTOS, J. C., PINTO, M. S., PEREIRA, D. S. P., RAMOS, C. E. C. O., CERQUEIRA, R. B., SILVA, R. F. (2017). Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International*, 1–11.
- PAIXÃO, L.A. AND CASTRO, F.F.S. (2016). A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro\*. *Universitas: Ciências da Saúde*, 14(1), 85-96.
- PALERMO, F. A., MOSCONI, G., AVELLA, M. A., CARNEVALI, O., VERDENELLI, M. C., CECCHINI, C., POLZONETTI-MAGNI, A. M. (2011). Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1A, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. *General and Comparative Endocrinology*, 171(3), 293–300.
- PARKER, R. B. (1974). Probiotics: the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, v. 29(2), 4-8.
- PESSINI, J. E., SANCHEZ, M. S. S., RODRIGUES, M. L., BOSCOLO, W. R., BITTENCOURT, F., SIGNOR, A. (2019). Wheat middling in diets supplemented with phytase for silver catfish juveniles. *Medicina Veterinaria-Recife*.
- POLI, M. A., SCHVEITZER, R., OLIVEIRA, N. (2015). The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae. *Aquaculture*, 66, 17-21.
- PRETER, V DE., RAEMEN, H., CLOETENS, L., HOUBEN, E., RUTGEERTS, P., VERBEKE, K. (2008). Effect of dietary intervention with different pre- and probiotics on intestinal bacterial enzyme activities. *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 225–231.
- PRIYODIP, P., PRAKASH, P. Y., & BALAJI, S. (2017). Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. *Indian Journal of Microbiology*, 57(2), 148–154.

- PURWANDARI, A. R., AND CHEN, H. Y. (2013). Effects of Probiotic *Bacillus subtilis* on Intestinal Microbial Diversity and Immunity of Orange Spotted Grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Applied Biotechnology*, 1(1), 25-36.
- RADUNZ-NETO, J., BORBA, M. R. (2013). Exigências nutricionais e alimentação do jundiá, in: FRACALOSSO, D. M., CYRINO, J. E. P. NUTRIAQUA: *Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1ª edição 24 ampliada, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 375 p.
- RAHIMAN, K.M.M., JESMI Y, THOMAS, A.P. HATHA, A.A.M. (2010). Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 41, 120–134.
- RAMESH, D., AND SOUISSI, S. (2017). Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* KADR1 and its subcellular components on immune responses and disease resistance in *Labeo rohita*. *Aquaculture Research*, 49(1), 367–377.
- RAMESH, D., VINOTHKANNA, A., RAI, A. K., VIGNESH, V. S. (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immun.*, 45, 268–276.
- RAY, A. K., GHOSH, K., & RINGØ, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492.
- RINGO E., LOVMO L., KRISTIANSEN M., SALINAS I., MYKLEBUST R., OLSEN R.E. & MAYHEW T.M. (2010). Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture research*, 41, 451-467.
- RINGØ, E., LØVMO, L., KRISTIANSEN, M., BAKKEN, Y., SALINAS, I., MYKLEBUST, R., OLSEN, R.E. & MAYHEW, T.M. (2010). Lactic acidbacteriavs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: areview. *Aquaculture Research*, 41, 451–467.
- ROBERFROID, M. B. (2000). Prebiotics and Probiotics: are they function foods? *American Journal Nutrition.*, 71, 168-187.
- RODRIGUES, A. P. P., GOMINHO-ROSA, M. D. C, CARGIM-FERREIRA, E., FRANCISCO, A. FRACALOSSO, D. D. (2012). Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Ramdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*,18, 65-72.
- RODRIGUES, M. L., SANCHEZ, M. S., DAMASCENO, D. Z., BITTENCOURT, F., REIDEL, A., BARRERO, N. M., & SIGNOR, A. (2017). Reproductive performance of silver catfish fed sorghum diets supplemented with phytase. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52, 623-632.
- SAENZ DE RODRIGUEZ, M. A., DIAZ-ROSALES, P., CHABRILLON, M., SMIDT, H., ARIJO, S., LEON- RUBIO, J. M. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*; 15:177- 185.
- SANKAR, H., PHILIP, B., PHILIP, R., SINGH, I. S. B. (2016). Effect of probiotics on digestive enzyme activities and growth of cichlids, *Etilapia suratiensis* (Pearl spot) and *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 852–864.
- SANSONETTI, P. J., MEDZHITOV, R. (2009). Learning Tolerance while Fighting Ignorance. *Cell*, 138(3), 416–420.
- SCHREZENMEIR, J. AND DE VRESE, M. (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361S-364S.
- SCHULZ, D., BONELLI, R. R., BATISTA, C. R. V. (2005). Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição*. 16(4), 403-411.

- SIGNOR, A., FEIDEN, A., BOSCOLO, W. R., SIGNOR, A. A., GONÇALVES, G. S., SARY, C., KLEIN, S. (2013). Eventos reprodutivos do jundiá *Rhamdia voulezi* cultivados em tanques-rede. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 37(3), 272-277.
- SILVA, F.C.P.; BRITO, M.F.G.; FARIAS, L.M. (2005). Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J. Fish Biol.*, 67, 1686-1698,
- SILVEIRA, J., SILVA, C.P., CARGNIN-FERREIRA, E., ALEXANDRE, D., ELIAS, M.A., FRACALOSSO, D.M. (2013). Freshwater catfish jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae are prepared to digest inert feed at the exogenous feeding onset: physiological and histological assessments. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 1581-1590.
- SRIVASTAVA, P. K. AND PANDEY, A.K. (2015). Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. *Biochemical Cellular Archives*, 15(1), 47-73.
- SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., SOLDI, V. (2006). Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, 7(2), 12-20.
- TANCREDO, K.R., GONÇALVES, E.L.T., BRUM, A., ACCHILE, M., HASHIMOTO, G.S.O., PEREIRA, S.A., MARTINS, M.L. Hemato-immunological and biochemical parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 45, 689–694.
- TAPIA-PANIAGUA, S. T., VIDAL, S., LOBO, C., PRIETO-ÁLAMO, M. J., JURADO, J., CORDERO, H., MORIÑIGO, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 209–221.
- TAPIA-PANIAGUA, S.T., CHABRILLÓN, M., DÍAZROSALES, P., BANDA, I.G., LOBO, C., BALEBONA, M.C., MORIÑIGO, M.A. (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2), 310–319.
- TELLI, G. S., RANZANI-PAIVA, M. J. T., DIAS, D. C., SUSSEL, F. R., ISHIKAWA, C. M., TACHIBANA, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology* 39, 305–311.
- VERSCHUERE, L., ROUMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 655-671.
- VIEIRA, F.N. (2010). *Seleção e utilização de bactérias probióticas na piscicultura marinha*. Tese de Doutorado no Centro de Ciência Agrária da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- VÍLCHEZ, M. C., SANTANGELI, S., MARADONNA, F., GIOACCHINI, G., VERDENELLI, C., GALLEGÓ, V., PEÑARANDA, D.S., TVEITEN, H., PÉREZ, L., CARNEVALI, O., & ASTURIANO, J.F. (2015). Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. *Theriogenology*, 84(8), 1321–1331.
- WANG, M., LIU, G., LU, M., KE, X., LIU, Z., GAO, F., YU, D. (2016). 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.
- WEILER, K. A., PESSINI, J. E., SANCHEZ, M. S. S., RODRIGUES, M. L., BOSCOLO, W. R., PEZZATO, L. E., BITTENCOURT, F., SIGNOR, A. (2019). Sunflower meal with and without phytase supplementation in diets for silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 32, 285-297.

- WIDANARNI AND TANBIYASKUR, R. (2015). Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for the control of streptococcosis in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pak. J. Bio.l Sci.*, 18(2), 59-66.
- WILD, M. B., MARENGONI, N. G., VIVIAN, M. M. P. S., TSUTSUMI, C. Y., MOURA, M. C. DE, (2014). Probiótico dietético em sistemas de produção de tilápia do Nilo: efeitos sobre o crescimento, balanço de N e P, retenção de nutrientes e viabilidade econômica. *Semin. Ciências Agrárias*, 35, 477.
- YAN, L., BOYD, K. G., GRANT BURGESS, J. (2002). Surface Attachment Induced Production of Antimicrobial Compounds by Marine Epiphytic Bacteria Using Modified Roller Bottle Cultivation. *Marine Biotechnology*, 4(4), 356–366.
- YANG, C. Y., LIU, Y-D., LI, D. H. (2007). Effects of microcystin-rr on the antioxidant system of *bacillus subtilis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(11b), 1435-1441.
- YANG, S., DU, J., DUAN, Y., XIAO, Q., LI, N., LIN, Q., DU, J. (2018). Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments. *BMC Microbiology*, 18(1), 1-12.

**Justificativa**

Embora o uso de probióticos em dietas balanceadas e de boa qualidade nutricional promovam uma melhor assimilação dos nutrientes, ainda é necessário aprofundar estudos que envolvem ações fisiológicas e bioquímicas no desenvolvimento de espécies nativas como o jundiá *Rhamdia quelen*.

A administração de probióticos em dietas para reprodutores deve ser melhor elucidada, pois pode influenciar diretamente nas vias metabólicas, manutenção fisiológica, crescimento, imunidade, maturidade sexual e qualidade dos gametas. Os probióticos podem atuar como modulador nutricional e precursor de desenvolvimento ótimo dos reprodutores por estar intimamente relacionado a absorção de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas.

## Objetivos

### Objetivo geral

Avaliar a inclusão do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* e *B. cereus* em dietas sobre a fisiologia de juvenis de jundiá *R. quelen* e sua influência no desempenho produtivo e reprodutivo da espécie.

### Objetivos específicos

**Etapa I:** Efeito do probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) no crescimento e respostas fisiológicas do jundiá (*Rhamdia quelen*).

- Avaliar o desempenho produtivo de jundiás na fase de crescimento (Ganho em peso, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica, conversão alimentar aparente e sobrevivência);
- Identificar qual o melhor nível de suplementação que proporciona a maior expressão produtiva;
- Avaliar os índices hepatossomático, viscerossomático, peso relativo e comprimento do intestino;
- Avaliar composição centesimal do peixe eviscerado (umidade, proteína, extrato etéreo e matéria mineral);
- Avaliar o rendimento de carcaça;
- Verificar a colonização microbiológica nas dietas experimentais;
- Verificar as variáveis metabólicas intermediárias (glicose, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicerídeos, proteínas totais e cálcio);
- Verificar a atividade enzimática do fígado (ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT));
- Analisar a histomorfometria e histoquímica do trato gastrointestinal;
- Analisar a deposição de glicogênio através da histomorfometria dos hepatócitos;
- Verificar através da histomorfometria o grau de integridade hepática;

**Etapa II:** Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para jundiás (*Rhamdia quelen*) promovem melhoria em sua fisiologia reprodutiva

- Determinar os possíveis efeitos na qualidade dos ovócitos (número, diâmetro, morfologia);
- Determinar os possíveis efeitos na qualidade seminal (pH seminal, motilidade, sobrevivência, concentração e morfologia);

- Determinar os níveis de testosterona e estradiol plasmático;
- Avaliar os índices gonadossomático, hepatossomático e víscerosomático;
- Avaliar a influência na prole dos reprodutores (taxa de fertilização, taxa de eclosão das larvas, sobrevivência);
- Avaliar o efeito no desenvolvimento celular pela histomorfometria dos ovários e testículos;

**Capítulo 2:****Efeito do probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) no crescimento e respostas fisiológicas do jundiá (*Rhamdia quelen*).**

Artigo elaborado e formatado conforme as normas das publicações científicas: Aquaculture nutrition, Disponível em: <  
<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/13652095>>.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de aditivo probiótico (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) em dietas para jundiá *Rhamdia quelen* sobre o desempenho produtivo e respostas fisiológicas. Foram utilizados 300 juvenis de jundiá com peso inicial médio de  $17,35 \pm 0,97$ g, alimentados durante 90 dias com dietas contendo níveis crescentes do aditivo probiótico (0,15; 0,30; 0,45 e; 0,60 g. Kg<sup>-1</sup> de ração de *B. subtilis* e *B. cereus* nas concentrações de  $4 \times 10^{11}$  UFC) e uma dieta controle. Os parâmetros de desempenho produtivo foram superiores nos peixes alimentados com dietas contendo 0,60 g kg<sup>-1</sup> de probiótico. A composição centesimal e o rendimento de carcaça apresentaram alterações quando utilizado 0,30 e 0,60 g kg<sup>-1</sup> de probiótico. Os parâmetros bioquímicos séricos foram superiores nos peixes alimentados com dietas contendo 0,60 g kg<sup>-1</sup> de probiótico. Houve aumento da atividade de estresse oxidativo hepático nos peixes alimentados com dietas contendo 0,30 g kg<sup>-1</sup> de probiótico. O desenvolvimento das vilosidades intestinais dos jundiás foi influenciado pela inclusão do aditivo probiótico nas dietas, assim como a atividade de células muco-secretoras no tecido. O crescimento dos hepatócitos foi diferenciado nos peixes alimentados com dietas contendo probiótico a partir de 0,30 g kg<sup>-1</sup> de inclusão e as alterações no tecido foram reduzidas quando utilizado 0,60 g kg<sup>-1</sup> do aditivo. Portanto, a inclusão de 0,60g. kg<sup>-1</sup> de probiótico em dietas para jundiás proporciona o desenvolvimento dos peixes, maximizando processos fisiológicos e mantendo a saúde dos animais.

**Palavras-chave:** bactérias não-patogênicas, biotecnologia, espécie nativa, imunomoduladores, piscicultura.

## 1. Introdução

O uso dos probióticos é considerado uma alternativa biológica altamente viável como promotor de crescimento, por estabilizar o estado de saúde dos peixes pelas ações e efeitos na microbiota intestinal, aproveitando melhor os nutrientes dos alimentos, gerando assim benefícios na fisiologia e imunidade sistêmica. Além disso, quando comparado ao uso de produtos químicos e antimicrobianos os seus benefícios impulsionam o aumento produtivo de forma segura e ambientalmente sustentável (Akhter et al., 2015; Dawood et al., 2018). Os efeitos do aditivo nas respostas fisiológicas proporcionam o aumento da resistência imune dos animais aquáticos em situações de estresse gerado pela rotina da atividade produtiva (Firouzbakhsh et al., 2011; Nimrat et al., 2012), capazes de atenuar prejuízos decorrentes dos fatores adversos, pois estimulam os processos fisiológicos para a homeostase nos peixes (Merrifield et al., 2010; Hai, 2015).

A adição de bactérias probióticas via alimentação torna-se uma ferramenta benéfica para manter o crescimento e funções normais dos animais aquáticos, auxiliando na melhor absorção de nutrientes, vitaminas e atividades digestivas pela atuação de enzimas, apresentando efeito positivo sobre a utilização de alimentos (Dawood et al., 2015; Nath et al., 2018). As bactérias benéficas atuam na produção de amilases, proteases e lipases que contribuem nos processos digestivos, tornando mais eficiente a absorção de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas (complexo B e ácido fólico), proporcionando melhor crescimento dos peixes (Irianto & Austin, 2002; Bolasina et al., 2006; Leblanc, 2011; Ray et al., 2012).

O uso das espécies *B. subtilis* e *B. cereus* como probiótico em peixes promove o crescimento e a assimilação de nutrientes pela atividade das enzimas digestivas, e ainda melhora o sistema imune dos animais (Nakandakare et al., 2013; Wild et al., 2014; Azevedo et al., 2016). O *B. subtilis* possui efeito bactericida e fungicida, aumenta as respostas imunes do hospedeiro e a resistência a doenças (Ramesh & Souissi, 2017).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) tornou-se uma espécie nativa amplamente estudada por apresentar crescimento expressivo, excelente conversão alimentar, tolerância ao manejo, ótimo rendimento de carcaça e viabilidade reprodutiva em cativeiro (Barcellos et al., 2004; Carneiro, 2006; Amaral Junior et al., 2008). Além disso, a boa aceitação no mercado consumidor tem intensificado seu cultivo em sistemas de criação intensiva, que podem ser realizados em tanques-rede ou viveiros escavados desde as fases iniciais até a terminação com crescimento ótimo inclusive durante períodos de baixa temperatura (Diemer et al., 2012; Signor et al., 2013; Amaral Júnior et al., 2015; Rodrigues et al., 2017).

Estudos relacionados ao desenvolvimento de espécies nativas como o jundiá ainda são reduzidos quando comparados a quantidade de informações relacionadas a espécies comercialmente estabelecidas, contudo, informações relacionada as diferentes fases de desempenho produtivo, desenvolvimento larval e os eventos reprodutivos são necessárias a fim de atender suas exigências nutricionais com a elaboração de dietas completas, consequentemente melhorando seu desempenho zootécnico e resistência a doenças (Signor et al., 2013; Radünz et al., 2013; Diemer et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* e *B. cereus* em diferentes níveis de inclusão sobre crescimento produtivo e respostas fisiológicas em juvenis de jundiá *R. quelen*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Condições experimentais

Os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/Unioeste) sob o protocolo de Nº 40/17.

Foram utilizados 300 juvenis de jundiá com peso médio inicial de  $17,35 \pm 0,97$ g, acondicionados em 20 tanques-rede com volume útil de  $1,0 \text{ m}^3$  instalados em um tanque de alvenaria de  $200 \text{ m}^2$  e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado contendo cinco tratamentos e quatro repetições ( $n = 4$ ), totalizando 15 peixes por unidade experimental.

Durante o período experimental as variáveis de qualidade da água mantiveram-se estáveis com média de oxigênio dissolvido de  $6,00 \pm 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ , pH  $6,07 \pm 0,2$ , condutividade elétrica  $36,1 \pm 1,5 \text{ } \mu\text{S.cm}^{-1}$  e temperatura de  $23,6 \pm 2,1^\circ\text{C}$ , permanecendo dentro dos limites toleráveis para a criação da espécie (Souza et al., 2005).

### 2.2 Dietas experimentais e manejo alimentar

O delineamento adotado considerou a inclusão do aditivo probiótico nos níveis de 0,15; 0,30; 0,45 e 0,60 g de *Bacillus subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *Bacillus cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC  $\text{Kg}^{-1}$  de ração, e uma dieta controle (sem a inclusão do probiótico).

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia às 8h00, 12h00, 14h00 e 17h00 até apresentarem saciedade aparente durante um período de 90 dias, com rações isoproteicas (29% de proteína digestível) e isoenergéticas (3250 kcal de energia digestível  $\text{kg}^{-1}$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Composição química calculada e análise centesimal da dieta base experimental para a inclusão de níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC para juvenis de jundiá *R. quelen*.

<b>Ingredientes (%)</b>	
Peixe, farinha	33,30
Milho, grão	18,89
Arroz, quirera	12,65
Farinha de vísceras de aves	12,55
Soja, farelo 45%	10,00
Trigo, farelo	8,00
Óleo de soja	3,00
Premix <sup>1</sup>	1,00
Sal comum	0,30
Cloreto de colina	0,10
Propionato de cálcio	0,30
Vitamina C	0,10
Hidróxitolueno butilato	0,02
Total	100
<b>Nutrientes (%)</b>	
Proteína Digestível	29,09
Ácido linoleico	2,97
Amido	25,00
Arginina total	2,67
Cálcio	3,21
Energia digestível (kcal)	3250
Fibra bruta	1,68
Fósforo total	1,45
Gordura	9,36
Lisina total	2,01
Metionina total	0,71
<b>Matéria natural %</b>	
Energia bruta (Kcal/g)	4340,00
Proteína Bruta	37,83
Gordura	8,13
Matéria mineral	3,96

<sup>1</sup>Composição do premix: Níveis de garantia por quilograma do produto: vit. A - 500.000 UI; vit. D3 - 250.000 UI; vit. E - 5.000 mg; vit. K3 - 500 mg; vit. B1 - 1.500 mg; vit. B2 - 1.500 mg; vit. B6 - 1.500 mg; vit. B12 - 4.000 mg; ácido fólico - 500 mg; pantotenato de cálcio - 4.000 mg; vit. C - 10.000 mg; biotina - 10 mg; Inositol - 1.000; nicotinamida - 7.000; colina - 10.000 mg; Cobalto - 10 mg; Cobre - 1.000 mg; Ferro - 5.000 mg; Iodo - 200 mg; Manganês - 1500 mg; Selênio - 30 mg; Zinco - 9.000 mg.

Para a confecção das rações os ingredientes foram moídos em triturador tipo martelo, pesados, homogeneizados manualmente e posteriormente extrusados (Ex-Micro<sup>®</sup>, Ribeirão Preto - São Paulo, Brasil). O aditivo probiótico utilizado apresentava-se em forma de pó liofilizado e foi adicionado às dietas após o processo de extrusão e secagem das dietas experimentais. A adição do probiótico foi realizada por aspersão, agregando-se aos peletes com uso de óleo vegetal (3%), em seguida as dietas foram secas em estufa de circulação de ar forçada durante 24h à 25°C (Dias et al., 2012), refrigeradas para avaliação bacteriológica e posterior utilização. Em todas as dietas experimentais foram realizadas análise de contagem dos *B. cereus* e *B. subtilis* UFC.g<sup>-1</sup> da ração (Pharmacopeia, 2008), confirmando a presença das bactérias probióticas em todas as dietas experimentais e dentro dos limites de aditivo nos níveis utilizados (Certificado de qualidade do Laboratório CAUNESP, Brasil).

### 2.3 Desempenho produtivo e coleta de dados

Ao final do experimento os exemplares foram mantidos em jejum por 24h, posteriormente, foram anestesiados em solução de benzocaína 100 mg L<sup>-1</sup> (Gomes et al., 2001), pesados e medidos para avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho produtivo: ganho em peso (GP (g) = peso final (g) – peso inicial (g)); conversão alimentar aparente (CAA = alimento fornecido (g) / ganho em peso (g)); taxa de crescimento específico (TCE (% dia<sup>-1</sup>) = 100 x [(ln peso final (g) – ln peso inicial (g)) / período experimental]); taxa de eficiência proteica (TEP (%) = 100 x (ganho em peso (g) / proteína bruta consumida (g))); e sobrevivência (SO (%) = n° final de peixes/n° inicial de peixes)\*100); índices somáticos: índices de gordura viscero-somático (IVS (%) = 100 x [peso da gordura visceral (g)/ peso corporal (g)]) e hepato-somático (IHS (%) = 100 x [peso do tecido (g)/ peso corporal (g)]); peso relativo do intestino: (PRI(%):peso do intestino/ peso do peixe x 100) e a relação dos comprimentos intestino/corporal. Posteriormente, todos os peixes eviscerados e descabeçados foram pesados individualmente para avaliação de rendimento de carcaça.

Para as avaliações plasmáticas, histológicas, centesimal e atividade de estresse oxidativo, três animais de cada unidade experimental foram submetidos a coleta de tecidos.

### 2.4 Composição centesimal dos peixes e das dietas experimentais

A composição centesimal dos peixes eviscerados e das dietas experimentais foi determinada seguindo a metodologia descrita pela AOAC (2005).

### 2.5 Rendimento de carcaça

Para a realização da avaliação do rendimento de carcaça e porcentagens de subprodutos foram medidos os parâmetros de rendimento, segundo Fantini et al., (2013).

### 2.6 Bioquímica plasmática

A coleta de uma alíquota (3mL) de sangue foi realizada por meio de punção do vaso sanguíneo caudal, utilizando seringas descartáveis contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) à 10%. Foi realizada análise bioquímica plasmática utilizando amostras do plasma obtido por centrifugação a 2.500 rpm durante cinco minutos para a determinação quantitativa da glicose (mg.dl<sup>-1</sup>), triglicerídeos (mg.dl<sup>-1</sup>), colesterol total, colesterol LDL (mg.dl<sup>-1</sup>), colesterol HDL (mg.dl<sup>-1</sup>) e proteína total (g.dl<sup>-1</sup>), por metodologia colorimétrica através de kits comerciais (Gold analisa Diagnostica®) e leitura em espectrofotômetro.

### 2.7 Estresse oxidativo

Na determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada a metodologia descrita por Buege e Aust (1978). A avaliação da atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Nelson et al (1982) e a atividade da glutathione S- Transferase (GST) a partir do método de Ellman (1959).

### 2.8 Histologia intestinal e hepática

Os tecidos coletados foram fixados em solução de Alfac por 24 horas e depois transferidos para solução de álcool 70°L. O processamento histológico foi realizado de acordo com (Tokumaru, Godinho e Ferri, 1968) A histomorfometria e histoquímica das vilosidades intestinais foram realizadas a partir do segmento transversal da porção inicial e medial do intestino dos peixes. Os cortes histológicos fixados em lâminas foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE), ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) e alcian blue (AB) pH 2,5 (Bancroft e Stevens, 1996). Na histomorfometria do fígado foram realizados cortes histológicos fixados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), segundo Bancroft e Stevens (1982). A histoquímica hepática foi realizada pela técnica de coloração em Ácido Periódico de Schiff (PAS)-Hematoxilina (Beçak e Paulete, 1976) para determinar a concentração de glicogênio. Após o processo de coloração foram realizadas a fotodocumentação das lâminas por meio de microscopia óptica e as mensurações foram realizadas pelo software cellSens Standard 1.15®.

### 2.9 Integridade hepática

As alterações morfológicas foram avaliadas qualitativamente através do índice de lesão segundo Bernet et al. (1999), calculado a partir da fórmula:  $Bernet = \sum \text{fator de importância (w)} \times \text{score } (\alpha)$ ; para isso, foram utilizados três fatores de importância (w): (1) lesão razoável; (2) lesão moderada; e (3) lesão irreversível, que leva à perda parcial ou total de órgãos. Cada alteração histopatológica foi avaliada por meio de escores ( $\alpha$ ) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau de alteração, sendo (0) sem alteração; (2) baixa ocorrência; (4) ocorrência moderada; (6) lesão grave. Para determinar as lesões, uma tabela foi adaptada ao estudo, indicando as principais lesões histopatológicas encontradas (Tabela 2).

**Tabela 2-** Alterações hepáticas avaliadas em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Células	Índices de Bernet	
	Alterações observadas no fígado	Fator de importância
Hepatócitos	IFL	2
	MM	1
	N	3
	CS	1
	LLC	2
	VC	1

IFL = inflamação dos leucócitos; MM = Melanomacrófago; N = Necrose; CS = Congestão de sinusóides; LLC = Perda do limite de células; VC = vacuolização citoplasmática.

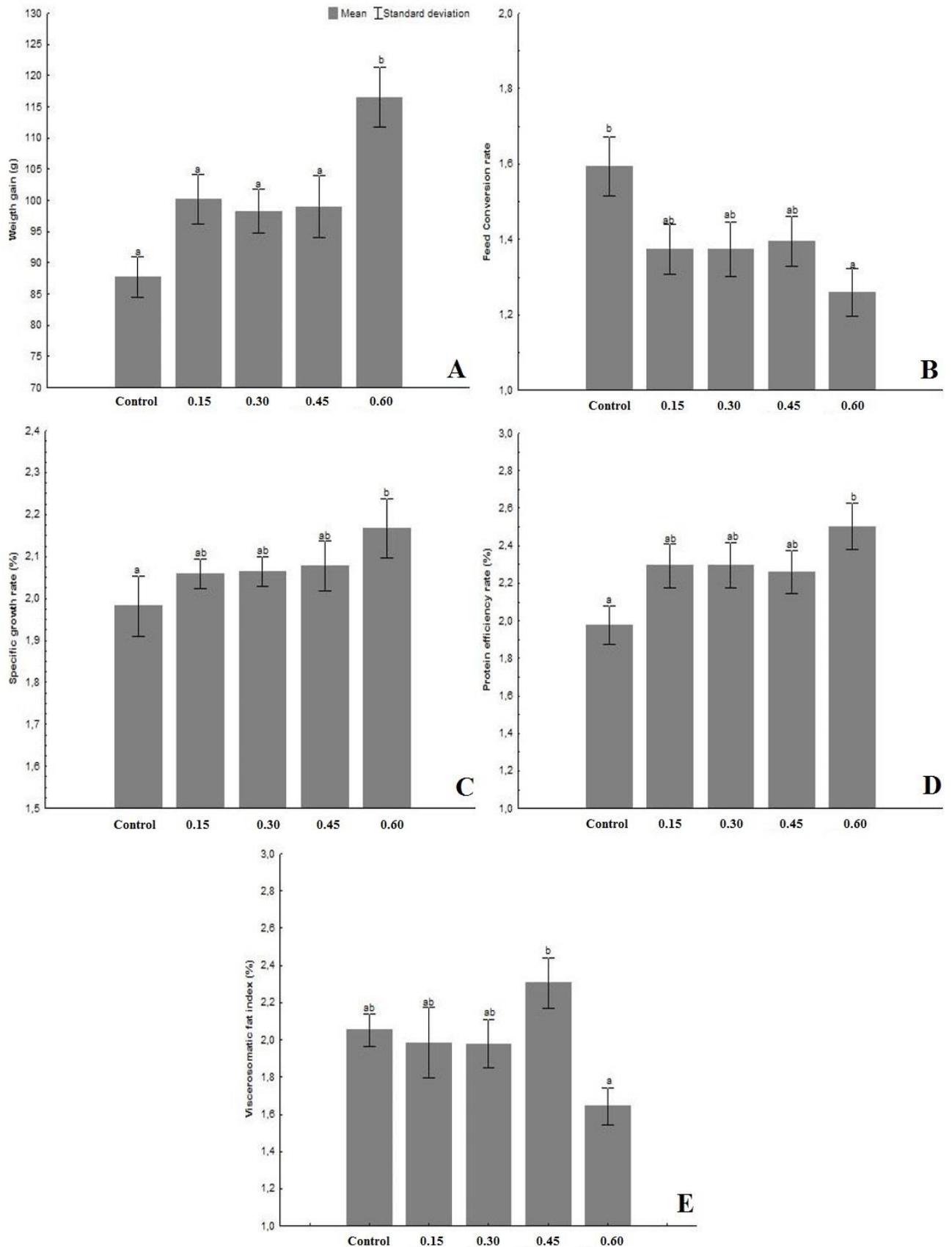
## 2.10 Análises estatísticas

Todos os dados, quando atendendo os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one-way*) para verificar os efeitos dos níveis de inclusão do aditivo probiótico, quando significativas as médias foram comparadas pelo teste de Duncan em 5% com o auxílio do software Statística 7.1<sup>®</sup>

## 3. Resultados

### 3.1 Desempenho produtivo e índices somáticos

Os níveis de aditivo probiótico em dietas para juvenis de jundiás influenciaram significativamente nas variáveis de desempenho produtivo e no índice víscerosomático dos peixes ( $P < 0,05$ ). A inclusão de  $0,60 \text{ g kg}^{-1}$  de probiótico promoveu o crescimento dos peixes com o aumento em GP, TCE, TEP, melhorou a CAA e proporcionou a redução do IGVS quando comparado aos demais níveis de inclusão e/ou a dieta controle (Figura 1).



**Figura 1-** Desempenho produtivo e índice viscerossomático em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade.

A sobrevivência, os índices hepatossomáticos, peso relativo do intestino e a relação comprimento do intestino/comprimento corporal não foram influenciados ( $P>0,05$ ) pelos diferentes níveis de aditivo probiótico nas dietas dos jundiás, apresentando médias de  $95,66 \pm 5,85\%$ ,  $1,77 \pm 0,35\%$ ,  $0,80 \pm 0,21\%$  e  $0,54 \pm 0,16$  cm, respectivamente.

### 3.2 Composição centesimal e rendimento de carcaça

A composição centesimal da carcaça dos jundiás apresentou diferenças significativas ( $P<0,05$ ) no teor de umidade e extrato etéreo quanto à inclusão de probiótico nas dietas (Tabela 3).

**Tabela 3-** Composição centesimal (base da matéria natural) de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926) e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Variáveis	Níveis de probiótico g Kg <sup>-1</sup> ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC)					Valor do p
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
Umidade (%)	70,32±0,30b	70,82±0,13c	69,77±0,26a	70,00±0,16ab	69,86±0,34ab	*
Proteína (%)	16,25±0,85	16,11±0,21	16,32±0,59	16,16±0,22	16,60±0,95	NS
Extrato Etéreo (%)	10,40±0,25b	9,76±0,22a	10,55±0,47b	10,60±0,45b	10,54±0,09b	*
Matéria Mineral (%)	3,40±0,15	3,36±0,35	3,24±0,16	3,07±0,47	3,42±0,30	NS

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade.

As variáveis de rendimento de carcaça dos jundiás apresentaram diferenças significativas ( $P<0,05$ ) para o RPIE e RPISC quanto a inclusão de probiótico nas dietas (Tabela 4). O menor RPIE ocorreu nos peixes alimentados com 0,30 g kg<sup>-1</sup> de probiótico, embora não diferindo dos peixes alimentados com as dietas controle e 0,45 g kg<sup>-1</sup> de probiótico. Os maiores RPISC foram observados nos peixes alimentados com níveis de 0,15; 0,45 e 0,60 g kg<sup>-1</sup> de probiótico. O PV foi maior nos peixes alimentados com a dieta 0,30 g kg<sup>-1</sup> de probiótico, embora não diferindo dos peixes alimentados com a dieta 0,60 g kg<sup>-1</sup> de probiótico.

**Tabela 4-** Rendimento de carcaça em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Variáveis	Níveis de probiótico g Kg <sup>-1</sup> ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC)					Valor do p
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
RPIE (%)	85,94±1,88ab	86,59±1,82b	84,55±2,26a	85,89±2,10ab	86,82±1,50b	*
RPISC (%)	63,46±2,65a	66,80±3,40ab	64,14±3,53a	66,81±5,05ab	67,95±4,95b	*
PC (%)	65,51±4,74	67,25±3,88	64,51±3,95	66,81±5,05	66,19±5,56	NS
PV	13,41±1,95a	13,15±1,84a	15,48±2,73b	13,57±2,29a	14,78±2,00ab	*

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. RPIE = Rendimento de peixe inteiro eviscerado; RPISC = Rendimento de peixe inteiro eviscerado sem cabeça; PC = Peso da cabeça; PV = Peso das vísceras.

As variáveis de bioquímica plasmática dos jundiás foram influenciadas significativamente ( $P < 0,05$ ) pela inclusão do aditivo probiótico nas dietas, e o nível  $0,60 \text{ g kg}^{-1}$  de probiótico promoveu a estabilidade metabólica plasmática dos peixes (Tabela 5).

### 3.3 Bioquímica plasmática

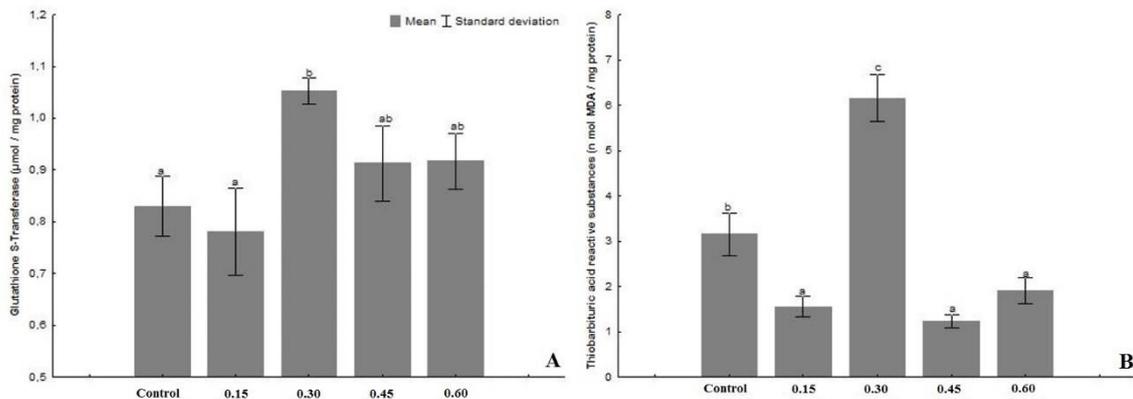
**Tabela 5-** Bioquímica plasmática em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Variáveis	Níveis de probiótico $\text{g Kg}^{-1}$ ( <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC)					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
Triglicerídeos ( $\text{mg.dl}^{-1}$ )	269,35±47,67a	334,21±46,37b	263,19±64,15a	262,44±39,27a	240,65±46,72a	*
Colesterol total ( $\text{mg.dl}^{-1}$ )	213,41±2,22d	181,13±0,20b	239,01±0,92e	167,15±3,08a	192,44±1,23c	*
Colesterol LDL ( $\text{mg.dl}^{-1}$ )	2,80±0,11c	3,37±0,09a	3,28±0,06a	3,68±0,52a	1,94±0,09b	*
Colesterol HDL ( $\text{mg.dl}^{-1}$ )	54,83±2,75b	34,86±0,74a	61,00±1,41b	31,02±4,46a	72,02±2,80c	*
Colesterol VLDL ( $\text{mg.dl}^{-1}$ )	60,27±0,40b	63,64±2,09	39,10±0,30c	54,50±1,87a	52,74±0,84a	*
Glicose ( $\text{mg.dl}^{-1}$ )	81,80±1,50a	102,90±1,78d	135,85±2,40e	94,47±0,32c	87,51±1,28b	*
Proteína Plasmática total ( $\text{g.dl}^{-1}$ )	4,72±0,61b	4,10±0,22a	3,99±0,45a	3,79±0,43a	4,20±0,28ab	*

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade.

### 3.4 Estresse oxidativo e atividade antioxidante

As GST e TBARS no fígado dos jundiás foram influenciadas quando os peixes foram alimentados com dietas contendo  $0,30 \text{ g kg}^{-1}$  de aditivo probiótico ( $P < 0,05$ ). Na atividade da catalase (CAT) não ocorreu diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quanto à inclusão de probiótico nas dietas, apresentando média de  $0,52 \pm 0,13 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ . (Figura 3).



**Figura 2-** Atividade de estresse oxidativo hepático em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade.

### 3.5 Histologia hepática

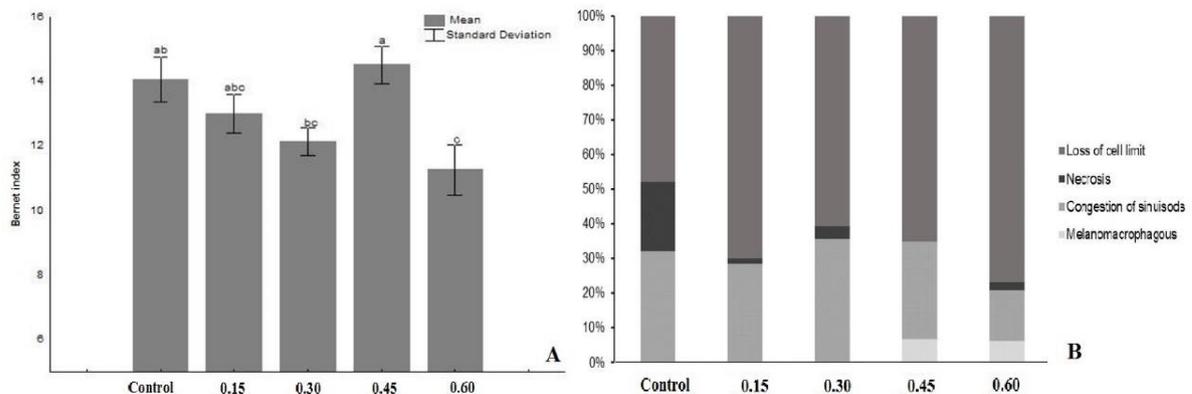
A histomorfometria dos hepatócitos indicou o desenvolvimento diferenciado das células dos jundiás, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) a partir da inclusão de  $0,30 \text{ g kg}^{-1}$  de probiótico nas dietas (Tabela 6).

**Tabela 6-** Histomorfometria e histoquímica hepática em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

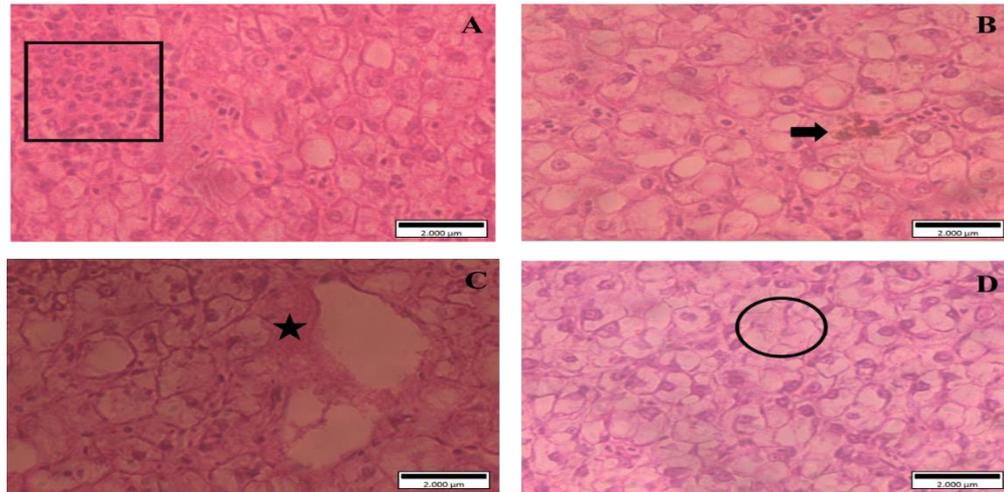
Variáveis	Níveis de probiótico $\text{g Kg}^{-1}$ ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC)					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
Glicogênio (%)	6,90±1,97ab	8,06±0,91b	5,85±1,27ab	7,87±1,40ab	5,33±0,99a	*
Número de hepatócitos ( $\mu\text{m}$ )	333,36±16,56b	360,43±18,62c	265,36±23,40a	344,00±23,24bc	448,21±31,80d	*
Diâmetro do hepatócito ( $\mu\text{m}$ )	3,05±0,03ab	3,23±0,17b	3,22±0,04b	3,17±0,14ab	2,97±0,11a	*
Área do hepatócito ( $\mu\text{m}^2$ )	7,30±0,17ab	8,29±0,88b	8,15±0,21b	7,93±0,74ab	6,96±0,50a	*
Perímetro do hepatócito ( $\mu\text{m}$ )	9,57±0,11ab	10,16±0,53b	10,11±0,13b	9,97±0,46ab	9,34±0,34a	*
Diâmetro do núcleo ( $\mu\text{m}$ )	1,22±0,06ab	1,18±0,15ab	1,15±0,10ab	1,28±0,10b	1,09±0,06a	*
Perímetro do núcleo ( $\mu\text{m}$ )	3,78±0,11ab	3,71±0,47ab	3,61±0,33ab	4,03±0,32b	3,43±0,20a	*
Área do núcleo ( $\mu\text{m}^2$ )	1,17±0,12ab	1,11±0,30ab	1,04±0,20ab	1,30±0,21b	0,94±0,11a	*
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	0,95±0,15ab	0,90±0,38ab	0,81±0,22ab	1,12±0,27b	0,68±0,12a	*
Circularidade do núcleo (0-1)	0,99±0,01	0,99±0,01	0,99±0,01	0,99±0,01	0,99±0,01	NS
<i>Rpcn</i>	75,10±5,75b	66,34±4,77a	74,07±8,89ab	85,02±6,19c	66,83±3,46ab	*

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. *Rpcn* = perímetro do núcleo/citoplasma.

A integridade do tecido hepático dos jundiás foi mantida quando utilizado o nível de  $0,60 \text{ g kg}^{-1}$  de probiótico nas dietas, apresentando diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para alterações celulares leves a moderadas (Figura 4 e 5).



**Figura 3-** Índice de Bernet (A) e alterações celulares no fígado (B) de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.



**Figura 4** - Histologia hepática de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. (HE, objetivo 40x). (A) congestão de sinusóides (quadrado preto); (B) melanomacróforo (seta preta); (C) Necrose (estrela); (D) Perda de limite celular (área circular).

### 3.6 Histologia intestinal

A avaliação do desenvolvimento das vilosidades intestinais e concentração de células muco-secretoras apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando utilizado probiótico nas dietas dos jundiás a partir da inclusão de  $0,30 \text{ g kg}^{-1}$  (Tabela 7).

**Tabela 7-** Histomorfometria e histoquímica do intestino inicial e médio em juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Variáveis	Níveis de probiótico $\text{g Kg}^{-1}$ ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC)					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
Número de vilos	24,00±6,05ab	19,00±2,45a	20,25±4,03ab	21,75±2,50ab	25,75±2,87b	*
Altura total dos vilos ( $\mu\text{m}$ )	562,13±54,76a	595,24±48,57ab	561,99±66,64a	568,11±31,11a	682,07±97,50b	*
Altura dos vilos ( $\mu\text{m}$ )	461,18±62,61ab	482,77±28,55ab	450,01±41,23a	468,20±50,19ab	553,70±87,61b	*
Comprimento dos vilos ( $\mu\text{m}$ )	1139,96±172,01b	927,35±28,20a	1008,30±23,60ab	1005,51±53,42ab	1099,89±22,30b	*
Largura dos vilos ( $\mu\text{m}$ )	90,46±10,23a	104,49±8,41ab	100,80±6,82ab	110,49±4,04b	96,97±3,30ab	*
Espessura do vilos ( $\mu\text{m}$ )	41,73±3,63	47,10±0,21	45,28±1,48	48,07±3,47	46,04±5,56	NS
Espessura da túnica ( $\mu\text{m}$ )	89,98±6,15	94,08±16,02	107,76±23,84	93,70±18,90	112,79±6,83	NS
CMST	3141,35±501,35	2493,87±722,52	2808,97±569,51	2459,65±272,97	3163,68±332,91	NS
M.A. (%)	88,02±2,90b	82,84±1,89a	90,24±0,23b	88,33±0,03b	87,05±1,48b	*
M.N. (%)	11,97±2,90a	17,1±1,89b	9,75±0,23a	11,66±0,04a	12,95±1,48a	*
D.M. ( $\mu\text{m}$ )	3,61±0,51ab	3,60±0,60ab	3,05±0,15a	4,14±0,25b	3,30±0,56ab	*

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. CMST= Células muco secretoras totais; M.A.= Mucinas ácidas; M.N.= Mucinas neutras, D.M.= Diâmetro das mucinas.

## 4. Discussão

### 4.1 Desempenho produtivo

O ganho em peso dos jundiás que foram alimentados com uso do aditivo probiótico nas dietas apresentou aumento de 24,65% em relação aos peixes alimentados com dieta controle. Os *Bacillus* são comumente utilizados na composição dos probióticos devido suas características físicas e biológicas (Wang, Li e Lin, 2008), adaptando-se as especificidades químicas, físicas e bióticas do intestino do hospedeiro (Mello, 2013). O efeito das bactérias probióticas ocorreu possivelmente por meio do mecanismo celular, pela estimulação do sistema imune proporcionado e a homeostase intestinal, e consequentemente a melhora da digestão devido a colonização dos microrganismos com afinidade aos nutrientes, aumentando a atividade de enzimas digestivas (Samkar et al., 2017; Cao et al., 2019) possivelmente via mecanismo molecular subjacente que modificam a expressão de genes relacionados ao processo de aumento do tamanho das fibras musculares, ou seja, a hipertrofia (Asaduzzan et al., 2018), e consequentemente o ganho em peso dos peixes.

Os jundiás normalmente apresentam uma alta atividade de amilase e maltase (Meyer e Fracalossi, 2004) diferindo dentre as demais espécies de hábito alimentar onívoro, assim, esses nutrientes atuam como efeito poupador no processo digestivo e metabolismo energético por direcionar a proteína para o crescimento do peixe. E ainda, o efeito da atividade proteolítica dos *Bacillus* faz com que aumente a disponibilidade da proteína, a assimilação dos aminoácidos e as vitaminas dietéticas (Balcazar et al., 2006; Nayak, 2010; Essa et al., 2010). Fato que pode ser relacionado a redução do IGVS nos jundiás quando alimentados com dietas contendo probiótico que promoveu a eficiência na utilização e degradação dos ácidos graxos pela potencialização da ação de enzimas digestivas, influenciando a assimilação dos lipídeos e direcionando-os para metabolismo de manutenção celular (Ray, Ghosh e Ringo, 2012; Lopez et al., 2014).

A TCE dos jundiás foi influenciada pelo uso do probiótico nas dietas. As bactérias probióticas beneficiam a saúde dos peixes pelo metabolismo dos nutrientes, resultando na manutenção dos órgãos e na maturação do sistema imune inato (Gómez e Balcázar, 2008; Butt e Volkoff, 2019). Possivelmente, as células bacterianas probióticas no processo de competição com os demais microrganismos que compõe o trato intestinal e responsáveis pelo processo de digestão e absorção dos nutrientes, promovem o aumento das comunidades benéficas que reduzem a aderência dos microrganismos patogênicos na mucosa intestinal, e consequentemente beneficiando o crescimento dos peixes (Well, 2011), corroborando com o desenvolvimento dos jundiás neste estudo.

A CAA dos jundiás foi beneficiada pelo uso das bactérias probióticas nas dietas, pela relação das bactérias à atividade metabólica e endócrina (Palermo et al., 2011), e a relação de eficiência alimentar proporcionada pelos microrganismos (Taufik, Arief, e Kenconoajati, 2019), melhorando a capacidade de absorção das moléculas. O que pode ser observado neste estudo associado a morfologia intestinal dos jundiás.

O aumento da TEP nos jundiás alimentados com dietas contendo bactérias probióticas foi influenciado pela capacidade dos microrganismos probióticos em aumentar a superfície de absorção intestinal, estimulando e produzindo compostos que melhoram a digestibilidade e retenção dos nutrientes, a utilização de proteínas e o direcionamento energético (El- Haroun, Goda e Chowdhary, 2006), proporcionando maiores taxas de eficiência proteica e o aumento da área de absorção intestinal, observados neste estudo. Além disso, os *Bacillus* possuem a capacidade de produzir enzimas que aumentam a biodisponibilidade de minerais (Jesus, 2016), maximizando a utilização dos nutrientes (Cheng et al., 2014).

#### 4.2 Composição centesimal e rendimento de carcaça

O teor de umidade da carcaça dos jundiás aumentou nos peixes alimentados com dietas contendo probióticos, contudo, os valores estão dentro dos limites esperados podendo apresentar variações (Reidel, et al., 2010). Além disso, esse fator possui correlação inversa ao conteúdo lipídico (Adames et al., 2014; Olopade, 2015), este também foi influenciado pela utilização dos probióticos nas dietas dos jundiás. Entretanto, peixes jovens possuem como característica de composição corporal um maior teor de umidade e menor teor de gordura, devido ao metabolismo direcionado ao crescimento e, conseqüentemente reduzindo suas reservas nos tecidos corporais (Souza e Maranhão, 2001), fato possivelmente estimulado pela atividade metabólica dos *Bacillus* nos jundiás e a demanda energética para o desenvolvimento dos peixes.

O uso do probiótico nas dietas podem beneficiar características fisiológicas e desenvolvimento dos animais, proporcionando de crescimento e ganho em massa dos peixes e conseqüentemente, uma maior homogeneidade do lote, fator relevante para o processamento do pescado e a disponibilidade no mercado consumidor, beneficiando assim a cadeia produtiva de pescado. O padrão de qualidade da carcaça dos peixes implica diretamente na rentabilidade do processamento, *rigor mortis*, qualidade nutricional e na obtenção de subprodutos (Soares e Gonçalves, 2012), em especial os teores de lipídios e umidade são determinantes na manipulação, utilização e avaliação de coprodutos e no seu tempo de prateleira (Lui et al., 2012).

Os parâmetros de rendimento RPIE, RPI e PV dos jundiás foram influenciados pela alimentação com dietas contendo probiótico, melhorando o percentual de aproveitamento dos cortes. O processamento dos subprodutos do pescado possibilita o aproveitamento integral do peixe e contribui significativamente para o desenvolvimento do setor (Fantini et al., 2014), aumentando a rentabilidade e auxiliando a rastreabilidade do produto final, além de reduzir os impactos oriundos do descarte da indústria. O uso do aditivo probióticos pode ser considerado uma estratégia sustentável e promissora para a produção de proteína animal de alta qualidade em termos de sanidade e segurança alimentar (Ibrahem, 2015; Jesus et al., 2016; Paixão et al., 2017).

#### *4.3 Bioquímica plasmática*

A concentração da glicose foi superior nos jundiás alimentados com dietas contendo probióticos, estando acima do limite normal para o jundiá (Borges et al., 2004). Este fato está relacionado à atividade das bactérias no trato intestinal e ao metabolismo energético do hospedeiro (Martin et al., 2008), pela maior disponibilidade e absorção dos nutrientes que compõe as dietas, possivelmente a partir da modulação de genes que interferem no metabolismo da glicose (Stancu et al., 2014), resultando no aumento glicêmico. Resultados semelhantes foram descritos por Stancu et al. (2014) e Marengoni et al. (2015).

O aumento no nível de triglicerídeos sérico nos jundiás que foram alimentados com dietas contendo probióticos pode ter ocorrido devido aos microrganismos aperfeiçoarem a absorção e digestão de carboidratos pela produção enzimática (Pedrottiet al., 2013) no trato intestinal dos peixes, modificação de degradação substâncias por pela atividade das bactérias nos níveis de pH, absorção de minerais e síntese de vitaminas (Pond et al., 2006; Saad, 2006). E ainda, alterações no sistema entero-hepático pelo processo circulatório, atividade dos ácidos biliares e absorção dos enterócitos no intestino (Martin et al., 2008), devido a relação do metabolismo lipídico e a atividade hepática, a partir da ação dos quilomícrons que são sintetizados no intestino e responsáveis pelo transporte de triglicerídeos no organismo (Nelson and Cox, 2018).

Os níveis de colesterol total foram reduzidos nos jundiás alimentados com dietas contendo bactérias probióticas, segundo Tomaro-Duchesneau et al. (2014), as bactérias probióticas auxiliam na absorção e direcionamento energético. Os peixes são geralmente considerados hipolipidêmicos, e nesse sentido, o probiótico atua melhorando o metabolismo lipídico no mecanismo de absorção, retenção e direcionamento dos nutrientes pelas células, proporcionando a redução dos teores sanguíneos.

O uso do aditivo probiótico nas dietas dos jundiás resultou ainda na diminuição das concentrações plasmáticas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), resultado semelhante ao observado por Martin et al. (2008), indicando a modulação no sistema hepático e a atuação dos sais biliares, proporcionando a redução sistêmica de lipídios na corrente sanguínea. Ocorreu ainda o aumento no nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL) nos jundiás alimentados com dietas contendo probiótico. Neste sentido, a ação das bactérias probióticas provavelmente proporcionou um aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta que compõe os enterócitos que revestem o intestino e atuam ainda no transporte de substâncias entre as células, fatores essenciais ao equilíbrio do sistema digestivo (Nelson & Cox, 2018). Além disso, as bactérias podem auxiliar na quebra das moléculas lipídicas promovendo o direcionamento ao metabolismo do hospedeiro (Falcinelli et al., 2015).

A proteína plasmática dos jundiás quando alimentados com dietas contendo os probióticos mantiveram-se dentro do nível esperado para a espécie (Borges et al., 2004). A influência dos *Bacillus* no perfil sérico ocorre a partir de frações proteicas que atuam na atividade complementar das células de defesa, no transporte de nutrientes, processo de fagocitose e no equilíbrio osmótico (Opiyo et al., 2019), modulando compostos como as albuminas, globulinas e fibrinogênio, que indicam o estado nutricional dos peixes.

As variações nas variáveis plasmáticas podem ser categorizadas pela carga ou sobrecarga alostática em termos de manutenção da homeostase dos animais via modificações fisiológicas no sistema digestivo promovido pelas bactérias probióticas (Mceven, 2003).

#### *4.4 Estresse oxidativo e atividade antioxidante*

Os níveis de GST nos jundiás estão relacionados com a ação de defesa antioxidante, de acordo com Spyropoulous et al. (2011), as bactérias promovem a liberação de glutathione e vitaminas que são direcionadas para a manutenção do organismo aumentando a síntese no hepatopâncreas (Lutgendorff et al., 2009). As bactérias probióticas agem na modulação de enzimas metabólicas apresentando efeito terapêutico no eixo de interação do intestino que integra a atuação do fígado, pelo metabolismo redox e maior atividade das enzimas digestivas (Neumann et al., 1998).

Os probióticos englobam ações multifuncionais, influenciando na defesa antioxidativa, no balanço e estresse oxidativo em peixes (Kullisaaret et al., 2012), reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) durante a ingestão (Amaretti, et al., 2013). Contudo, o sistema de defesa antioxidante é estimulado e ligado a respostas de patógenos no hospedeiro. Este fato pode estar relacionado aos níveis de CAT encontrados nos jundiás, que

mantiveram padrão semelhante, pois os animais apresentaram respostas fisiológicas estáveis na proporção de espécies reativas de oxigênio ERO's e espécies reativas de nitrogênio ERN's (Silva et al., 2012) e à não liberação de peróxido de hidrogênio no processo de  $\beta$ -oxidação.

Os baixos níveis de TBARS no fígado dos jundiás indicam melhora no status antioxidante nos tecidos dos peixes, pois o composto representa produtos finais do processo de peroxidação lipídica ocasionando danos no citoplasma, na sequência de DNA e na proteína no fígado (Vieira et al., 2018), indicando que a redução da peroxidação lipídica, melhora na qualidade da carne e resistência ao estresse oxidativo.

Os efeitos benéficos na redução do estresse oxidativo celular refletem no crescimento dos animais e homeostase, pois o fígado é o principal órgão de síntese de fatores de crescimento e hormônios, e os hepatócitos auxiliam na regulação do metabolismo dos nutrientes e excreção de substâncias tóxicas (Midhun et al., 2019), corroborando com os processos fisiológicos do tecido hepático encontrados neste estudo e o ótimo crescimento dos jundiás, quando alimentados com dietas contendo probiótico. As bactérias probióticas agem na modulação de enzimas metabólicas apresentando efeito terapêutico no eixo de interação do intestino que integra a atuação do fígado, pelo metabolismo redox e maior atividade das enzimas digestivas (Neumann et al., 1998).

A atividade metabólica dos probióticos, em especial dos *Bacillus* elimina compostos oxidantes e previne sua geração (Azcarote Peril et al., 2011), regula e repara danos nos tecidos (Tang et al., 2018), removendo o excesso de radicais livres. Ainda, a partir de mecanismos de estímulos a secreção de enzimas, promove o aumento de substâncias protetoras, a eliminação de ERO's, quelação de íons metálicos, entre outros fatores (Wang et al., 2017). E isso vem de encontro ao presente estudo, pois foi observado as respostas fisiológicas nos jundiás beneficiando o crescimento e a saúde dos peixes.

#### 4.5 Histologia hepática

A redução do glicogênio hepático nos jundiás que foram alimentados com probióticos reflete o direcionamento dos metabolitos ao desenvolvimento dos animais, demonstrando a relação com a síntese de aminoácidos pela eficiência proteica e GP dos peixes. Fato semelhante foi encontrado por Martin et al. (2008), corroborando com a redução dos níveis plasmáticos de lipoproteínas que demonstram melhor assimilação dos aminoácidos pelo hospedeiro. As alterações no fluxo de ácidos graxos no fígado e a interação com ácidos biliares estimulam a atividade proteolítica, o metabolismo bacteriano e a transaminação dos aminoácidos, e refletem na melhor utilização dos lipídios oriundos das dietas (Martin et al., 2008).

O aumento quantitativo dos hepatócitos nos jundiás alimentados com dieta contendo probiótico pode estar relacionado a ação hepatoprotetora promovida pelas bactérias para reduzir sua própria oxidação, evitando a produção e assimilação de substâncias nocivas à saúde dos peixes (Zelikoff, 1998). O aumento no processo de regeneração dessas células é estimulado pelos hormônios insulina e glucagon, que são responsáveis pelo aumento da glicogênese e glicogenólise (Jesus et al., 2000), relacionados ao metabolismo das moléculas, o que pode ser observado nos jundiás.

A histomorfometria dos hepatócitos serve como biomarcador do estado metabólico da célula (Rodrigues et al., 2017). No caso dos jundiás alimentados com dietas contendo bactérias probióticas ocorreu uma redução nos parâmetros morfométricos avaliados pelo uso de glicogênio como fonte de energia aos peixes, e conseqüentemente refletindo no tamanho e estrutura dos hepatócitos, indicando perda de material armazenado no citoplasma e alteração na atividade nuclear (Power et al., 2000; Souza et al., 2001), ocorrendo a redução de sobrecarga do fígado durante os processos metabólicos. Os hepatócitos são considerados células versáteis por realizar inúmeras funções metabólicas, podendo ser influenciados e interagirem com diferentes vias hormonais, em especial pelos hormônios do crescimento, que por sua vez são impulsionados a serem secretados no hospedeiro pelas bactérias probióticas.

A histopatologia hepática nos jundiás alimentados com dietas contendo bactérias probióticas identificou efeito benéfico do uso do aditivo, pois ocorreu a redução de danos no tecido, contudo, alterações como a perda do limite celular e a congestão de sinusoides podem ser observadas nos peixes. Contudo, todas as células hepáticas proliferam para substituir a perda do tecido a partir de um processo regenerativo, evento que promove a manutenção do tecido que é altamente ordenado e organizado (Jesus, Waitzberg e Campos 2000), como pode ser observado nas respostas a atividade de estresse oxidativo hepático dos jundiás que receberam probiótico nas dietas, exceto o grupo com  $0,30 \text{ g kg}^{-1}$  probiótico na ração.

#### *4.6 Histologia intestinal*

O aumento da área de superfície de absorção nas propriedades das vilosidades intestinais promovidas pelas bactérias probióticas neste estudo indicam o efeito benéfico do aditivo, influenciando positivamente e mantendo a integridade da mucosa intestinal, aumentando a área de absorção e retenção dos nutrientes devido a expansão do epitélio e as células absorptivas com a finalidade de maximizar o aproveitamento dos nutrientes (Martins et al., 2016), nesse caso, as bactérias probióticas auxiliam no aumento da área de absorção e

atividade na mucosa intestinal, o que pode ser observado neste estudo, promovendo consequentemente a homeostase intestinal nos peixes (Mello et al., 2013).

A suplementação de *Bacillus* nas dietas alterou a morfologia intestinal com aumento na altura e largura das vilosidades, consequentemente elevando a capacidade de absorção dos nutrientes (Zang et al. 2015; Cao et al., 2019), podendo estar relacionada à inibição de bactérias patogênicas ao epitélio intestinal, produção de nutrientes para as células da mucosa, redução de amônia e eliminação de amins tóxicas, produção de vitaminas, absorção e biodisponibilidade de minerais, funcionando como barreira de proteção a superfície das vilosidades e a regeneração da mucosa (Ukena et al., 2007; Paixão e Castro, 2016).

Os equilíbrios entre os movimentos peristálticos e a atividade de absorção do tecido auxiliam no processo de digestão, refletindo consequentemente nas características da musculatura da túnica intestinal. Contudo, neste estudo não ocorreram alterações na espessura da túnica muscular, indicando o melhor aproveitamento e absorção pelo intestino sem sobrecarregar a atuação do tecido muscular e as células da mucosa, sem impactar negativamente a capacidade digestiva e o tempo de passagem no processo de digestão (Silva et al., 2014).

A morfologia intestinal dos jundiás apresentou aumento de células muco secretoras, com maior expressão de mucinas neutras ao longo do comprimento, característica da espécie (Hernández et al., 2008; Facioli et al., 2012). Os componentes das mucinas funcionam com receptores, envolvendo os microrganismos, anulando sua capacidade patogênica. As mucinas ácidas e neutras funcionam como uma barreira bacteriana ou sítio de ligação para os microrganismos patogênicos, contudo, as mucinas neutras apresentam uma maior densidade nos fluidos secretados, característica importante na proteção celular a agentes danosos (Beamish et., 1972) A administração de probiótico em peixes proporciona o aumento da imunidade da mucosa intestinal, com maior atividade e secreção de muco indicativo da atividade de um intestino saudável. Estudos relatam a influência de bactérias probióticas na produção de células caliciformes (Elsabagh et al., 2018, Yang et al., 2019), sendo que estas estão relacionadas a boa qualidade da microbiota local (Mello et al., 2013).

A modulação da microbiota intestinal dos jundiás e os efeitos na manutenção da integridade das microvilosidades e a melhora no transporte dos nutrientes pelo epitélio (Sminov, Perez, Amit Romach, Sklan e Uni, 2005), promovido pelo uso do probiótico nas dietas, favorecendo o processo de defesa na ação de bactérias patogênicas (Mello et al., 2013).

## 5. Conclusão

O uso do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* e *B. cereus* ( $4 \times 10^{11}$  UFC) beneficia o desenvolvimento e a saúde dos jundiás em fase de crescimento, podendo ser utilizado  $0,60 \text{ g. kg}^{-1}$  de ração.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Data availability statement

We are pleased to inform that our experimental data are available for any request or doubt.

## Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors would like to thank Imeve S.A. for donating the evaluated product.

## ORCID

Mariana Lins Rodrigues <https://orcid.org/0000-0003-4957-9626>

## Referências

- ABASALI , H. AND MOHAMAD, S. (2010). Effect of Dietary Supplementation with Probiotic on Reproductive Performance of Female Livebearing Ornamental Fish. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2(2), 11-15.
- ABDELKHALEK, N. K. M., EISSA, I. A. M., AHMED, E., KILANY, O. E., EL-ADL, M., DAWOOD, M. A. O., ABDEL-DAIM, M. M. (2017). Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 54, 99–104.
- AKHTER, N., WU, B., MEMON, A. M., & MOHSIN, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741.
- ALBUQUERQUE, D. M., MARENGONI, N. G., MAHL, I., MOURA, M. C., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P., JULIANA MINARDI GALO, J. M., RIBEIRO, R.P. (2015). *Bacillus* em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, variedade gift. *Biosci. J.*, 31(2), 532-540.
- AL-DOHAIL, M.A.; HASHIM, R.; ALUYU-PAIKO, M. (2011). Evaluation the use *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish, *Clarias gariepinus*, juveniles. *Aquaculture Research*, 42, 196-209.
- AMAL, M.N.A. AND SAAD, M.Z. (2011). Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 34 (2), 195-206

- AMARAL JUNIOR, H., GARCIA, S., WARMLING, P. F., SILVA, B. C., MARCHIORI, N. C. (2015). *Assim cultivamos o Jundiá Rhamdia quelen no estado de Santa Catarina* (1ª ed., 78 p.). EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC, Camboriú, Santa Catarina, BR.
- AMARAL JUNIOR, H.; NUNES, M. F. S.; GARCIA, S. (2008). Análise de diferentes dosagens de hormônio na ração para definição de um protocolo de feminilização do jundiá *Rhamdia quelen*. *Revista Eletrônica de Veterinária*, 9(12), 1-7.
- AMARAL-JÚNIOR, H. E GARCIA, S. (2013). *O Jundiá Rhamdia quelen - Relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce nativo mais promissor da região sul do Brasil*. (Org.) – 1ª Edição - Camboriú SC. EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC. 60 p.
- APÚN - MOLINA, J. P., SANTAMARÍA- MIRANDA, A., LUNA-GONZALEZ, A., MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F., ROJAS-CONTRERAS, M. (2009). Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research*, 40(8), 887-894.
- ARIĞ, N., SUZER, C., GÖKVARDA, A., BAŞARAN, F., ÇOBAN, D., YILDIRIM, S., KAMACI, H.O., FIRAT, K., SAKA, S. (2013) Effects of Probiotic (*Bacillus* sp.) Supplementation during Larval Development of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 407-414.
- ASHRAF, R., AND SHAH, N. P. (2014). Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 938–956.
- AVELLA, M. A., PLACE, A., DU, S.-J., WILLIAMS, E., SILVI, S., ZOHAR, Y., & CARNEVALI, O. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* Accelerates Zebrafish Backbone Calcification and Gonadal Differentiation through Effects on the GnRH and IGF Systems. *PLoS ONE*, 7(9), e45572.
- AZEVEDO, R. V., FOSSE FILHO, J. C., PEREIRA, S. L., CARDOSO, L. D., JÚNIOR, M. V. V.; ANDRADE, D. R. (2016). Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(1), 9-16.
- AZEVEDO, R.V., FOSSE FILHO, J.C., CARDOSO, L.D., MATTOS, D.C., VIDAL JÚNIOR, M.V., ANDRADE, D.R. (2015) Economic evaluation of prebiotics, probiotics and symbiotics in juvenile Nile tilapia. *Revista Ciência Agronômica*, 46(1), 72-79.
- BAGHERI, T., HEDAYATI, S., YAVARI, V., ALIZADE, M., FARZANFAR, A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 8, 43-48.
- BALCAZAR J. L., DE BLAS I., RUIZ-ZARZUELA I., VENDRELL D., CALVO A. C., MARQUEZ I., GIRONES O., MUZQUIZ J. L. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97, 522-527.
- BALDISSEROTTO, B. (2002). *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: UFSM, 212 p.
- BALDISSEROTTO, B., CYRINO, J. E. P. AND URBINATI, E.C. (2014). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. FUNEP-UNESP Jaboticabal, São Paulo, BR.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (2018). *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. 2ª ed. Santa Maria: UFSM, 608 p.
- BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, M.R., FIOREZE, I., CERICATO, L., SOSO, A.B., FAGUNDES, M., CONRAD, J., BALDISSERA, R.K., BRUSCHI, A., & RITTER, F. (2004). Nursery rearing of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture*, 232, 383-394
- BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., RODRIGUES, L.B., SANTOS, L.R., MOTTA, A.C., RITTER, F., BEDIN, A.C., SILVA, L.B. 2008. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*:

- aspecto macroscópico e microscópico das lesões e perfis de resistência a antibióticos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 34(3), 355-363.
- BEM-AMOR, K., VAUGHAN, E.E., DE VOS, W.M. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.*, 137(3), 741-747.
- BHASKAR, N., SUDEEPA, E. S., RASHMI, H.N., SELVI, A. T. (2007). Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus*-CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresour. Technol.*, 98, 2758-2764.
- BITTENCOURT, F., DAMASCENO, D., DIEMER, O., BOSCOLO, W., FEIDEN, A., & ROMAGOSA, E. (2018). The effects of L-lysine in the diet of silver catfish (*Rhamdia voulezi*) female broodstock. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46, 176-186.
- BITTENCOURT, F., DAMASCENO, D.Z., LUI, T. A., SIGNOR, A., SANCHES, E.A., NEU, D.H. (2018). Water quality and survival rate of *Rhamdia quelen* fry subjected to simulated transportation at different stock densities and temperatures. *Acta Sci., Anim. Sci.*, 40, e37285.
- BOLASINA, S., PÉREZ, A. AND YAMASHITA, Y. (2006). Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252, 503-515.
- BRITO, J., FERREIRA, A. H. C., SANTANA JÚNIOR, H. A., ARARIPE, M. N. B. A., LOPES, J. B., DUARTE, A. R., CARDOSO, E. S., RODRIGUES, V. L. (2014). Probiótico, prebiótico e simbiótico na alimentação de não-ruminantes. *Revista Eletrônica Nutrime*, 11(1), 3070-3084.
- BUCIO, A., HARTEMINK, R., SCHRAMA, J. W., VERRETH, J., ROMBOUTS, F. M. (2005). Survival of *Lactobacillus plantarum* 44a after spraying and drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(4), 221-227.
- BUREY, P. B. AND GIDLEY, M. (2009). Gel particles from spray-dried disordered polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 76, 206-213.
- CAHILL M.M. (1990). Virulence factor in motile *Aeromonas*: a review. *J. Appl. Bacteriol.* 16, 1-16.
- CARNEVALI O, AVELLA MA, GIOACCHINI G (2013). Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol*, 188, 297-302.
- CARNEVALI, O., MARADONNA, F. AND GIOACCHINI, G. (2016). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, 472, 144-155.
- CHABRILLON, M., RICO, R. M., BALEBONA, M. C., MORINIGO, M. (2005). Adhesion to sole *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida. *J. FishDis.*, 28(22), 9-37.
- CHAMPAGNE, C., GARDNER, N., AND ROY, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.
- COELHO, L. M., REZENDE, H. C., COELHO, L. M., DE SOUSA, P. A. R., MELO, D. F. O., & COELHO, N. M. M. (2015). Bioremediation of Polluted Waters Using Microorganisms. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*, 1-23.
- COSTA, M. M., PEIXOTO, R. M., BOJINK, C. L., CASTAGNA, L., MEURER, F., e VARGAS, A. C. (2008). Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(10):477-480.
- DAWOOD, M. A. O. AND KOSHIO, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243-251.
- DAWOOD, M. A. O., KOSHIO, S., ABDEL-DAIM, M. M., VAN DOAN, H. (2018). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1-18.
- DAWOOD, M. A., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., YOKOYAMA, S., EL BASUINI, M. F., HOSSAIN, M. S., NHU, T. H.; DOSSOU, S.; MOSS, A. S. (2016). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut

- microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 275-285.
- DAWOOD, M. A. O., KOSHIO, S. H., ISHIKAWA, M. AND YOKOYAMA, S. (2015). Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) supplemental diets on growth performance, stress resistance and immune response of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 442, 29–36.
- DEVARAJA, T., BANERJEE, S., YUSOFF, F., SHARIFF, M., KHATOONA, H. (2013) holistic approach for selection of *Bacillus spp.* as a bioremediator for shrimp postlarvae culture *Turk. J. Biol.*, 37, 92-100.
- DIAS, D. C., LEONARDO, A. F. G., TACHIBANA, L., CORREA, C. F., BORDON, I. C. A. C., ROMAGOSA, E., RANZANI-PAIVA, M. J. T. (2012). Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(1), 40-45.
- DIEMER, O., BITTENCOURT, F., BARCELOS, L.G., BOSCOLO, W.R., FEIDEN, A., ROMAGOSA, E. (2014). Lysine in the diet of *Rhamdia voulezi* male broodstocks confined in net cages. *Aquaculture*, 434, 93-99.
- DIEMER, O., NEU, D.H., SARY, C., FINKLER, J.K., BOSCOLO, W.R., FEIDEN, A. (2012). *Artemia sp.* na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Animal Brasileira*, 13, 175–179.
- DOWARAH, R., VERMA, A. K., AGARWAL, N., SINGH, P., & SINGH, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLOS ONE*, 13(3), e0192978.
- EL-BASUINI, M. F., EL-HAIS, A. M., DAWOOD, M. A. O., ABOU-ZEID, A. E.-S., EL-DAMRAWY, S. Z., KHALAFALLA, M. M. E.-S., DOSSOU, S. (2017). Effects of dietary copper nanoparticles and vitamin C supplementations on growth performance, immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1329–1340.
- EL-DAKAR A.Y., SHALABY S.M. & SAOUD I.P. (2007). Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutritio*, 13, 407-412.
- FALCINELLI, S., RODILES, A., UNNIAPPAN, S., PICCHIETTI, S., GIOACCHINI, G., MERRIFIELD, D. L., CARNEVALI, O. (2016). Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13.
- FAO (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Meeting the sustainable development goals. Rome.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2001). *Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina.
- FIROUZBAKHS, F., NOORI, F., KHALES, M.K., JANI-KHALILI, K. (2011) Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish. Physiol. Biochem.*, 37, 833–842.
- FONTANA, L., BERMUDEZ-BRITO, M., PLAZA-DIAZ, J., MUÑOZ-QUEZADA, S., GIL, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(2), 35-50.
- FRACALOSS, D. M. AND CYRINO, J. E. P. (2013). *Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira* (375p.). Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática/AQUABIO, Florianópolis, Santa Catarina, BR.
- FRACALOSS, D. M., MEYER, G., WEINGARTNER, M., SANTAMARIA, FÁBIO MAZZOTTI ZANIBONI FILHO, E. (2004). Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do

- Dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum*, 26(3), 345-352.
- FREITAS, J. M. A., SARY, C., LUCHESI, J. D., FEIDEN, A., BOSCOLO, W. R. (2011). Proteína e energia na dieta de jundiás criados em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 2628- 2633.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365-378.
- GABBAY, M.I. (2012). *Avaliação da suplementação alimentar com bactéria probiótica no crescimento e sanidade de Arapaima gigas em sistema de recirculação de água*. Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.
- GARCIA, L. DE O., BECKER, A. G., CUNHA, M. A., BALDISSEROTTO, B., COPATTI, C. E., & KOCHHANN, D. (2011). Effects of Water pH and Hardness on Infection of Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(3), 399–405.
- GARCIA, S., AMARAL-JÚNIOR, H., YASUY, G.S., LIEBL, F., SOUTO, L.I.M., ZANIBONI-FILHO, E. (2017). Tetraploidia em *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) por choque térmico duplo (quente e frio). *B. Inst. Pesca*, 43(2), 257 - 265.
- GARCIA-MARENGONI, N., MOURA, M.C., OLIVEIRA, N.T.E., BOMBARDELLI, R.A., ALBUQUERQUE, D.M. (2015). Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(3), 601-606.
- GATESOUBE, FJ, (1999). O uso de probióticos na aquicultura. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- GHADBAN, G.S. (2002). Probiotics in Broiler production- a review. *Arch. Geflügelk*, 66(2), 49- 58.
- GHOSH, S., SINHA, A. AND SAHU, C. (2007). Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38(5), 518-526.
- GIOACCHINI, G., GIORGINI, E., VACCARI, L. E CARNEVALI, O. (2014). Can Probiotics Affect Reproductive Processes of Aquatic Animals? *Aquaculture Nutrition*, 328–346.
- GIOACCHINI, G., LOMBARDO, F., MERRIFIELD, D.L., SILVI, S., CRESCI, A., AVELLA, M.A., CARNEVALI, O. (2011). Effects of Probiotic on Zebrafish Reproduction. *Journal of Aquaculture Research & Development*, s1, 1-6.
- GIORGIO G., NINA C. AND YANTYATI, W. (2010). Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol.*, 161, 480-487.
- GÓMEZ, G. D., AND BALCÁZAR, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145–154.
- GOMINHO-ROSA, M. DO C., RODRIGUES, A. P. O., MATTIONI, B., DE FRANCISCO, A., MORAES, G., & FRACALLOSSI, D. M. (2015). Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture*, 435, 92–99.
- GROSELL, M., FARRELL, A. P. AND BRAUNER, C. J. (ed.) (2011). *The Multifunctional Gut of Fish*. Fish Physiology, Vol. 30. San Diego, CA: Academic Press.
- GUERINI, S., PRADO, G. P., DOS PASSOS, M. G. (2014). Hábito alimentar de *Rhamdia quelen* (siluriformes: pimelodidae) em um trecho do rio bonito no município de São Domingos, Santa Catarina. *Revista uninga review*, 18(2), 2178-2571.
- HAI, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935.

- HASSAAN, M. S., SOLTAN, M. A., JARMOŁOWICZ, S., & ABDO, H. S. (2017). Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 83–93.
- HERNÁNDEZ, D. R., PÉREZ GIANESELLI, M., DOMITROVIC, H.A. (2009). Morphology, histology and histochemistry studies of the digestive tract of South American catfish (*Rhamdia quelen*). *Int. J. Morphol.*, 27, 105-111.
- HERNÁNDEZ, D. R., SANTINÓN, J. J., SÁNCHEZ, S., DOMITROVIC, H. A. (2014). Estudio histológico e histoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva, *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(5), 1136-1147.
- HONG, H. A., HUANG, J.-M., KHANEJA, R., HIEP, L. V., URDACI, M. C., & CUTTING, S. M. (2008). The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 510–520.
- HYRONIMUS, B., LE MARREC, C., HADJ SASSI, A., DESCHAMPS, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61(2-3), 193–197.
- IBRAHEM, M. D. (2015). Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent perspectives. *Journal of Advanced Research*, 6(6), 765–791.
- IRIANTO, A. AND AUSTIN, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25, 633-642.
- JESUS, G. F. A., VIEIRA, F. D. N., SILVA, B. C., JUNIOR, M. M. D. S., USHIZIMA, T. T., SCHMIDT, E. C., BOUZOU, Z.L., PEREIRA, S.A, PEREIRAA, G.V., MARTINS, M.L., MOURIÑO, J. L. P. (2016). Probiotic bacteria may prevent haemorrhagic septicaemia by maturing intestinal host defences in Brazilian native surubins. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 484–491.
- JIN, L.Z., HO, Y. W., ZHAO, X. P (1997). Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal.*, 53, 351-368.
- KAPAREIKO, D., LIM, H. J., SCHOTT, E. J., HANIF, A. AND G. H. WIKFORS. (2011). Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: II. Effects of a *Vibrio* sp. Probiotic Candidate Upon Survival of Oyster Larvae (*Crassostrea virginica*) in Pilot-Scale Trials. *J. Shellfish Res.*, 30, 617-625.
- KESARCODI-WATSON, A., KASPAR, H., LATEGAN, M. J., GIBSON, L. (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1-14.
- KESARCODI-WATSON, A., KASPAR, H., LATEGAN, M. J., GIBSON, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1-14.
- KOLNDADACHA, O. D., ADIKWU, I. A., OKAEME, A. N., ATIRIBOM, R. Y., MOHAMMED A., MUSA, Y.M. (2011). The Role of probiotics in aquaculture in Nigeria– a review. *Continental J. Fisheries and Aquatic Science*, 5(1), 8-15.
- LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. (2014). Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 990-998.
- LEBLANC, J. G., LAIÑO, J. E., DEL VALLE, M. J., VANNINI, V., VAN SINDEREN, D., TARANT, M. P., DE VALDEZ, G. F., GIORI, G. S., SESMA, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1297–1309.
- LEE, N. K., KIM, S. Y., CHOI, S. Y., & PAIK, H. D. (2013). Probiotic *Bacillus subtilis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 22, 1-5.

- LI, B-Z.; WANG, L-J.; LI, D.; BHANDARI, B.; LI, S.; LAN, Y.; CHEN, X. D.; MAO, Z. (2009). Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *Journal of Food Engineering*, 250-254.
- LI, J., TAN, B., MAI, K., AI, Q., ZHANG, W., XU, W., MA, H. (2006). Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture*, 253(1-4), 140-147.
- LIU, C.H., CHIU, C.S., HO, .PL., WANG, S.W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1081-1041.
- LIU, C.-H., WU, K., CHU, T.-W., & WU, T.-M. (2017). Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture International*, 26(1), 63–74.
- LOMBARDO, F., GIOACCHINI, G. AND CARNEVALI, O. (2011). Probiotic-Based Nutritional Effects on Killifish Reproduction. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2011(33), 1-11.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (EDS.). (2010). *Microbiologia de Brock*. 12<sup>a</sup> Edição. Porto Alegre: Editora Artmed.
- MAGNADÓTTIR, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12(4), 361-379.
- MAKINO, L.C., FAUSTINO, F., PAES, M.C.F., BERALDO-MASSOLI, M.C., CARDOZO, M.V., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., & NAKAGHI, L.S.O. (2012). Morfologia e quantificação da microbiota intestinal do curimatá (*Prochilodus lineatus*) e do cascudo cinza (*Pterygoplichthys anisitsi*) cultivados em cativeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64(4), 916-926.
- MARTENS J.H., BARG H., WARREN M.J., JAHN D. (2002). Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 58, 275–285
- MARTÍNEZ-CRUZ, P., IBÁÑEZ, A.L., HERMOSILLO, O.A.M., SAAD, H.C.R. (2012). Review Article: Use of Probiotics in Aquaculture. *International Scholarly Research Network, ISRN Microbiology*, 2012(1), 1-13.
- MARTINS, M. L., XU, D. H., SHOEMAKER, C. A., & KLESIUS, P. H. (2011). Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), 774–780.
- MEHRIM, A. I., KHALIL, F. F. AND HASSAN, M. E. (2014). Hydroyeast Aquaculture® as a reproductive enhancer agent for the adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(2), 371–381.
- MELLO, H. (2012). *Bacillus cereus e Bacillus subtilis na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (Oreochromis niloticus) e seu efeito probiótico*. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 57p.
- MENEZES, C.R., BARIN, J. S., CHICOSKI, A. J., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., FRIES, L. L. M., TERRA, N. N. (2013). Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas / Microencapsulatio of probiotics: progress and prospects. *Ciênc. Rural*, 43(7), 1309-1316.
- MENEZES, M.F.S.C., RODRIGUES, L.Z., CAVALHEIRO, C.P., ETCHEPARE, M.A., MENEZES, C.R. (2015). Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina. *Ciência e Natura*, 37(5), 30-37.
- MERRIFIELD D.L., DIMITROGLOU A., BRADLEY G., BAKER R.T.M., DAVIES S.J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.*, 16, 504-510.

- MERRIFIELD, D.L., BRADLEY, G., BAKER, R.T.M., DIMITROGLOU, A. AND DAVIES, S.J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I: Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquaculture Nutrition* 16, 504–510.
- MICCOLI, A., GIOACCHINI, G., MARADONNA, F., BENATO, F., SKOBO, T., CARNEVALI, O. (2015). Beneficial bacteria affect *Danio rerio* development by the modulation of maternal factors involved in autophagic, apoptotic and dorsalizing processes. *Cellular Physiology Biochemistry*, 35(5), 1706-1718.
- MOHAPATRA, S., CHAKRABORTY, T., KUMAR, V., DEBOECK, G., MOHANTA, K.N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97(3), 405-430.
- MONTANHA, F. P., NAGASHIMA, J. C., KIRNEW, M. D., ASTRAUSKAS, J. P., PIMPAO, C. T. (2011). Características Fisiológicas e Reprodutivas do *Rhamdia quelen*. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 1, 1-8.
- MOUBARECK, C., GAVINI, F., VAUGIEN, L., BUTEL, M.J., DOUCER- POPULARIE, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of Bifidobacteria. *J. Antimicrob. Chemo.*, 55, 38–44.
- MCEWEN, B. S. Interacting mediators of allostasis and allostatic load: towards an understanding of resilience in aging. *Clinical and Experimental*, 52, 10 – 16.
- NAKANDAKARE, I.B., IWASHITA, M.K.P., DIAS, D.C., TACHIBANA, L., RANZANI-PAIVA, M.J.T., ROMAGOSA, E. (2013). Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. *Bol. Inst. Pesca*, 39(2), 121-135.
- NATH, A., MOLNÁR, M. A., CSIGHY, A., KŐSZEGI, K., GALAMBOS, I., HUSZÁR, K. P., ... VATAI, G. (2018). Biological Activities of Lactose-Based Prebiotics and Symbiosis with Probiotics on Controlling Osteoporosis, Blood-Lipid and Glucose Levels. *Medicina*, 54(6), 98.
- NAYAK S. K., SWAIN P., MUKHERJEE S. C. (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shelf. Immunol.*, 23, 892-896.
- NAYAK, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 2-14.
- NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V. (2012). Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary microbiology*, 159, 443-450
- NELSON, D. L., & COX, M. M. (2018). *Lehninger principles of biochemistry*, 7th ed. W. H. Freeman
- OCHOA-SOLANO, J.L. AND OLMOS-SOTO, J. (2006). The functional property of Bacillus for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23, 519-525.
- OELSCHLAEGER, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 300(1), 57-62.
- OLIVEIRA FILHO, P.R.C.; FRACALOSSO, D.M. (2006). Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1581-1587.
- OPIYO, M. A., JUMBE, J., NGUGI, C. C., & CHARO-KARISA, H. (2019). Dietary administration of probiotics modulates non-specific immunity and gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 7(1), 1–9.
- PAIXÃO, A. E. M., SANTOS, J. C., PINTO, M. S., PEREIRA, D. S. P., RAMOS, C. E. C. O., CERQUEIRA, R. B., SILVA, R. F. (2017). Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture International*, 1–11.

- PAIXÃO, L.A., CASTRO, F.F.S. (2016). A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro\*. *Universitas: Ciências da Saúde, Brasília*, 14(1), 85-96.
- PALERMO, F. A., MOSCONI, G., AVELLA, M. A., CARNEVALI, O., VERDENELLI, M. C., CECCHINI, C., POLZONETTI-MAGNI, A. M. (2011). Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1A, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. *General and Comparative Endocrinology*, 171(3), 293–300.
- PARKER, R. B. (1974). Probiotics: the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health*, 29(2), 4-8.
- PESSINI, J. E., SANCHEZ, M. S. S., RODRIGUES, M. L., BOSCOLO, W. R., BITTENCOURT, F., SIGNOR, A. (2019). Wheat middling in diets supplemented with phytase for silver catfish juveniles. *Medicina Veterinaria-Recife*.
- POLI, M. A., SCHVEITZER, R. AND OLIVEIRA, N. (2015). The use of biofloc technology in a South American catfish (*Rhamdia quelen*) hatchery: Effect of suspended solids in the performance of larvae. *Aquaculture*, 66, 17-21.
- PRETER, V DE., RAEMEN, H., CLOETENS, L., HOUBEN, E., RUTGEERTS, P., VERBEKE, K. (2008). Effect of dietary intervention with different pre- and probiotics on intestinal bacterial enzyme activities. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 225–231.
- PEDROTTI, F. S., MOURIÑO, J. L. P., FRACALOSSO, D. M., DAVIES, S., MERRIFIELD, D. L., MARQUES, M. R. F., & FRAGA, A. P. M. (2013). The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá *Rhamdia quelen* and tilapia *Oreochromis niloticus* and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research*, 46, 1–10.
- PRIYODIP, P., PRAKASH, P. Y., & BALAJI, S. (2017). Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. *Indian Journal of Microbiology*, 57(2), 148–154.
- PURWANDARI, A. R., & CHEN, H. Y. (2013). Effects of Probiotic *Bacillus subtilis* on Intestinal Microbial Diversity and Immunity of Orange Spotted Grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Applied Biotechnology*, 1(1), 25-36.
- RADUNZ-NETO, J.; BORBA, M. R. (2013). Exigências nutricionais e alimentação do jundiá, in: FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. NUTRIAQUA: *Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1ª edição 24 ampliada, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquatica, 375 p. 2013.
- RAHIMAN, K. M. M., JESMI, Y, THOMAS, A.P., HATHA, A. A. M. (2010). Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii*.de Man). *Aquaculture Research*, 41, 120–134.
- RAMESH, D., & SOUISSI, S. (2017). Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* KADR1 and its subcellular components on immune responses and disease resistance in *Labeo rohita*. *Aquaculture Research*, 49(1), 367–377.
- RAMESH, D., VINOCHKANNA, A., RAI, A. K., VIGNESH, V. S. (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus spp.* and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immun.* 45, 268–276.
- RAY, A. K., GHOSH, K., AND RINGØ, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 465–492.
- RINGO E., LOVMO L., KRISTIANSEN M., SALINAS I., MYKLEBUST R., OLSEN R.E. & MAYHEW T.M. (2010). Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture research*, 41, 451-467.
- RINGØ, E., LØVMO, L., KRISTIANSEN, M., BAKKEN, Y., SALINAS, I., MYKLEBUST, R., OLSEN, R.E. & MAYHEW, T.M. (2010). *Lactic acidbacteriavs.* pathogens in the gastrointestinal tract of fish: A review. *Aquaculture Ressearch*, 41, 451–467.

- ROBERFROID, MB. (2000). Prebiotics and Probiotics: are they function foods? *American Journal Nutrition.*, 71, 168-187.
- RODRIGUES, A. P. P., GOMINHO-ROSA, M. D. C, CARGIM-FERREIRA, E., FRANCISCO, A. FRACALOSSO, D. D. (2012). Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Ramdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 18, 65-72.
- RODRIGUES, M. L., SANCHEZ, M. S., DAMASCENO, D. Z., BITTENCOURT, F., REIDEL, A., BARRERO, N. M., & SIGNOR, A. (2017). Reproductive performance of silver catfish fed sorghum diets supplemented with phytase. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52, 623-632.
- SAENZ DE RODRIGUEZ, M.A., DIAZ-ROSALES, P., CHABRILLON, M., SMIDT, H., ARIJO, S., LEON- RUBIO, J.M. (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*; 15, 177- 185.
- SANKAR, H., PHILIP, B., PHILIP, R., & SINGH, I. S. B. (2016). Effect of probiotics on digestive enzyme activities and growth of cichlids, *Ectoplus suratensis* (Pearl spot) and *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 852–864.
- SANSONETTI, P. J., MEDZHITOV, R. (2009). Learning Tolerance while Fighting Ignorance. *Cell*, 138(3), 416–420.
- SCHREZENMEIR, J. AND DE VRESE, M. (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics—approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda*, 73(2), 361S-364S.
- SCHULZ, D., BONELLI, R. R. AND BATISTA, C. R. V. (2005). Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus spp.* para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, 16(4), 403-411.
- SIGNOR, A., FEIDEN, A., BOSCOLO, W. R., SIGNOR, A. A., GONÇALVES, G. S., SARY, C.; KLEIN, S. (2013). Eventos reprodutivos do jundiá *Rhamdia voulezi* cultivados em tanques-rede. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 37(3), 272-277.
- SILVA, F.C.P.; BRITO, M.F.G.; FARIAS, L.M. (2005). Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *J. Fish Biol.*, 67, 1686-1698.
- SILVEIRA, J., SILVA, C.P., CARGNIN-FERREIRA, E., ALEXANDRE, D., ELIAS, M.A., FRACALOSSO, D.M. (2013). Freshwater catfish jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae are prepared to digest inert feed at the exogenous feeding onset: physiological and histological assessments. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39,1581-1590.
- SILVA, M. R. DA, NATALI, M. R. M. AND HAHN, N. S. (2012). Histology of the digestive tract of *Satanoperca pappaterra* (Osteichthyes, Cichlidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 34(3), 319-326.
- SRIVASTAVA, P. K. AND PANDEY, A.K. (2015). Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. *Biochemical Cellular Archives*, 15(1), 47-73.
- SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., SOLDI, V. (2006). Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente*, 7(2), 12-20.
- TANCREDO, K. R., GONÇALVES, E. L. T., BRUM, A., ACCHILE, M., HASHIMOTO, G. S. O., PEREIRA, S. A., MARTINS, M. L. (2015). Hemato-immunological and biochemical parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* immunized with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 689–694.
- TAPIA-PANIAGUA, S. T., VIDAL, S., LOBO, C., PRIETO-ÁLAMO, M. J., JURADO, J., CORDERO, H., MORIÑIGO, M. A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 209–221.

- TAPIA-PANIAGUA, S. T., CHABRILLÓN, M., DÍAZROSALES, P., BANDA, I. G., LOBO, C., BALEBONA, M. C., MORIÑIGO, M. A. (2010) Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60(2), 310–319.
- TELLI, G. S., RANZANI-PAIVA, M. J. T., DIAS, D. C., SUSSEL, F. R., ISHIKAWA, C. M., TACHIBANA, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology* 39, 305–311.
- VERSCHUERE, L., ROUMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655-671.
- VIEIRA, F. N. (2010). *Seleção e utilização de bactérias probióticas na piscicultura marinha*. Tese de Doutorado no Centro de Ciência Agrária da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- VÍLCHEZ, M.C., SANTANGELI, S., MARADONNA, F., GIOACCHINI, G., VERDENELLI, C., GALLEGRO, V., PEÑARANDA, D.S., TVEITEN, H., PÉREZ, L., CARNEVALI, O., ASTURIANO, J.F. (2015). Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. *Theriogenology*, 84(8), 1321–1331.
- WANG, M., LIU, G., LU, M., KE, X., LIU, Z., GAO, F., YU, D. (2016). 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.
- WEILER, K. A., PESSINI, J. E., SANCHEZ, M. S. S., RODRIGUES, M. L., BOSCOLO, W. R., PEZZATO, L. E., BITTENCOURT, F., SIGNOR, A. (2019). Sunflower meal with and without phytase supplementation in diets for silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 32, 285-297.
- WIDANARNI, TANBIYASKUR, R. (2015). Application of probiotic, prebiotic and synbiotic for the control of streptococcosis in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 18(2), 59-66.
- WILD, M.B., MARENGONI, N.G., VIVIAN, M.M.P.S., TSUTSUMI, C.Y., MOURA, M.C. DE, (2014). Probiótico dietético em sistemas de produção de tilápia do Nilo: efeitos sobre o crescimento, balanço de N e P, retenção de nutrientes e viabilidade econômica. *Semin. Ciências Agrárias* 35, 477.
- YAN, L., BOYD, K. G., AND GRANT BURGESS, J. (2002). Surface Attachment Induced Production of Antimicrobial Compounds by Marine Epiphytic Bacteria Using Modified Roller Bottle Cultivation. *Marine Biotechnology*, 4(4), 356–366.
- YANG, C.Y., LIU, Y-D. AND LI, D.H. (2007). Effects of microcystin-rr on the antioxidant system of *bacillus subtilis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(11b), 1435 – 1441.
- YANG, S., DU, J., DUAN, Y., XIAO, Q., LI, N., LIN, Q., DU, J. (2018). Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments. *BMC Microbiology*, 18(1), 1-12.

**Capítulo 3:****Probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) em dietas para jundiás (*Rhamdia quelen*) promovem melhoria em sua fisiologia reprodutiva**

Artigo elaborado e formatado conforme as normas das publicações científicas: Aquaculture research, Disponível em: <  
<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/13652109>>.

**Resumo**

Objetivou-se avaliar o efeito de aditivo probiótico em dietas sobre as variáveis reprodutivas de jundiá *Rhamdia quelen*. Foram utilizados 300 juvenis de jundiá com peso inicial médio de  $17,35 \pm 0,97$ g, alimentados durante 90 dias com dietas contendo níveis crescentes do aditivo probiótico (0,15; 0,30; 0,45 e; 0,60 g Kg<sup>-1</sup> de ração de *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* nas concentrações de  $4 \times 10^{11}$  UFC) e uma dieta controle ausente de *B. subtilis* e *B. cereus*. Nos machos, o aditivo probiótico influenciou no volume seminal relativo, sobrevivência dos espermatozoides, índices gonadossomático, hepatossomático e gordura viscerossomática, frequência de batimento transposto, velocidade de deslocamento, taxa de motilidade e retilinearidade. Nas fêmeas, o uso do probiótico influenciou na proporção de fêmeas desovantes, taxa de fertilização e gordura viscerossomática. O uso do probiótico influenciou no desenvolvimento das células germinativas, integridade hepática e características de desenvolvimento dos hepatócitos. Portanto, a inclusão de 0,60 g kg<sup>-1</sup> de probiótico em dietas melhora o desempenho reprodutivo dos jundiás.

**Palavras-chave:** espécie nativa, nutrição, bactérias gram-positivas, qualidade seminal, oócitos viáveis.

## Introdução

O benefício proporcionado pelas bactérias probióticas na absorção e síntese dos nutrientes está relacionado com a utilização mais eficiente da energia derivada da alimentação para o desenvolvimento dos animais (Carnevali, Avella & Gioacchini, 2013). Sua influência no processo reprodutivo ocorre, em especial, na interação com o metabolismo energético e com os sensores responsáveis pela regulação dos processos de disponibilidade, como os neuropeptídios do eixo hipófise-hipotálamo-gônadas e mediadores moleculares periféricos (Palermo et al., 2011; Carnevali, Maradonna & Gioacchini, 2016).

No desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas, o uso de probióticos melhora o desempenho reprodutivo e as respostas fisiológicas dos peixes adultos, especialmente na produção de hormônios sexuais, desenvolvimento dos testículos e ovários e na qualidade espermática, refletindo na fecundidade relativa e absoluta (Mehrim, Khalil & Hasssan, 2014).

O efeito benéfico do uso de *Bacillus* tem sido demonstrado para várias espécies, proporcionando melhor viabilidade e desenvolvimento de embriões, melhor crescimento, sobrevivência e redução da deformidade no lote (Ghosh, Sinha and Sahu, 2007). A excreção de substâncias pela atividade metabólica de *B. subtilis* age como promotor de moléculas antioxidantes que refletem na formação de gametas (Yang, Liu e Li, 2007).

A utilização probiótica em fêmeas adultas de zebrafish beneficiou a maturação dos oócitos e o número de folículos vitelogênicos e, conseqüentemente, seu processo de ovulação. O evento de maturação sexual ocorre pela modificação da expressão de neuropeptídios responsáveis pela produção de hormônios reguladores do processo reprodutivo (Carnevali, Avella and Gioacchini, 2013). Nos machos, o processo de espermatogênese com o uso de bactérias probióticas proporcionou a ação de gonadotrofinas exógenas, estimulação hormonal induzindo a atividade das células germinativas, favorecendo o início do processo de espermatogênese (Vílchez et al., 2015). O benefício do probiótico na prole reflete no desenvolvimento embrionário mais rápido, melhora na sobrevivência, incremento do desempenho produtivo (Lombardo et al., 2011; Gioacchini et al., 2011), modulação dos processos de autofagia, apoptose e dorsalização no desenvolvimento das fases iniciais (Miccoli et al., 2015).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) possui ampla distribuição geográfica na América Latina, podendo ser encontrada do sudoeste do México a região Sul da Argentina. No Brasil é nativa da região Sul do país (Freitas et al., 2011; Baldisserotto e Gomes, 2018). Por esta razão,

adaptou-se a variadas amplitudes térmicas, apresentando crescimento satisfatório mesmo em períodos frios (Fracalossi et al., 2004). É uma espécie de bagre que pertence a ordem dos Siluriformes, que possui característica de hábito alimentar onívoro com tendência a carnivoría, especialmente nas fases iniciais de vida (Rodrigues et al., 2012; Fracalossi e Cyrino, 2013). Devido as suas características reprodutivas, como maturação sexual precoce e desova parcelada, o processo de reprodução em cativeiro foi aprimorado (Montanha et al., 2011).

Estudos relacionados a nutrição de espécies nativas como o jundiá ainda são reduzidos quando comparados a quantidade de informações pertinentes a espécies comercialmente estabelecidas, contudo, subsídios relativos aos eventos reprodutivos, desenvolvimento larval e desempenho produtivo (Signor et al., 2013; Diemer et al., 2014) são necessários a fim de atender suas exigências nutricionais com a elaboração de dietas completas, consequentemente melhorando seu desempenho zootécnico e resistência a doenças (Radünz Neto e Borba, 2013). Neste sentido, objetivou-se avaliar os efeitos do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* e *B. cereus* em diferentes níveis de inclusão sobre as respostas reprodutivas de jundiá *R. quelen*.

### **Material e métodos**

Os procedimentos experimentais adotados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/Unioeste N° 40/17).

#### *Delineamento experimental*

Foram utilizados 300 juvenis de jundiá ( $17,35 \pm 0,97$ g), distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado contendo cinco tratamentos e quatro repetições ( $n = 20$ ). Os tratamentos foram compostos pela inclusão do aditivo probiótico nos níveis de 0,15; 0,30; 0,45 e 0,60 g de *Bacillus subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *Bacillus cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC g Kg<sup>-1</sup> de ração, e uma dieta controle (sem a inclusão do probiótico). Considerou-se como uma unidade experimental um tanque-rede com volume útil de 1,0 m<sup>3</sup> instalado em um tanque de alvenaria de 200 m<sup>2</sup> contendo 15 peixes cada, durante 90 dias de alimentação.

Ao longo do período experimental, as variáveis de qualidade da água mantiveram-se estáveis com média de oxigênio dissolvido de  $6,00 \pm 0,8$  mg. L<sup>-1</sup>, pH  $6,07 \pm 0,2$ , condutividade elétrica  $36,1 \pm 1,5$  µS.cm<sup>-1</sup> e temperatura de  $23,6 \pm 2,1$ °C, permanecendo dentro dos limites toleráveis para a criação da espécie (Souza et al., 2005).

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia às 8h00, 12h00, 14h00 e 17h00 até apresentarem saciedade aparente, com rações isoproteicas (29% de proteína digestível) e isoenergéticas (3250 kcal de energia digestível kg<sup>-1</sup> de ração) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Composição química calculada e análise centesimal da dieta base experimental para a inclusão de níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926) 4×10<sup>11</sup> UFC e *B. cereus* (CBMAI 988) 4×10<sup>11</sup> UFC para juvenis de jundiá *R. quelen*.

<b>Ingredientes (%)</b>	
Peixe, farinha	33,30
Milho, grão	18,89
Arroz, quireira	12,65
Farinha de vísceras de aves	12,55
Soja, farelo 45%	10,00
Trigo, farelo	8,00
Óleo de soja	3,00
Premix <sup>1</sup>	1,00
Sal comum	0,30
Cloreto de colina	0,10
Propionato de cálcio	0,30
Vitamina C	0,10
Hidróxitolueno butilato	0,02
Total	100
<b>Nutrientes (%)</b>	
Proteína Digestível <sup>2</sup>	29,09
Ácido linoleico	2,97
Amido	25,00
Arginina total	2,67
Cálcio	3,21
Energia digestível (kcal) <sup>2</sup>	3250
Fibra bruta	1,68
Fósforo total	1,45
Gordura	9,36
Lisina total	2,01
Metionina total	0,71
<b>Matéria natural (%)</b>	
Energia bruta (Kcal/g)	4340,00
Proteína Bruta	37,83
Gordura	8,13
Matéria mineral	3,96
<b>Probiotic Aditive (CFU)</b>	
<i>B. subtilis</i> and <i>B. cereus</i>	4×10 <sup>11</sup>

<sup>1</sup>Composição do premix: Níveis de garantia por quilograma do produto: vit. A - 500.000 UI; vit. D3 - 250.000 UI; vit. E - 5.000 mg; vit. K3 - 500 mg; vit. B1 - 1.500 mg; vit. B2 - 1.500 mg; vit. B6 - 1.500 mg; vit. B12 - 4.000 mg; ácido fólico - 500 mg; pantotenato de cálcio - 4.000 mg; vit. C - 10.000 mg; biotina - 10 mg; Inositol - 1.000; nicotinamida - 7.000; colina - 10.000 mg; Cobalto - 10 mg; Cobre - 1.000 mg; Ferro - 5.000 mg; Iodo - 200 mg; Manganês - 1500 mg; Selênio - 30 mg; Zinco - 9.000 mg. <sup>2</sup>Values of digestible energy and crude protein (%) estimated for *Rhamdia quelen* proposed by Reidel et al. (2010) and Freitas et al. (2011). <sup>3</sup>Total number of bacteria from experimental diets by Pharmacopeia 31/NF 26 (2008).

Para a confecção das rações os ingredientes foram moídos em triturador tipo martelo, pesados, homogeneizados manualmente e posteriormente extrusados (Ex-Micro<sup>®</sup>, Ribeirão Preto - São Paulo, Brasil). O aditivo probiótico utilizado apresentava-se em forma de pó liofilizado e foi adicionado as dietas após o processo de extrusão e resfriamento das mesmas. A adição do probiótico foi realizada por aspersão, agregando-se aos peletes com uso de óleo

vegetal, em seguida as dietas foram secas em estufa de circulação de ar forçada durante 24h à 25°C (Dias et al., 2012). Posteriormente permaneceram refrigeradas para avaliação bacteriológica e posterior utilização. Em todas as dietas experimentais foram realizadas análise de contagem dos *B. cereus* e *B. subtilis* UFC/g da ração (United States Pharmacopeia, 2008), confirmando a presença das bactérias probióticas em todas as dietas experimentais e dentro dos limites de aditivo nos níveis utilizados.

#### *Metodologia de coleta e avaliação de qualidade dos gametas*

Para as amostras sanguíneas três peixes de ambos os sexos foram coletados de cada unidade experimental, em seguida anestesiados em benzocaína 100 mg L<sup>-1</sup> (Gomes et al., 2001) e submetidos a colheita de sangue por punção do vaso sanguíneo caudal, com a utilização de seringas descartáveis contendo 10% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras do plasma foram obtidas por centrifugação a 2.500 rpm durante cinco minutos, posteriormente mantidas em botijão criogênico na temperatura de -190°C até a realização das análises. O nível de cálcio plasmático foi medido utilizando kit comercial e a leitura realizada em espectrofotômetro. Os níveis de testosterona e estradiol livre foram medidos através de radioimunoensaio de fase sólida utilizando-se kits comerciais e a leitura realizada em espectrofotômetro de ELISA.

Após o período experimental, sete fêmeas (153,75±20,36 g e 23,85±1,70 cm) e sete machos (137,00±28,76 g e 22,44±1,50 cm) de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente para reprodução, com base na visualização de características sexuais externas (Diemer et al., 2014).

Os peixes selecionados foram induzidos hormonalmente com Extrato Hipofisário de Carpa – EHC, as fêmeas receberam 0,5 mg de EHC.kg<sup>-1</sup> de peso vivo relativa à dose preparatória e, após 12 horas; 5,0 mg de EHC.kg<sup>-1</sup> de peso vivo. Os machos receberam dose única de 2,5 mg EHC.kg<sup>-1</sup> na região dorsal (intramuscular) no momento da segunda aplicação das fêmeas. Após 240 horas-grau da indução foi realizada a extrusão por meio de massagem abdominal no sentido céfalo-caudal para coleta dos gametas.

A avaliação do teor de energia bruta das gônadas foi determinada em bomba calorimétrica IKA® C2000 Basic. Além disso, foi quantificado o total de fêmeas aptas a desova de todos os tratamentos.

A fertilização foi realizada pelo método a seco (Zaniboni-filho e Weingartner, 2007) com a homogeneização dos ovócitos com o sêmen (pool dos mesmos tratamentos), em seguida o volume de 100 ml de ovos de cada fêmea foi transferido para incubadoras experimentais de

20 litros em sistema de recirculação de água com temperatura média de 26°C e mantidos até o momento da eclosão (Diemer et al., 2014; Rodrigues et al., 2017; Bittencourt et al., 2018).

Aproximadamente 12 horas após a fertilização, três amostras com 100 ovos de cada unidade experimental, e em triplicata, foram coletadas para estimar a taxa de fertilização ( $TF = \text{número de ovos viáveis} \times 100 / \text{número total de ovos}$ ), sendo considerados fertilizados somente os ovócitos que apresentaram aspecto translúcido (Okawara et al., 2015). A fecundidade relativa foi calculada ( $FR = \text{número de ovos liberados} \times \text{Peso total das fêmeas}$ ) segundo Godinho (2007).

As amostras de sêmen de cada peixe foram coletadas em tubo Falcon 10 mL para aferição do volume e mantidas em caixa de isopor com gelo  $12 \pm 0,5^\circ\text{C}$  até o término das análises. O pH foi aferido pelo método colorimétrico utilizando papel tornassol Merk® (Asturiano et al., 2001). A concentração espermática foi mensurada a partir da diluição de sêmen em formol salino-tamponado (1:1.000) e a contagem realizada por meio de câmara hematimétrica de Neubauer (Sanches et al. 2011). A normalidade dos espermatozoides foi avaliada pela fixação em formol salino tamponado (1:1.000 sêmen:fixador), posteriormente corados com rosa de bengala (Tessaro et al., 2012) e nas lâminas de extensão foram contados 300 espermatozoides de cada peixe, classificados em normais e anormais conforme Caneppele et al. (2015), sendo as análises realizadas em microscópio de luz em objetiva de 40x (CBRA, 1998). Foram mensurados o volume de sêmen liberado (ml) e o volume seminal relativo (sêmen liberado (ml) / peso do peixe (quilogramas)).

#### *Análise computadorizada dos espermatozoides*

As avaliações da motilidade espermática pelo método computadorizado foram realizadas conforme descrito por Wilson-Leedy & Ingermann (2007) e Sanches et al. (2013) utilizando-se softwares de código aberto. O processo de ativação para o sêmen fresco foi realizado em tubos tipo Eppendorf (1,5mL), utilizando-se 1 $\mu\text{L}$  de sêmen e 400 $\mu\text{L}$  de água destilada ( $25^\circ\text{C}$ ; 0,0mOsm.kg<sup>-1</sup>).

As imagens foram obtidas através da utilização de um microscópio trinocular (Solarist Bel) em objetiva de 10x acoplado a uma câmera Basler (modelo acA640-120uc), conectada ao computador (intel core i7® CPU 2,4 GHz, 8Gb de Ram), sistema operacional Microsoft Windows 8®. Os vídeos foram capturados pelo software Basler Pylon Câmera Software (baslerweb.com) a 100fps (658x492 pixels) em formato \*.avi, editados no software VIRTUALDUB-1.9.0 (virtualdub.org), e exportados como sequência de imagens em formato \*.jpg, para um diretório específico. As imagens correspondentes foram abertas, editadas no

IMAGEJ (National Institutes of Health, USA) e compiladas por meio do plugin CASA (University of California and Howard Hughes Medical Institute, USA).

O processamento dos vídeos foi realizado baseado na descrição dos componentes necessários para a utilização do aplicativo CASA por meio de software livre (Wilson-Leedy & Ingermann, 2006), entretanto, as configurações utilizadas foram adaptadas para espécie conforme Sanches et al. (2010).

Os parâmetros espermáticos obtidos foram: taxas de motilidade (MOT), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do deslocamento (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), oscilação (WOB), frequência de batimento transposto (BCF) e progressão (PROG). As análises foram realizadas durante um segundo (1s) de vídeo (100 imagens) em 10 e 20 segundos pós-ativação em três vídeos para cada macho, sendo sete machos para cada tratamento considerados como réplicas.

Após a coleta das amostras para avaliação reprodutiva, os peixes foram eutanasiados em solução de benzocaína ( $250 \text{ mg L}^{-1}$  de água), em seguida eviscerados para retirada dos testículos, fígado e gordura a fim de obter tecidos para avaliação histológica e cálculo dos índices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e de gordura viscerossomática (IGVS) (Índices: peso do órgão ou gordura/peso total do peixe X 100).

#### *Avaliação histológica das gônadas*

Na avaliação histológica os testículos foram fixados em ALFAC, posteriormente armazenados em álcool 70° até o processamento histológico. Após a fixação o material biológico, o mesmo foi desidratado em série crescente de álcoois, diafanizado em xilol, incluído e emblocado em parafina histológica. Os cortes histológicos foram obtidos em micrótomo (Micron 340E – Thermo Scientific) com  $5\mu\text{m}$  de espessura, em seguida foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (NIKON Eclipse-50).

Na análise histomorfométrica das gônadas foram capturadas imagens dos ovários para realizar as mensurações do diâmetro dos ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos. Nos machos foi realizada a mensuração do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio germinativo. A classificação foi realizada a fim de identificar o estágio de maturação gonadal de acordo com Vazzoler (1996).

#### *Avaliação histopatológica hepática*

A histomorfometria do fígado foi realizada determinando o número de hepatócitos por área ( $\mu\text{m}^2$ ), diâmetro do núcleo do hepatócito ( $\mu\text{m}$ ) e  $R_{pcn}$  (perímetro núcleo/citoplasma), segundo Rodrigues et al. (2017).

As alterações morfológicas foram avaliadas qualitativamente através do índice de lesão segundo Bernet et al. (1999), calculado a partir da fórmula: Bernet =  $\Sigma$  fator de importância (w) X escore ( $\alpha$ ), para isso, foram utilizados três fatores de importância (w): (1) lesão razoável; (2) lesão moderada; e (3) lesão irreversível, que leva à perda parcial ou total de órgãos. Cada alteração histopatológica foi avaliada por meio de escores ( $\alpha$ ) que variaram de 0 a 6; dependendo do grau de alteração, sendo (0) sem alteração; (2) baixa ocorrência; (4) ocorrência moderada; (6) lesão grave. Para determinar as lesões, uma tabela foi adaptada ao estudo, indicando as principais lesões histopatológicas encontradas (Tabela 2).

**Tabela 2-** Alterações hepáticas identificadas em jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

		Índices de Bernet	
		Alterações observadas no fígado	Fator de importância
Hepatócitos		IFL	2
		MM	1
		N	3
		CS	1
		LLC	2
		VC	1

IFL = inflamação dos leucócitos; MM = Melanomacrofago; N = Necrose; CS = Congestão de sinusóides; LLC = Perda do limite de células; VC = vacuolização citoplasmática.

### Análises estatísticas

Todos os dados quando atendendo os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, foram submetidos a análise de variância de um fator, one-way ANOVA, e posteriormente ao teste de comparação de médias de Duncan a 5% de significância.

## Resultados

### Variáveis reprodutivas dos machos

Os machos de jundiás alimentados com dietas contendo probiótico apresentaram maior volume relativo de sêmen e sobrevivência espermática ( $p < 0,05$ ) quando utilizados níveis de 0,45 e 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 3).

O índice gonadossomático foi maior ( $p < 0,05$ ) nos machos alimentados com 0,30 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  nas dietas, contudo, não diferiu dos demais níveis de inclusão do aditivo nas dietas. O índice hepatossomático foi maior ( $p < 0,05$ ) quando utilizado 0,45 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$ .

<sup>1</sup>. A gordura viscerossomática foi menor ( $p < 0,05$ ) quando utilizado 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  nas dietas dos peixes (Tabela 3).

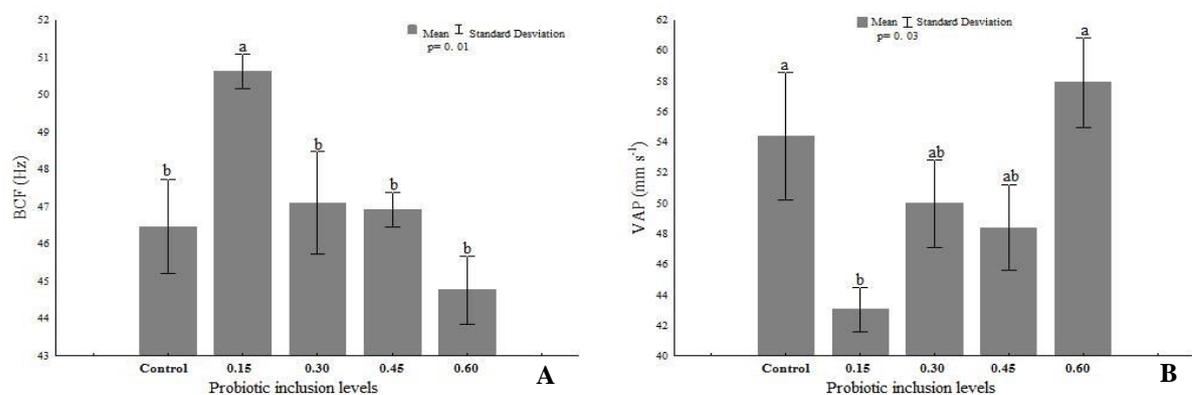
**Tabela 3.** Parâmetros reprodutivos de machos de *R. quelen* alimentadas com ração contendo diferentes níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

	Níveis de probiótico ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC/ $\text{Kg}^{-1}$ )					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
VSR ( $\text{mL Kg}^{-1}$ )	31,84 $\pm$ 6,13b	31,78 $\pm$ 4,84b	35,38 $\pm$ 7,02b	51,17 $\pm$ 7,45a	35,18 $\pm$ 3,12b	0,02
SOB (%)	93,66 $\pm$ 2,73bc	92,25 $\pm$ 2,21c	94,83 $\pm$ 1,47ab	95,20 $\pm$ 1,64ab	96,50 $\pm$ 1,64a	0,03
IGS (%)	3,53 $\pm$ 1,40c	5,48 $\pm$ 1,51ab	5,76 $\pm$ 1,71a	3,78 $\pm$ 2,00bc	5,33 $\pm$ 2,37ab	0,02
IHS (%)	1,50 $\pm$ 0,16b	1,25 $\pm$ 0,33b	1,47 $\pm$ 0,17b	2,29 $\pm$ 0,66a	1,58 $\pm$ 0,25b	0,01
IGVS (%)	2,57 $\pm$ 0,13b	3,20 $\pm$ 0,28a	2,26 $\pm$ 0,03c	2,97 $\pm$ 0,06a	1,91 $\pm$ 0,13d	0,00

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. VSR- Volume seminal relativo, SOB- Sobrevivência espermática, IGS- Índice gonadossomático, IHS- Índice hepatossomático, IGVS- Índice de gordura viscerossomática

O volume de sêmen liberado, a concentração e normalidade espermática, o pH seminal e os níveis de testosterona plasmático não foram influenciados ( $p > 0,05$ ) pelo uso do aditivo probiótico nas dietas dos jundiás, apresentando médias de  $4,93 \pm 2,15$  mL,  $1,30 \times 10^9 \pm 0,38 \times 10^9$  espermatozoide  $\text{mL}^{-1}$ ,  $92,55 \pm 2,12\%$ ,  $8,00 \pm 0,00$  e  $11,58 \pm 0,72$  ng  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

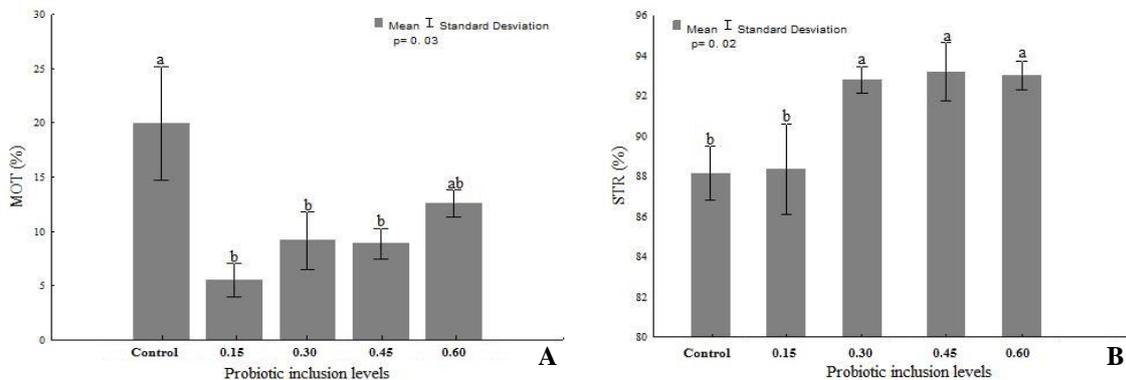
Os parâmetros espermáticos computadorizados avaliados em 10s apresentaram variações ( $p < 0,05$ ) para os machos alimentados com dietas contendo 0,15g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$ , apresentando maior frequência de batimento transposto (BCF) e a menor velocidade média de deslocamento dos espermatozoides dos peixes (Figura 1).



**Figura 1** - Parâmetros espermáticos de jundiás (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de probiótico. A- Frequência de batimento transposto (BCF), B- Velocidade média de deslocamento (VAP) 10s pós-ativação.

Ainda para 10s pós-ativação, as taxas de motilidade, velocidade curvilínea, velocidade em linha reta, retilinearidade, oscilação e progressão não foram influenciadas ( $p>0,05$ ) pelas dietas contendo os diferentes níveis de aditivo probiótico, apresentando médias de  $69,79\pm 10,95\%$ ,  $82,01\pm 10,53 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $43,80\pm 7,25 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $85,86\pm 2,79\%$ ,  $62,14\pm 5,47\%$  e  $1897,19\pm 317,36 \mu\text{m}$ , respectivamente.

Entretanto, para os parâmetros espermáticos computadorizados avaliados em 20s apresentaram variações ( $p<0,05$ ) para os machos alimentados com dietas contendo 0,15; 0,30; e 0,45 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  apresentaram menor motilidade espermática. As maiores retilinearidades ( $p<0,05$ ) foram observados machos alimentados com níveis de 0,30, 0,45 e 0,60 g  $\text{kg}^{-1}$  de probiótico (Figura 2).



**Figura 2** - Parâmetros espermáticos de jundiás (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de probiótico. A- Taxa de motilidade (MOT), B- Retilinearidade (STR) durante 20s.

A velocidade curvilínea, velocidade média de deslocamento, velocidade em linha reta, oscilação, progressão e frequência de batimento transposto dos espermatozoides aos 20 segundos não foram influenciados ( $p>0,05$ ) pelas dietas contendo os diferentes níveis de aditivo probiótico, apresentando médias de  $51,40\pm 5,09 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $25,67\pm 1,88 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $23,39\pm 2,03 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $50,35\pm 4,61\%$ ,  $983,94\pm 83,92 \mu\text{m}$  e  $56,80\pm 2,11 \text{Hz}$ , respectivamente.

#### Variáveis reprodutivas das fêmeas

As fêmeas de jundiás apresentaram maior proporção de desovas ( $p<0,05$ ) quando foram alimentadas com 0,15, 0,45 e 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  nas dietas. A gordura viscerossomática foi menor ( $p<0,05$ ) quando utilizado 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  nas dietas dos peixes, contudo, não diferiu das fêmeas alimentadas com dieta controle. As maiores taxas de fertilização ( $p<0,05$ ) foram encontradas nas fêmeas alimentadas com 0,30, 0,45 e 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  nas dietas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros reprodutivos de fêmeas de *R. quelen* alimentadas com ração contendo diferentes níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

	Níveis de probiótico ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC/Kg <sup>-1</sup> )					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
Fêmeas desovantes (%)	50,00±00c	90,00±00a	50,00±00c	80,00±00b	80,00±00b	0,00
Taxa de Fertilização (%)	79,81±2,20c	91,33±1,30b	98,80±0,74a	98,85±0,57a	98,25±0,34a	0,00
IGVS (%)	1,71±0,34b	1,95±0,58ab	2,38±0,51a	2,42±0,60a	1,75±0,38b	0,03

Médias seguidas de letras distintas indicam efeito significativo para cada nível de inclusão pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. IGVS- Índice de gordura viscerossomática

A taxa de fecundidade relativa, os níveis de cálcio e estradiol plasmáticos, os índices gonadossomático e hepatossomático e a energia das gônadas não foram influenciadas ( $p > 0,05$ ) pelo uso do probiótico nas dietas das fêmeas, apresentando médias de  $50,22 \pm 32,86\%$ ;  $6,00 \pm 0,57$  mg.dl<sup>-1</sup>;  $1477,20 \pm 66,12$  pg.ml<sup>-1</sup>;  $4,85 \pm 3,71\%$ ;  $2,18 \pm 0,59\%$ ; e  $5,35 \pm 0,40$  Kcal g<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### Histomorfometria das gônadas

A avaliação histomorfométrica das gônadas de machos e fêmeas indicou a influência do uso do aditivo probiótico no desenvolvimento das células germinativas.

**Tabela 5.** Histomorfometria gonadal em fêmeas de jundiá (*R. quelen*) alimentadas com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Fêmeas (µm)	% Níveis de probiótico ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC Kg <sup>-1</sup> )					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
DOPV	102,67±24,49	108,43±3,36	94,38±19,51	92,05±24,05	97,75±16,15	0,77
DOV	147,60±7,68a	138,10±6,95ab	126,75±14,40bc	120,80±4,20c	116,00±6,32c	0,00

Médias seguidas de letras minúsculas indicam efeito significativo para cada dieta experimental pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade. DOPV- Diâmetro do ovócito pré-vitelogênico; DOV- Diâmetro do ovócito vitelogênico;

Nos machos de jundiá não foi possível realizar a análise histomorfométrica das gônadas pois o epitélio germinativo apresentava-se descontínuo (seta) e lúmen dos túbulos dilatado totalmente preenchido pelos espermatozoides, característica de animais aptos a liberação dos espermatozoides em todos os tratamentos avaliados.

#### Histomorfometria e integridade hepática

A avaliação hepática pós reprodução dos jundiás apresentou menor número de hepatócitos ( $p < 0,05$ ) nos peixes alimentados com dietas contendo 0,45g de probiótico kg<sup>-1</sup>,

contudo, o diâmetro dos hepatócitos foi maior ( $p < 0,05$ ) quando utilizado 0,15 e 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  na dieta dos jundiás. A relação do perímetro do núcleo/citoplasma foi menor ( $p < 0,05$ ) em todos os níveis de inclusão do aditivo probiótico quando comparado aos peixes que receberam dieta controle (Tabela 6).

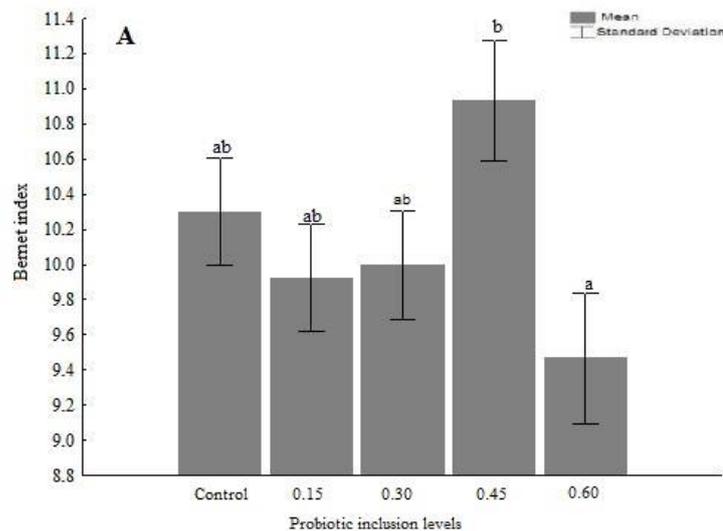
**Tabela 6-** Histomorfometria hepática de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.

Variáveis	% Níveis de probiótico ( <i>B. subtilis</i> e <i>B. cereus</i> $4 \times 10^{11}$ UFC/ $\text{Kg}^{-1}$ )					Valor do <i>p</i>
	Controle	0,15	0,30	0,45	0,60	
Número de hepatócitos ( $\mu\text{m}^2$ )	219,00 $\pm$ 83,81a	199,50 $\pm$ 50,51ab	177,00 $\pm$ 16,89ab	144,00 $\pm$ 27,64b	216,66 $\pm$ 63,32a	0,04
Diâmetro do hepatócito ( $\mu\text{m}$ )	3,64 $\pm$ 0,21ab	3,96 $\pm$ 0,30a	3,27 $\pm$ 0,36b	3,56 $\pm$ 0,25ab	3,96 $\pm$ 0,48a	0,07
<i>Rpcn</i>	85,61 $\pm$ 2,70a	69,10 $\pm$ 5,71c	71,25 $\pm$ 5,61c	66,50 $\pm$ 4,51c	77,68 $\pm$ 5,14b	0,00

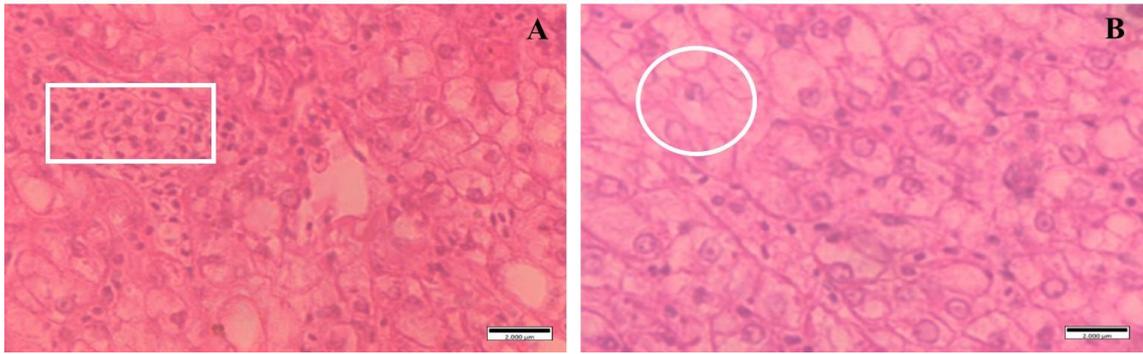
Médias seguidas de letras minúsculas indicam efeito significativo para cada dieta experimental pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade.

*Rpcn* = perímetro do núcleo/citoplasma.

O índice de Bernet indicou maior integridade do fígado nos jundiás alimentados com dietas contendo 0,60 g de probiótico  $\text{kg}^{-1}$  (Figura 3). O tecido apresentou lesões moderadas razoáveis, com maior proporção de perda do limite celular e congestão de sinusóides (Figura 4).



**Figura 3-** Índice de Bernet no fígado de juvenis de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC.



**Figura 4-** Histologia hepática de jundiá (*R. quelen*) alimentados com dietas contendo níveis do aditivo probiótico composto por *B. subtilis* (CBMAI 926)  $4 \times 10^{11}$  UFC e *B. cereus* (CBMAI 988)  $4 \times 10^{11}$  UFC. (HE, objetivo 40x). (A) congestão de sinusóides (quadrado) e (B) perda de limite celular (área circular).

## Discussão

### *Variáveis reprodutivas dos machos*

O processo de síntese e absorção dos nutrientes promovidos pelas bactérias probióticas, influencia na interação entre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e o sistema endocanabinóide, ambos envolvidos na modulação das respostas reprodutivas, adaptativas e de ingestão alimentar (Palermo et al., 2011).

O uso do aditivo probiótico nas dietas de jundiá proporcionou aumento no volume seminal relativo de espermatozoides. Durante o processo de espermatogênese, o uso de probiótico pode induzir a ação de gonadotrofinas exógenas, resultando no aumento em volume espermático (Vílchez et al., 2015).

O maior índice de sobrevivência dos espermatozoides oriundos de jundiás alimentados com dietas contendo aditivo probiótico provavelmente ocorreu devido a indução das bactérias na produção de poliaminas, como a espermina e espermidina (Gioacchini et al., 2011), que atuam favorecendo o crescimento celular, a modulação de sinais intracelulares, a regulação gênica e atividade antioxidante nas células espermáticas, consequentemente, proporcionando condições favoráveis aos espermatozoides potencializarem suas atividades.

O aumento do índice hepatossomático nos machos de jundiás alimentados com dietas contendo aditivo probiótico, pode estar relacionado ao estoque energético no fígado, com o aumento da atividade metabólica e utilização de nutrientes obtidos via alimentação, direcionado aos processos reprodutivos para a síntese e secreção de substâncias (Champe, Harvey and Ferrier, 2006), o que corrobora com os resultados observado neste estudo, com o aumento no tamanho e número de células hepáticas.

O aumento do índice gonadosomático nos machos de jundiá alimentados com probiótico está relacionado aos processos de maturação gonadal, estimulado pelas bactérias probióticas que beneficiam a saúde dos peixes pelo metabolismo dos nutrientes, resultando na manutenção dos órgãos (Gómez e Balcázar, 2008; Butt e Volkoff, 2019), beneficiando o processo de maturação das gônadas, que conseqüentemente apresentaram estágio de maturação mais avançado, relacionados ainda as modificações estruturais no período reprodutivo (Vazzoler, 1996).

A redução do índice de gordura visceral nos machos alimentados com dietas contendo probiótico relaciona-se ao fato do efeito da atividade proteolítica proporcionado pelas bactérias probióticas, aumentando a disponibilidade e a assimilação dos nutrientes das dietas (Nayak, 2010; Essa et al., 2010), melhorando a eficiência na utilização e degradação em especial dos ácidos graxos, pela potencialização da ação de enzimas digestivas, influenciando a assimilação dos lipídeos e direcionando-os para metabolismo de manutenção celular (Ray, Ghosh e Ringo, 2012), durante o processo de desenvolvimento reprodutivo dos peixes.

As bactérias probióticas promovem aumento nas expressões dos genes responsáveis pelo controle da síntese do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), desencadeando os processos reprodutivos a partir do aumento dos níveis de neuropeptídios e na regulação do nível hormonal (Gioacchini et al., 2014), acarretando ação na regulação da fertilidade dos animais.

A avaliação espermática computadorizada indicou mudanças na atividade dos espermatozoides dos peixes que foram alimentados com dietas contendo aditivo probiótico, onde nos 10 segundos iniciais, a frequência de batimento transposto e a velocidade média de deslocamento das células foram menos eficientes no nível de menor inclusão do probiótico, contudo, mais expressivo quando os peixes foram alimentados com dietas contendo maior concentração de probiótico.

A frequência de batimento transposto está diretamente relacionada a qualidade espermática, sendo que quanto menores seus valores, maiores são as velocidades de deslocamento dos espermatozoides (Sanches et al., 2013a).

A velocidade média de deslocamento das células está relacionada a viabilidade energética decorrente do metabolismo espermático e a capacidade dos espermatozoides em penetrar a zona pelúcida do oócito, indicando déficit na capacidade espermática e fertilização (Cosson, 2019) quando os machos foram alimentados com dietas contendo baixos níveis de probiótico.

Na avaliação do sêmen em 20 segundos, a taxa de motilidade e a retilinearidade não foram expressivas nos espermatozoides dos machos alimentados com dietas contendo aditivo

probiótico. Segundo Sanches et al. (2015), há uma correlação entre os parâmetros, onde quando a motilidade dos espermatozoides é alta, mais células com movimentos aleatórios ou circulares são observados, contudo quando a motilidade é baixa, ocorre a predominância de espermatozoides com movimentos retos. Contudo, a ocorrência de movimentos retos dos espermatozoides para algumas espécies pode ser característica intrínseca desejável para reprodução, participando conseqüentemente no sucesso da fertilização dos oócitos (Carneiro, 2007). Já para outras espécies, agem negativamente, ou seja, pioram os resultados das taxas de fertilização (Tuset et al., 2008). Apesar disso, sabe-se que as velocidades espermáticas influenciam nas taxas de fertilização em *Rhamdia quelen*, com melhores resultados para espermatozoides mais rápidos (Neumann et al., 2019).

As reduções das taxas de motilidade em 20 s pós-ativação verificada nos tratamentos contendo 0,15, 0,30 e 0,45 mg de probiótico kg<sup>-1</sup> na dieta sugerem menores tempo de movimentação para peixes que foram alimentados com estas rações, ou seja, os níveis aplicados pioraram a qualidade espermática, que foi igual apenas no tratamento contendo 0,60 g kg<sup>-1</sup>. Isso pode ser explicado pelo fato de maior exposição do sêmen as condições ambientais. O comportamento dos espermatozoides quando relacionado com o tempo e o ambiente, que influencia no gasto energético das células (Perchec et al., 1996) no logo após o procedimento de ativação do sêmen, ocorrendo uma continua redução da qualidade espermática, normalmente observada em peixes de água doce (Fauvel et al., 2010). Contudo, não influenciou o desempenho reprodutivo dos peixes, visto que as maiores taxas de fertilização ocorreram quando administradas baixas doses de probiótico.

#### *Variáveis reprodutiva das fêmeas*

O uso de probiótico pode promover melhoram o desempenho e as respostas fisiológicas reprodutivas dos peixes adultos, como observado no desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas de *O. niloticus*, especialmente na produção de hormônios sexuais, desenvolvimento dos testículos e ovários, na qualidade espermática, e conseqüentemente refletindo na fecundidade relativa e absoluta (Mehrim, Khalil & Hasssan, 2014).

O aumento no número de fêmeas desovantes alimentadas com dietas contendo probiótico demonstra a importante funcionalidade do aditivo nas dietas dos peixes. Visto que as bactérias benéficas melhoram a utilização nutricional dos alimentos, devido a produção de enzimas digestivas que contribuem eficientemente na absorção de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas (complexo B e ácido fólico), proporcionando melhor desempenho produtivo dos peixes (Irianto & Austin, 2003; Bolasina e Yamashita, 2006; Leblanc, 2011), portanto, o

direcionamento equilibrado dos nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos animais e sua prole possibilitou melhora na desova das fêmeas, fertilização e gordura visceral. Além disso, está diretamente relacionado ao metabolismo dos ácidos graxos, utilizando como fonte para os processos metabólicos, fornecendo assim energia para a atividade reprodutiva (Ray, Ghosh e Ringo, 2012).

A maior taxa de fertilização foi observada nas fêmeas alimentadas com dietas contendo aditivo probiótico, este índice considera relevante a contribuição nutricional das fêmeas e por consequência a qualidade do ovócito ser mais impactante quando comparada à qualidade seminal (Allaman et al., 2012). Entretanto, o efeito da viabilidade do sêmen também interfere nas taxas de fertilização e de eclosão (Weigensberg et al., 1998), pelo estado nutricional do animal e a habilidade das células produzidas em fertilizar ovos (Aas et al., 1991).

A capacidade fertilizante dos indivíduos foi beneficiada por processos fisiológicos e metabólicos resultantes das bactérias probióticas relacionando-se especialmente ao estado nutricional dos animais e a modificação da expressão de genes, afetando os eventos reprodutivos, e estes estão diretamente relacionados à disponibilidade energética para o desenvolvimento dos gametas de machos e fêmeas (Carnevali, Avella e Gioacchini, 2013).

A gordura visceral foi superior nas fêmeas de jundiás alimentadas com dietas contendo probiótico, visto que, normalmente as fêmeas mobilizam um maior teor de gordura para maturação das gônadas quando comparada aos machos. O que pode ter ocorrido nos animais alimentados com as dietas contendo maior concentração dos *Bacillus*.

Os probióticos apresentam grande capacidade para modular positivamente o metabolismo lipídico a partir de mecanismos neuroendócrinos responsáveis pelo desencadeamento entre a homeostase energética e fertilidade, representados por hormônios metabólicos e neuropeptídios que integram o centro hipotalâmico durante o processo de reprodutivos (Carnevali, Maradonna & Gioacchini, 2016).

#### *Histomorfometria das gônadas*

Neste estudo, fêmeas alimentadas com dietas contendo 0,60 g de probiótico kg<sup>-1</sup> apresentaram menor diâmetro oocitário, no entanto, as melhores respostas no número de desovas, na taxa de fertilização e na redução da gordura visceral. O desenvolvimento das gônadas foi estimulado pela eficiência das bactérias probióticas como um precursor energético, auxiliando no metabolismo da energia celular, aumentando a síntese de fosfolipídios da membrana oocitária e processos de geração de energia, favorecendo sua qualidade e viabilidade nas fases finais da maturação (Carnevali, Avella & Gioacchini, 2013).

O sucesso de fertilização em oócitos em espécies reofílicas ocorre em maior proporção em células com menores diâmetros, quando comparadas às fêmeas que apresentam oócitos maiores (Romagosa et al., 2001), fato que pode ser observado neste estudo.

Os machos de jundiá apresentaram o mesmo estágio de desenvolvimento das células espermáticas, independentemente da inclusão de probiótico na dieta, contudo, as variáveis espermáticas foram melhores nos peixes alimentados com dietas contendo probiótico, demonstrando a eficiência do aditivo no processo reprodutivo. As bactérias probióticas proporcionam a disponibilidade de moléculas que atuam como antioxidante e fonte energética que são interligadas durante a maturação gonadal para a manutenção da integridade estrutural e funcional das células germinativas (Yang, Liu e Li, 2007; Abasali e Mohamad, 2011; Mehrim, Khalil & Hasssan, 2015). A estimulação hormonal promovida, pode ter induzido a atividade das células de Leydig e de Sertoli, como consequência favorecendo o processo de espermatogênese (Vílchez et al., 2015).

#### *Histomorfometria e integridade hepática*

O aumento quantitativo dos hepatócitos nos jundiás alimentados com dieta contendo probiótico pode estar relacionado a ação hepatoprotetora promovida pelas bactérias a fim de reduzir processos de oxidação celular (Pereira e Gibson, 2002), contudo, pode ainda estar associado ao armazenamento de glicogênio como fonte de energia aos peixes, e consequentemente refletindo no número, tamanho e estrutura dos hepatócitos (Power et al., 2000). Ainda assim, diversos trabalhos ressaltam que esse tipo de aditivo nas rações promove maior assimilação dos nutrientes o que leva a um aumento da atividade hepática, como a síntese de colesterol hepático ou sua redistribuição do plasma para o fígado (Saad, 2006) como observado nos IHS e IGVS nos machos de jundiá alimentados com 0,45 g de probiótico kg<sup>-1</sup>.

As bactérias probióticas otimizam o uso das lipoproteínas via metabolismo, consequentemente melhoram a assimilação dos aminoácidos pelo hospedeiro (Nayak, 2010; Essa et al., 2010), fato relevante para os peixes durante o processo reprodutivo, com o direcionamento energético para a viabilidade e o desenvolvimento dos gametas.

A histopatologia hepática nos jundiás alimentados com dietas contendo 0,60 g de probiótico kg<sup>-1</sup> identificou efeito benéfico do uso do aditivo pois ocorreu a redução de danos no tecido, contudo, pode ser observadas alterações como a perda do limite celular e a congestão de sinusoides podem ser observadas nos peixes. A renovação celular dos hepatócitos ocorre com a função regenerativa do tecido, promovendo a manutenção do órgão necessária para a homeostase (Jesus, Waitzberg e Campos 2000).

Por fim, os aditivos probióticos parecem ter papel relevante no metabolismo dos organismos aquáticos quando exigidos para a perpetuação da espécie e fornecimento contínuo de sementes para o incremento produtivo. Embora os estudos voltados a nutrição de reprodutores e matrizes de peixe sejam fundamentais, as informações presentes até o momento são reduzidas e, às vezes, incoerentes o que dificulta em demasia para a elaboração de rações específicas que atendam esse gargalo produtivo.

### **Conclusão**

O uso de 0,60 g de probiótico kg<sup>-1</sup> em dietas para jundiás estimula o desenvolvimento reprodutivo dos jundiás.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Data availability statement**

We are pleased to inform that our experimental data are available for any request or doubt.

### **Acknowledgements**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors would like to thank Imeve S.A. for donating the evaluated product.

### **ORCID**

Mariana Lins Rodrigues <https://orcid.org/0000-0003-4957-9626>

### **Referências**

- Aas, G. H., Refstle, T., GJERDE, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95, 125-132.
- Abasali, H. And Mohamad, S. (2010). Effect of dietary supplementation with probiotic on reproductive performance of female livebearing ornamental fish, *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2, 11-15.
- Allaman, I. B., Freitas, R. T. F, Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Oliveira, G. R., Reis-Neto, R. V. (2012). Efeito materno e paterno sobre as taxas de fertilização e eclosão em curimba (*Prochilodus lineatus*). *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 1584-1590.

- Baldisserotto, B. and Gomes, L. C. (2018). *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. 2<sup>a</sup> ed. Santa Maria: UFSM, 608 p.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, 25-34.
- Bittencourt, F., Damasceno, D. Z., Lui, T. A., Signor, A., Sanches, E.A., Neu, D. H. (2018). Water quality and survival rate of *Rhamdia quelen* fry subjected to simulated transport at different stock densities and temperatures. *Acta scientiarum. Animal sciences*, 40, 1-8.
- Butt, R. L. and Volkoff, H. (2019). Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 1-12.
- Caneppele, D., Sanches, E. A., Romagosa, E. (2015). Spermproduction of *Steidachneridion parahybae* (Steindachner 1877) and the effect of hormonal induction throughout one reproductive cycle. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 54-61.
- Carneiro, P. C. F. (2007).Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 361-366.
- Carnevali, O., Avella, M. A., Gioacchini, G. (2013). Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 188, 297–302.
- Carnevali, O., Maradonna, F., Gioacchini, G. (2016). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, 472, 144-155.
- CARNEVALI, O., MARADONNA, F., Gioacchini, G. (2016). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, 472, 144–155.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. (1998). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA. 49p.
- Champe, P. C., Harvey, R. A., Ferrier, D. R. (2006). *Bioquímica ilustrada*. 3<sup>a</sup> edição, editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 544p.
- Cosson, J. (2019). Fish sperm physiology: structure, factors regulating motility, and motility evaluation. *Biological Research in Aquatic Science*, 1, 1-26.
- Dias, D. C., Leonardo, A. F. G., Tachibana, L., Correa, C. F., Bordon, I. C. A. C., Romagosa, E., Ranzani-Paiva, M. J. T. (2012). Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 40-45.
- Diemer, O., Bittencourt, F., Barcelos, L.G., Boscolo, W.R., Feiden, A., Romagosa, E. (2014). Lysine in the diet of *Rhamdia voulezi* male broodstocks confined in net cages. *Aquaculture*, 434, 93-99.
- Essa, M. A., EL-Serafy, S. S., El-Ezabi, M. M., Daboor, S. M., Esmael, N. A., Lall, S. P. (2010). Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile *Tilapia*, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the arabian aquaculture*, 5, 143-162.
- Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 636–643.
- Fracalossi, D. M. and Cyrino, J. E. P. (2013). *Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aqüicultura brasileira* (375p.). Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática/AQUABIO, Florianópolis, Santa Catarina, BR.
- Fracalossi, D. M., Meyer, G., Santamaria, F. M., Weingartner, M., Zaniboni-Filho, E. (2004). Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do Dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum*, 26, 345-352.
- Freitas, J. M. A., Sary, C., Luchesi, J. D., Feiden, A., Boscolo, W. R. (2011). Proteína e energia na dieta de jundiás criados em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 2628- 2633.
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C. (2007). Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526.

- Gioacchini, G., Giorgini, E., Vaccari, L. E., Carnevali, O. (2014). Can Probiotics Affect Reproductive Processes of Aquatic Animals? *Aquaculture Nutrition*, 328–346.
- Gioacchini, G., Lombardo, F., Merrifield, D. L., Silvi, S., Cresci, A., Avella, M. A., Carnevali, O. (2011). Effects of Probiotic on Zebrafish Reproduction. *Journal of Aquaculture Research & Development*, s1, 1-6.
- Godinho, H. P. (2007). Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 351-360.
- Gomes, L. C., Chippari-Gomes, A. R., Lopes, N. P., Roubach, R., Araújo-Lima, C. A. R. M. (2001). Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32, 426-431.
- Gómez, G. D., and Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52, 145–154.
- Irianto, A., Austin, B., (2003). Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 26, 59–62.
- Jesus, G. F. A., Vieira, F. D. N., Silva, B. C., Junior, M. M. D. S., Ushizima, T. T., Schmidt, E. C., Bouzou, Z. L., Pereira, S. A., Pereira, G. V., Martins, M. L., Mouriño, J. L. P. (2016). Probiotic bacteria may prevent haemorrhagic septicaemia by maturing intestinal host defences in Brazilian native surubins. *Aquaculture Nutrition*, 23, 484–491.
- Leblanc, J. G., Laiño, J. E., Del-Valle, M. J., Vannini, V., Van-Sinderen, D., Taranto, M. P., De Valdez G. F., De Giori, G. S., Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1297–1309.
- Lombardo, F., Gioacchini, G., Carnevali, O. (2011). Probiotic-Based Nutritional Effects on Killifish Reproduction. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2011, 1-11.
- MEHRIM, A. I., KHALIL, F. F. AND HASSAN, M. E. (2014). Hydroyeast Aquaculture® as a reproductive enhancer agent for the adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(2), 371–381.
- Mehrim, A. I., Khalil, F. F., Hassan, M. E. (2014). Hydroyeast Aquaculture® as a reproductive enhancer agent for the adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 371–381.
- Miccoli, A., Gioacchini, G., Maradonna, F., Benato, F., Skobo, T., Carnevali, O. (2015). Beneficial bacteria affect *Danio rerio* development by the modulation of maternal factors involved in autophagic, apoptotic and dorsalizing processes. *Cellular Physiology Biochemistry*, 35, 1706-1718.
- Montanha, F. P., Nagashima, J. C., Kirnew, M. D., Astrauskas, J. P., Pimpao, C. T. (2011). Características Fisiológicas e Reprodutivas do *Rhamdia quelen*. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 1, 1-8.
- Myers, R. H. (1990). *Classical and modern regression with applications*, Duxbury Press, Belmont.
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 2-14.
- Neumann, G., Sanches, P. V., Bombardelli, R. A., (2019). Effects on fertility of motile sperm to egg ratio with use of cryopreserved *Rhamdia quelen* sêmen at diferente post-activation times. *Animal Reproduction Science*, 201, 84-92.
- Okawara, R. Y., Sanches, E. A., Caneppele, D., Damasceno, D. Z., Romagosa, E. (2015). Ovulation and initial rearing of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) larvae from different accumulated thermal units. *Ichthyological Research*, 62, 495-503.
- Palermo, F. A., Mosconi, G., Avella, M. A., Carnevali, O., Verdenelli, M. C., CECCHINI, C., Polzonetti-Magni, A. M. (2011). Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1A,

- proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. *General and Comparative Endocrinology*, 171, 293–300.
- Perchec, G., Cosson, M., Cosson, J., Jeulin, C., Billard, R. (1996). Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. *Cell motility cytoskeleton*, 35, 113–20.
- Pereira, D. I. A. and Gibson, G. R. (2002). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 259-281.
- Power, D. M., Melo, J., Santos, C. R. A. (2000). The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology*, 56, 374–387.
- Quinn, G. P. and Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*, Cambridge University Press.
- Radunz-Neto, J., BORBA, M. R. (2013). Exigências nutricionais e alimentação do jundiá, in: Fracalossi, D. M., Cyrino, J. E. P. NUTRIAQUA: *Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1ª edição 24 ampliada, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 375 p.
- Ray, A. K., Ghosh, K., Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465–492.
- Reidel, A., Boscolo, W.R., Feiden, A., Romagosa, E. (2010). The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. *Aquaculture*, 298, 354-359.
- Rodrigues, A. P. P., Gominho-Rosa, M. D. C, Cargim-Ferreira, E., Francisco, A. Fracalossi, D. D. (2012). Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Ramdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 18, 65-72.
- Rodrigues, M. L., Sanches, M. S. S., Damasceno, D. Z., Bittencourt, F., Reidel, A., Barrero, N. M. L., Signor, A. (2017). Reproductive performance of silver catfish fed sorghum diets supplemented with phytase. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 52, 623-632.
- Rodrigues, R. A., Saturnino, K. C., Fernandes, C. E. (2017). Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming. *Aquaculture Research*, 48, 5083–5093.
- Romagosa, E., Narahara, M. Y., Borella, M. I., Fenerich-Verani, N., (2001). Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27, 113-121.
- Saad, S.M.I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 1-16.
- Sanches, E. A., Bombardelli, R. A., Marcos, R. M., Neumann, G., De Toledo, C. P. R., Romagosa, E. (2010) Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software. *Aquaculture Research*, 42, 153-156.
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Okawara, R. Y., Caneppele, D., Bombardelli, R. A., Romagosa, E. (2013a) Sperm motility parameters for *Steindachneridion parahybae* based on open-source software. *Journal of Applied Ichthyology*, 29, 1114-1122.
- Sanches, E. A., Neumann, G., De Toledo, C. P. R., Bombardelli, R. A., Piana, P. A., Romagosa, E. (2013b) Temperature and storage period over spermatogenic parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research*, 44, 534-541.
- Sanches, E. A., Okawara, R. Y., Caneppele, D., De Toledo, C. P. R., Bombardelli, R. A., Romagosa, E. (2015). Sperm characteristics of *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) throughout 112h of storage at four temperatures. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 79-88.

- Sanches, E. A., Neumann, G., De Toledo, C. P. R., Bombardelli, R. A., Piana, P. A., Romagosa, E. (2011). Temperature and storage period over spermatid parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research*, 44, 534–541.
- Sanches, E.A., Neumann, G., De Toledo, C.P.R., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E. (2011). Temperature and storage period over spermatid parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research*, 44, 534-541.
- Signor, A., Feiden, A., Boscolo, W. R., Signor, A. A., Gonçalves, G. S., Sary, C., Klein, S. (2013). Eventos reprodutivos do jundiá *Rhamdia voulezi* cultivados em tanques-rede. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37, 272-277.
- Souza, L. S., Pouey, J. L. O. F., Camargo, S. O., Dos Vaz, B. S. (2005). Crescimento e sobrevivência do catfish de canal (*Ictalurus punctatus*) e silver catfish (*Rhamdia sp*) no outono-inverno do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, 35, 891–896.
- Tessaro, L., Toledo, C. P. R., Neumann, G., Krause, R. A., Meurer, F., Natali, M. R. M., Bombardelli, R. A. (2012). Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture*, 326, 74-80.
- Tuset, V. M., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Słowińska, M., DE Monserrat, J., Ciereszko, A. (2008). Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 393–397.
- Tuset, V., Dietrich, G., Wojtczak, M., Stowńska, M., Monserrat, J., Ciereszko, A. (2008). Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 393–7.
- United States Pharmacopeial Convention, (2008). *Revision (pharmacopeia)*, USP 31, NF 26 - 31st; 26th (National formulary).
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Imunologia; Maringá: Ed. Eduem. 169p.
- Vílchez, M. C., Santangeli, S., Maradonna, F., Gioacchini, G., Verdenelli, C., Gallego, V., Peñaranda, D. S., Tveiten, H., Pérez, L., Carnevali, O., Asturiano, J. F. (2015). Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. *Theriogenology*, 84, 1321–1331.
- Vílchez, M. C., Santangeli, S., Maradonna, F., Gioacchini, G., Verdenelli, C., Gallego, V., Peñaranda, D. S., Tveiten, H., Pérez, L., Carnevali, O., Asturiano, J. F. (2015). Effect of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the expression of genes involved in European eel spermatogenesis. *Theriogenology*, 84, 1321–1331.
- Weigensberg, I., Carrière, Y., Roff, D.A. (1998). Effects of male genetic contribution and paternal investment to egg and hatchling size in the cricket, *Gryllus firmus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 135-146.
- Wilson-Leedy, J.G and Ingermann, R. L. (2006). *Manual for CASA plugin for Image J*.
- Wilson-Leedy, J.G. and Ingermann, R. L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67, 661-672.
- YANG, C.Y., LIU, Y-D. AND LI, D.H. (2007). Effects of microcystin-rr on the antioxidant system of *bacillus subtilis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16, 1435 – 1441.
- Yang, C.Y., Liu, Y-D., Li, D.H. (2007). Effects of microcystin-rr on the antioxidant system of *bacillus subtilis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16, 1435 – 1441.
- Zaniboni-Filho, E. and Weingartner, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 367-373.

### **Conclusão da tese**

O uso de probiótico contendo *B. cereus* e *B. subtilis* na concentração de  $4 \times 10^{11}$  UFC em dietas para jundiás (*R. quelen*) no nível de inclusão de 0,60 g Kg<sup>-1</sup> de ração beneficia processos fisiológicos, e conseqüentemente desencadeiam o crescimento ótimo e desenvolvimento reprodutivo dos peixes.

Atualmente a literatura relacionada ao uso de probióticos na alimentação de espécies nativas é restrita, entretanto, a incessante busca por aditivos naturais e eficazes para uma aquicultura mais sustentável, aliado ao crescimento da piscicultura de espécies nativas do Brasil, pode tornar possível uma maior visibilidade para a linha de aditivos probióticos.

### **Considerações finais**

- A escolha das bactérias probióticas deve levar em consideração: a microbiota que está presente em todo ambiente, não ter potencial toxicogênico e beneficiar o hospedeiro.
- A utilização de aditivos probióticos apesar de aumentar o custo de produção, reflete em múltiplos efeitos aos animais e ao ambiente, contribui para a sustentabilidade do sistema de produção.
- A dosagem inadequada e uso esporádico do aditivo probiótico podem ser insuficientes para melhorar a imunidade, fisiologia, crescimento e resistência a doenças nos peixes. Além disso, o uso contínuo do aditivo garante a estabilidade e manutenção da microflora no hospedeiro.
- A adição do probiótico nas dietas devem ser realizadas em períodos pré-estabelecido e de forma contínua. Se possível, deve ser realizada análise de contagem de células nas dietas para confirmar se realmente as bactérias estão presentes e em quantidade adequada.
- A conservação da ração com aditivo e fatores como a temperatura e o tempo de armazenamento influenciam no desempenho das bactérias e a viabilidade das bactérias.
- A utilização do aditivo probiótico beneficia a saúde dos animais, contudo, as boas práticas de manipulação e manejo devem ser empregadas a fim de elevar ao máximo a desempenho do produto.
- O crescimento ótimo das bactérias probióticas deve estar na faixa de temperatura semelhante à do ambiente, visto que os peixes são pecilotérmicos, fato este, que pode reduzir o crescimento das bactérias.
- Avaliações de enzimas digestivas, expressão gênica, histologia muscular, hematologia e desafio bacteriano podem ser realizados em futuros estudos com *Bacillus* para jundiás, auxiliando na descoberta das repostas fisiológicas dos animais quando alimentados com dietas contendo probióticos.