

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PROBIÓTICO (*BACILLUS SUBTILIS*), PREBIÓTICO
(INULINA) E SIMBIÓTICO (*BACILLUS SUBTILIS* +
INULINA), EM DIETA DE LARVAS E JUVENIS DE
*CACHARA PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM***

Acadêmica: Fúlvica Cristina Oliveira

AQUIDAUANA – MS
AGOSTO/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PROBIÓTICO (*BACILLUS SUBTILIS*), PREBIÓTICO
(INULINA) E SIMBIÓTICO (*BACILLUS SUBTILIS* +
INULINA), NA DIETA DE LARVAS E JUVENIS DE
*CACHARA PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM***

Acadêmica: Fúlvia Cristina Oliveira
Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Meldau de Campos Amaral

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Zootecnia,
área de concentração em Produção Animal
no Cerrado-Pantanal, da Universidade
Estadual de Mato Grosso do Sul, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Zootecnia.

AQUIDAUANA – MS
AGOSTO/2017

FICHA CATALOGRÁFICA

COPIA DA ATA DE DEFESA

**“É IMPOSSÍVEL PROGREDIR SEM MUDANÇA,
E AQUELES QUE NÃO MUDAM SUAS MENTES
NÃO PODEM MUDAR NADA.”**

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, minha mãe Orília Rodrigues, minha irmã Franciele Oliveira e meu cunhado Leonardo Haas, por me apoiarem nas minhas escolhas e por sempre me ajudarem no que fosse preciso. Vocês são tudo pra mim S2.

A minha orientadora Dr^a Cristiane Meldau pelos ensinamentos, orientações, paciência, confiança e amizade, que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

À UEMS (Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul) e a FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia Estado de Mato Grosso do Sul) pela concessão da bolsa.

Aos colegas de Laboratório de Sanidade de Peixes: Cleujosí Nunes, Michelly Soares, Evelyn Lopes, Leonardo Augusto, Pamela Veiga, Rubia Mara, Tatiane Rodrigues, Wesley Souza, João Vitor Menezes, José Menezes, Beatriz Nogueira, Anuzhia Moreira, Jéssica Julian, Ronny Araújo, Uesley de Paula e aos funcionários na piscicultura da UEMS Sr. Juarez e Douglas, agradeço por serem companheiros, pelo auxílio e ajuda nos experimentos e coletas, sem vocês não seria possível finalizar este trabalho, muito obrigada pela colaboração.

Ao senhor Yassuo Kassai e o Rodrigo Kassai da piscicultura Pirai por terem cedido o local, animais e os materiais para realização do experimento do capítulo 2.

A empresa UniQuímica pela doação do probiótico *Bacillus subtilis* Casporini e a empresa Nuscience Nutrientes do Brasil pela doação do prebiótico inulina.

Ao prof. Carlos Eurico Fernandes, Técnico Cláudio e ao doutorando Robson Rodrigues do Laboratório de Histologia da UFMS/Campo Grande pela ajuda e ensinamentos para realização das lâminas histológicas.

Agradeço a prof. Dra. Elisabeth Urbinati por ter me recebido em seu Laboratório, a técnica Damares pelo auxílio na análise de lisozima e suas ajudantes pela realização da análise de cortisol.

Ao prof. Henrique Fernandes e a aluna Edneia (Neia) do Laboratório de Ruminantes e ao Técnico Gustavo do Laboratório de Química da UEMS pela ajuda e orientação para realização da análise bromatológica das dietas experimentais.

Ao Professor André Ferraz por todo ensinamento, incentivo, amizade e por todas as conversas que tivemos, pois sempre aprendi alguma coisa nelas.

Aos funcionários da UEMS, principalmente ao Cícero, Eraldo, Renato, Alan e Roseli, obrigada pela ajuda durante os experimentos, pelo carinho e amizade, agradeço muito a disposição e por me ajudarem sempre que precisei.

Aos professores das disciplinas cursadas durante a pós-graduação e que muito contribuíram para o enriquecimento da minha formação acadêmica e profissional.

À banca examinadora da qualificação e da defesa pesquisador Dr. Luiz Inoue, Dra. Elis Regina, Dr. Robson Rodrigues e a Dra. Claucia Horonato obrigada pelas contribuições e correções que certamente agregaram muito essa dissertação.

Agradeço as minhas amigas fiéis que me trouxeram pra cá e tornaram minha estada melhor, Michelly, Arianna, Mayara e Ana Maria.

Ao meu namorado Thiago Ximenes pelo companherismo, carinho, amor e por todo apoio e atenção desses últimos meses de tanta correria. Obrigada por tornar os meus dias melhores meu amor.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram de forma direta ou indireta durante esse período do mestrado.

E a Deus por me guiar por esses caminhos, me protegendo e me orientando.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Espécie de estudo: <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	3
2.2. Artêmia.....	4
2.3. Imunoestimulantes.....	6
2.4. Probiótico e Prebiótico.....	8
2.5. Estresse e Sistema Imune.....	11
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

CAPÍTULO 2 - ENRIQUECIMENTO DE NÁUPLIOS DE ARTÊMIA COM BACILLUS SUBTILIS, INULINA E SIMBIÓTICO PARA LARVAS DE CACHARA PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM.

RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
Local do experimento e obtenção das larvas de cachara.....	32
Delineamento experimental e alimentação.....	33
Enriquecimento da Artêmia	33
Desempenho zootécnico.....	34

Histomorfometria intestinal.....	35
Qualidade da água.....	36
Análise estatística.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPITULO 3- SUPLEMENTAÇÃO DE JUVENIS DE CACHARA (PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM) COM PROBIÓTICO (BACILLUS SUBTILLIS), PREBIÓTICO (INULINA) E SIMBIÓTICO	
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Animais experimentais.....	58
2.2. Delineamento experimental.....	58
2.3. Dietas experimentais	60
2.4. Preparação da bactéria Aeromonas hydrophila e infecção experimental.....	62
2.5. Desempenho zootécnico.....	62
2.6. Colheita sanguínea.....	63
2.7. Análises fisiológicas.....	63
2.8. Análise imunológica.....	63
2.9. Análises hematológicas.....	64
2.10. Análise histomorfométrica.....	65
2.11. Análise estatística.....	66
2.12. Qualidade da água.....	67
3.RESULTADOS.....	67
4.DISSCUSSÃO.....	78
5.CONCLUSÃO.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	97
NORMAS DAS REVISTAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Esquema representativo da administração de alguns aditivos por meio da bioencapsulação da *Artemia*. 6

Figura 2. Esquema das respostas do sistema imune inato adaptativo..... 14

Capítulo 2

Figura 1. Fotomicrografia da mucosa intestinal de larva de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*. Variáveis da histomorfometria intestinal: altura total do vilo (1); altura do vilo (2), largura (3), espessura do epitélio (4); camada muscular (5); células caliciformes (6)..... 36

Capítulo 3

Figura 1. Fotomicrografia da mucosa intestinal de *Pseudoplatystoma reticulatum*. Variáveis da histomorfometria intestinal: altura total do vilo (1); altura do vilo (2), camada muscular (3); largura (4); espessura do epitélio (5) e células caliciformes (6)..... 66

Figura 2. Desdobramento da interação para cortisol de cachara suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico e grupo controle durante 60 dias e desafiados. Letras minúsculas indicam diferenças ($P < 0.05$) entre os tratamentos em cada tempo e letras maiúsculas indicam diferenças ($P < 0.05$) de cada tratamento em cada tempo pelo teste de Tukey..... 69

Figura 3. Glicose em cacharas suplementados com *Bacillus subtilis*, inulina, simbiótico durante 32 dias..... 70

Figura 4. Glicose em cacharas suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$)..... 70

Figura 5. Valores médios de atividade respiratória de leucócitos em cacharas suplementados com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico e grupo controle durante 32 dias.....	71
Figura 6. Desdobramento da interação (tratamento x tempo) para atividade respiratória dos leucócitos de cacharas suplementados com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras indicam diferenças ($P<0,05$) de cada tratamento em cada tempo.....	72
Figura 7. Desdobramento da interação para a hemoglobina de cacharas suplementados com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras minúsculas indicam diferenças ($P<0.05$) de cada tratamento em cada tempo pelo teste de Tukey.....	74
Figura 8. Contagem de neutrófilos de juvenis de cachara <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> no tratamento e no tempo após suplementação com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico e grupo controle durante 60 dias após 0, 3 e 6 do desafio bacteriano por <i>Aeromonas hydrophila</i> . Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$).....	75
Figura 9. Contagem de linfócitos de juvenis de cachara <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> no tratamento e no tempo após suplementação com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico e grupo controle durante 60 dias após 0, 3 e 6 do desafio bacteriano por <i>Aeromonas hydrophila</i> . Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$).....	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Variáveis físicas e químicas da qualidade da água para todos os tratamentos (média $\pm$ DP).....	37
Tabela 2 Desempenho zootécnico de larvas de cacharas alimentadas com artêmia enriquecida com <i>B. subtilis</i> , inulina e simbiótico (média e $\pm$ DP).....	38
Tabela 3. Histomofometria intestinal de larva de cacharas suplementados com artêmia enriquecida com <i>B.subtilis</i> , inulina e simbiótico (média $\pm$ DP).....	42

Capítulo 3

Tabela 1. Níveis de garantia da ração Douramix – Revolution Alevino, segundo o fabricante.....	61
Tabela 2. Composição bromatológica das dietas experimentais.....	61
Tabela 3. Composição microbiológica das dietas experimentais.....	62
Tabela 4. Desempenho zootécnico de cacharas alimentados com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico e um grupo controle durante 60 dias (médias $\pm$ DP).....	68
Tabela 5. Valores de hematologia de cacharas após 32 dias de suplementação com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico (média $\pm$ DP).....	73
Tabela 6. Variáveis de hematologia de cacharas no tratamento e no tempo após suplementação com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados (média).....	74
Tabela 7. Contagem diferencial dos leucócitos de cacharas suplementados com <i>B. subtilis</i> , inulina, simbiótico durante 32 dias (média $\pm$ DP).....	75
Tabela 8. Histomofometria intestinal de cacharas suplementados com <i>B. subtilis</i> , inulina e simbiótico (média $\pm$ DP).....	77

RESUMO

O crescimento acentuado da aquicultura está relacionado principalmente ao sistema intensivo de criação, entretanto, a intensificação implica em aumento de tecnologia e prevenção a enfermidades, uma vez que muitas delas podem causar grandes perdas em pisciculturas inviabilizando a produção. Associado a isso, os produtores fazem uso indiscriminado ou inadequado de antibióticos. Esse panorama na piscicultura vem demandando pesquisas com imunostimulantes no sentido de melhorar a saúde dos peixes e diminuir o uso de antibiótico. Para avaliar a eficiência da suplementação com probiótico (*Bacillus subtilis*), prebiótico (inulina) e a combinação dos produtos na alimentação de larvas e juvenis de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* foram realizados dois experimentos. O primeiro é o enriquecimento do alimento vivo (artêmia) de larvas de cachara com os aditivos supracitados. O segundo experimento adicionou os mesmos aditivos na ração ofertada na alimentação de juvenis de cachara. A dissertação está dividida em 3 capítulos. No capítulo 1 é apresentada uma revisão de literatura pertinente ao assunto. O capítulo 2 apresenta um artigo, que teve como objetivo avaliar o enriquecimento de *Artemia salina* com probiótico (7g/dia), prebiótico (7g/dia) e simbiótico ofertadas na dieta de larvas de *Pseudoplatystoma reticulatum* sobre o desempenho zootécnico, sobrevivência e histomorfometria intestinal. O delineamento foi inteiramente casualizado (quatro tratamentos / três repetições), as larvas foram distribuídas em 12 incubadoras na densidade de 35 larvas/L, alimentadas 12 vezes ao dia, sendo a artêmia enriquecida ofertada 6 vezes ao dia. Larvas alimentadas com náuplios enriquecidos com inulina apresentaram taxa de sobrevivência significativamente maior que os outros tratamentos. Para a histomorfometria intestinal as larvas alimentadas com artêmia enriquecida com *B. subtilis* e não enriquecida (controle), foram estatisticamente melhores para as variáveis altura total e altura dos vilos. A camada muscular foi melhor nos tratamentos inulina e controle. O enriquecimento de náuplios de artêmia não melhorou o desempenho zootécnico de larvas de cachara. O capítulo 3 apresenta o segundo artigo que teve como objetivo avaliar o probiótico, prebiótico e simbiótico nos juvenis de cachara durante até 60 dias sobre desempenho, histomorfometria intestinal e microbiota intestinal, respostas

fisiológicas, imunológicas e hematológicas após desafio por *Aeromonas hydrophila*. O delineamento foi inteiramente casualizado (quatro tratamentos / cinco repetições), cada caixa d'água com 14 exemplares, totalizando 280 juvenis de cachara. Os tratamentos consistiram na suplementação da ração comercial: tratamento 1 sem aditivos (controle), tratamento 2 probiótico *B. subtilis* (20g/kg), tratamento 3 prebiótico inulina (5g/kg); tratamento 4 simbiótico, *B. subtilis* (20g/kg) + inulina (5g/kg), durante 60 dias. Aos 32 dias, foram avaliados desempenho zootécnico, análises fisiológica, imunológicas e hematológicas e histomorfometria intestinal e não foram observadas diferenças ($P > 0.05$) para essas variáveis. Para histomorfometria, o grupo simbiótico apresentou diferença significativa para células caliciformes, sendo encontradas em menor número. Aos 60 dias, os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 x 3 (4 tratamentos x 3 tempos de coletas). Não houve diferença significativa para os dados de desempenho zootécnico. Após o desafio observamos que a atividade respiratória dos leucócitos no tratamento inulina após 3 e 6 horas e o tratamento simbiótico no tempo de 6 horas apresentou redução significativa da atividade respiratória dos leucócitos. Para hemoglobina o tratamento inulina manteve as concentrações estáveis sendo diferentes dos outros tratamentos após 6 horas do desafio. O cortisol plasmático aumentou em todos os tratamentos após o desafio, porém o tratamento controle foi significativamente diferente dos tratamentos inulina e *B. subtilis*. Consequentemente o cortisol inibiu o número de linfócitos, o qual diminuiu após o desafio. Em conclusão a suplementação com *Bacillus subtilis*, inulina e simbióticos na dieta de juvenis não melhora o desempenho zootécnico, histomorfometria intestinal, respostas fisiológicas, imunológicas e hematológicas.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, atividade respiratória dos leucócitos, cortisol, imunoestimulantes, peixe carnívoro.

ABSTRACT

The accentuated growth of aquaculture is mainly related to the intensive system of creation. However, intensification implies increased technology and disease prevention since many of them can cause large losses in pisciculture making production unviable. Associated with this, producers make indiscriminate or inappropriate use of antibiotics. This panorama in pisciculture has demanded research with immunostimulants in order to improve fish health and decrease the use of antibiotics. For evaluate the efficiency of supplementation with probiotic (*Bacillus subtilis*), prebiotic (inulin) and the combination of the products in the feeding of larvae and juveniles of *Pseudoplatystoma reticulatum* two experiments were carried out. The first one being the enrichment of the live food (artemia) with the mentioned additives, offered in the feeding of cachara larvae. The second experiment used the same additives, but included in the feed, In the feeding of juvenile cachara. The dissertation is divided into 3 chapters. Chapter 1 presents a review of a relevant literature review. The objective of this study was to evaluate the enrichment of *Artemia salina* with probiotic (7g / day), prebiotic (7g / day) and symbiotic, offered in the diet of larvae of *Pseudoplatystoma reticulatum* on zootechnical performance, survival and histomorphometry intestinal. The design was completely randomized (four treatments / three replicates), the larvae were distributed in 12 incubators with density of 35 larvae / L, fed 12 times a day, where enriched arsenic was provided 6 times a day. Larvae fed nauplii enriched with inulin presented a significantly higher survival rate than the other treatments. For intestinal histomorphometry, the larvae fed with arsenic enriched with *B. subtilis* and not enriched (blank control), were statistically better for the variables total height and height of the villi. Muscle layer, as another parameter, performed better under inulin and control treatments. The enrichment of *Artemia* nauplii did not improve the zootechnical performance of cachara larvae. Chapter 3 presents the second article that had as objective to evaluate the Probiotic, prebiotic and symbiotic in juvenile cachara for 32 and 60 days On performance, intestinal histomorphometry and intestinal microbiota, physiological, immunological and hematological responses after challenge by *Aeromonas hydrophila*. The design was completely randomized with 4 treatments and 5 replicates, each tank with

14 specimens totalizing 280 juveniles of cachara. The treatments consisted of commercial feed supplementation: treatment 1: no additives (control), treatment 2: probiotic *B. subtilis* (20g / kg), treatment 3: prebiotic inulin (5g / kg); Symbiotic treatment, *B. subtilis* (20g / kg) + inulin (5g / kg) for 60 days. At 32 days were observed zootechnical performance, physiological, immunological and hematological analyzes and no differences were observed ($P > 0.05$) for these variables. Respective to intestinal histomorphometry the symbiotic group presented a significant difference in the variable goblet cells, being found in a smaller number. At 60 days, the data were analyzed in a completely randomized design in factorial 4 x 3 (4 treatments x 3 collection times). There was no significant difference for the zootechnical performance data. After the challenge we observed that the respiratory activity of the leukocytes in the inulin treatment after 3 and 6 hours and the symbiotic treatment in the time of 6 hours presented a significant reduction in the respiratory activity of leukocytes. For hemoglobin the inulin treatment maintained stable concentrations being different from the other treatments after 6 hours of challenge. The plasma cortisol increased in all treatments after challenge, but the control treatment was significantly different from the inulin and *B. subtilis* treatments. Consequently cortisol inhibited the number of lymphocyte cells that decreased after challenge. In conclusion, supplementation with *Bacillus subtilis*, inulin and symbiotics in the diet of juveniles does not improve zootechnical performance, intestinal histomorphometry, physiological, immunological and hematological responses.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; cortisol; immunostimulants, leukocyte; respiratory activity, carnivore fish.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de aquicultura do continente americano e na última década a taxa média de crescimento foi de 9 % ao ano (OECD/FAO, 2016). A criação de peixes tem ganhado papel social relevante, tanto na aquicultura profissional ou de subsistência. O sucesso dessa produção vem de boas práticas de manejo, boa qualidade de água, dieta equilibrada e de qualidade. No entanto, se essas boas práticas não forem adotadas, principalmente nos sistemas intensivos de produção que trabalham com altas taxas de densidade, podem trazer problemas e prejuízos relacionados à saúde dos peixes, que podem causar grandes perdas inviabilizando a produção (SANTOS, 2009; KUBITZA et al., 2013; GASTALHO et al., 2014).

O crescimento e intensificação da produção na aquicultura gerou um aumento do uso de antibióticos utilizados para tratamento de doenças e também o seu uso indiscriminado. Essa postura tem sido criticada na aquicultura, pois os antibióticos contaminam o meio ambiente, causam repercussões diretas na saúde do animal, resistência bacteriana e imunossupressão (RIJKERS et al., 1980; GASTALHO et al., 2014).

Como uma saída para a diminuição do uso de antibióticos, nos últimos anos tem-se intensificado o número de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de alimentos funcionais, ou seja, que fornecem a nutrição básica e promovem o aumento da eficiência alimentar, taxa de crescimento e melhora da saúde de peixes (OLIVEIRA et al., 2002).

Segundo Gonçalves (2009), esses alimentos incorporados na dieta alimentar de peixes, primam por melhorar a digestão e a nutrição, proporcionar o consumo de nutrientes essenciais e produzir substâncias que impedem a proliferação de agentes oportunistas e estimulam o sistema imunológico. Dentre os imunostimulantes como, ácidos orgânicos, enzimas, extratos vegetais e fitoterápicos, destacam-se os prebióticos, probióticos e simbióticos (OLIVEIRA et al., 2002; GATESOUBE, 2008; RODRIGUES et al., 2015).

Os probióticos são células microbianas específicas que entram no trato gastrointestinal e são capazes de manter-se vivas, reforçando a saúde dos animais e auxiliam na recomposição da microbiota intestinal (GATESOUBE, 1999). O gênero *Bacillus* se destaca entre os probióticos utilizados na aquicultura. São bactérias saprófitas, aeróbicas, gram-positivas, em forma de bastão e produzem endósporos resistentes ao calor, podem ser encontradas no solo, água, poeira e ar (MELLO, 2012). Quando incorporados na dieta podem alterar a morfologia e histologia das vilosidades intestinais, refletindo na melhoria da absorção de nutrientes, desempenho e saúde do animal (SCHWARZ et al., 2011).

Os prebióticos atuam indiretamente sobre o sistema imune e enzimático, estimulando o crescimento das populações de bactérias benéficas, que têm a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulatórias e interage com o sistema imune em vários níveis, incluindo a produção de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrofágica, a eliminação e a indução de síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas (SILVA & NORNBERG, 2003).

Os fructanos são os prebióticos largamente usados, os únicos que permitem serem avaliados com alimento funcional. Ocorrem naturalmente nos alimentos ou podem ser produzidas como, frutooligossacarídeos sintéticos, ou por processos enzimáticos ou hidrolíticos, dando origem a fructanos de diversos tamanhos de cadeias, um exemplo de fructanos é a inulina (FLICKINGER et al., 2003; ROBERFROID, 1998). Na produção industrial os fructanos do tipo inulina são obtidos apenas de uma espécie de planta (chicória, *Cichorium intybus*), após a extração, a inulina e os oligossacarídeos são processados e purificados para serem usados como alimento funcional (ROBERFROID, 1993; ROBERFROID, 2000).

O uso desses aditivos na aquicultura, em muitos casos, é dificultado pelo manejo dos alimentos e sua preparação que acarreta na diminuição do potencial da bactéria, no período de armazenamento e dissolução das partículas na água durante a alimentação. Como alternativa, o uso de simbiótico, combinação de probióticos e prebióticos, em um mesmo alimento (COLLINS & GIBSON, 1999), tem sido estudado para superar estes problemas, visto também que a ação dos dois possibilita maior sobrevivência das bactérias

probióticas no meio gástrico (CAPRILES et al., 2005; MERRIFIELD et al., 2010).

O maior desejo do produtor é ter peixes de boa qualidade com crescimento rápido e boa conversão alimentar, porém, é importante que os animais tenham um manejo apropriado, alimentação balanceada e que os fatores ambientais sejam mantidos dentro de níveis ideais (OBA, 2009). A falta de conhecimento sobre as necessidades nutricionais resulta em manejo alimentar inadequado durante a larvicultura, reduzindo as taxas de crescimento e sobrevivência (FERREIRA et al., 2009).

Contudo, considerando a dificuldade que se tem durante a larvicultura e que a produção de juvenil é a medida final do sucesso, estudos sobre a utilização de imunoestimulantes é importante para gerar informações sobre seus efeitos positivos e melhoria dos índices zootécnicos e da saúde dos peixes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espécie de estudo: *Pseudoplatystoma reticulatum*

O cachara pertence ao gênero *Pseudoplatystoma* que engloba peixes da família Pimelodidae e ordem Siluriformes, conhecidos como surubins ou peixes de couro, cuja principal característica externa é o corpo revestido por uma pele espessa, ausente de escamas (BRITSKI et al., 1988). Esses peixes são encontrados nas principais bacias hidrográficas da América do Sul. (ROMAGOSA, et al., 2003). As principais espécies que representam esse gênero são *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim, pintado), *Pseudoplatystoma fasciatum* (cachara, restrito à região das Guianas), *Pseudoplatystoma reticulatum* (originário do *P. fasciatum* dos rios Paraná e Amazonas) e *Pseudoplatystoma tigrinum* (caparari, pirambucu). (BUITRAGO-SOÁREZ & BURR, 2007).

As características morfológicas das espécies deste gênero compreendem o corpo fusiforme, cabeça grande e deprimida, mandíbula mais curta que a maxila superior, dentes viliformes (TAVARES, 1977). O cachara possui características morfológicas próprias com faixas transversais

perpendiculares ao corpo, separadas entre si, e a cor do dorso é cinza e ventralmente branca (BRITSKI et al., 1988). Essas espécies apresentam hábito alimentar noturno e estritamente piscívoro (RESENDE, 1996).

Os surubins são de grande importância ecológica pelo fato de serem um dos maiores peixes predadores da bacia do Paraná e da bacia do São Francisco, além de serem muito abundantes em ambas. São peixes apreciados em quase todo território nacional, sua carne é de excelente qualidade e esportividade para pesca, considerado um dos mais nobres e de alto valor comercial no Brasil. Sua carne de coloração clara, sabor suave e ausências de espinhos em seu filé são fatores de destaque no mercado consumidor (INOUE, 2009). Estas características atendem as preferências atuais e futuras do mercado de pescado (BALDISSEROTO & GOMES, 2010).

A produção de surubins vem crescendo no Brasil devido suas características zootécnicas desejáveis, como rápido crescimento e eficiente conversão alimentar podendo alcançar 1,5 kg em 12 meses com conversão alimentar entre 1,7 e 2,5. Os principais fatores que limitam uma maior expansão da produção de surubins são a reprodução, larvicultura e alevinagem, que interferem no elevado preço e na oferta restrita do produto (INOUE, 2009).

Segundo Machado et al. (1998), a reprodução induzida de surubins já é realizada com sucesso, mas ainda existem dificuldades na alimentação inicial das larvas, especialmente nas primeiras fases da vida. As larvas de surubim necessitam ser criadas em laboratório e tanques tipo raceway até que se tornem alevinos. Embora sejam empregadas técnicas, a sobrevivência média de juvenis prontos para a comercialização é de aproximadamente 30 a 40% (INOUE et al., 2002).

Devido seu pequeno, tamanho, o uso de alimentos naturais e rações comerciais fica limitado, podendo as larvas passarem de predadores para presa (CREPALDI et al., 2006). De acordo com Luz e Zaniboni (2001), o canibalismo é um dos entraves para espécies brasileiras e está relacionada com a densidade de estocagem e alimentação.

Organismos vivos são essenciais no desenvolvimento inicial estimulando a ingestão de alimento, melhorando o crescimento e a sobrevivência das larvas (FEIDEN et al., 2005).

2.2 Artêmia

A artêmia é um pequeno crustáceo de habitat aquático marinho, lagos ou lagoas salobras, que se encontra distribuída por todo o mundo e é considerado um filtrador seletivo (SORGELOOS et al., 2001). É o melhor alimento vivo disponível para larvas de peixes e camarões com alto valor nutricional (LAVENS & SORGELOOS, 1996).

O ciclo da artêmia começa a partir de um cisto, que contém um embrião com o metabolismo suspenso. Os cistos são resistentes e se conservado em local fresco e seco podem sobreviver por mais de cinco anos. Na natureza, quando existem variações de temperatura ou de salinidade da água os cistos se hidratam e entram no primeiro estágio de crescimento, conhecidos como náuplios (larvas), passando para o estágio adulto em apenas oito dias, podendo viver por meses (LAVENS & SORGELOOS, 1996; LIM et al., 2002)

O náuplio possui maior reserva endógena de energia, por isso é considerado mais eficiente no fornecimento de energia. Sua característica filtradora não seletiva permite que seu tubo digestório seja enriquecido ou bioencapsulado aumentando o valor nutricional da artêmia (COUTTEAU & SORGELOOS, 1997; SORGELOOS et al., 2001).

Existem dois métodos de enriquecimento da artêmia, o direto e o indireto. No método, direto o aditivo pode ser fornecido para os organismos sob a forma de emulsão, homogeneizada com água. No método indireto, os organismos são alimentados, geralmente com levedura, que foram cultivadas em meio contendo o aditivo (WATANABE, 1988). Na literatura existem trabalhos de enriquecimento de artêmia com diferentes aditivos, como: ácidos graxos (ARAUJO, 2007; HAN, 2000 e RIVERA, 2009); aminoácidos (HOSHIBA, 2007) e imunoestimulantes como prebiótico e probiótico (DIAS, 2011; DANIELS, 2013; e TOURAKI, 2012).

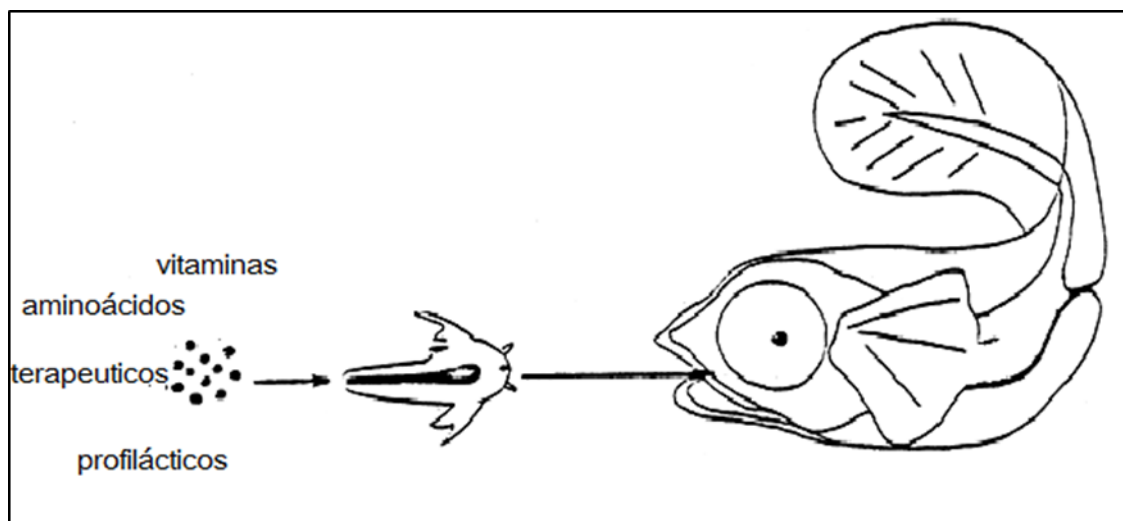


Figura 1. Esquema representativo da administração de alguns aditivos através da bioencapsulação da *Artemia*.

Fonte: LEGER et al. (1986b)

2.3 Imunoestimulante

Um dos problemas encontrados na aquicultura é a perda de animais associados a doenças. Chevassus e Dorson (1990) descreveram tentativas para abordar este problema, mas estas práticas podem ter consequências indesejáveis, como a profilaxia sanitária que é difícil de alcançar devido à presença de outras espécies de peixe ou invertebrados na água. Buscando alternativa para melhorar a resistência e a saúde dos peixes, os antibióticos muitas vezes utilizados na aquicultura disseminam resistência a patógenos bacterianos, contaminam o meio ambiente e trazem impactos na saúde pública (GASTALHO, 2014). A vacinação é altamente eficaz em alguns casos, mas é trabalhosa, demorada e cara e podem elevar a resistência de agentes infecciosos (ROBERTSEN, 1994; CASTRO 1999; GANNAM, 1999). Uma abordagem alternativa seria o uso de imunoestimulantes.

Os imunoestimulantes podem ser usados na alimentação como uma medida profilática, combatendo os microrganismos oportunistas que causam doenças em peixes (BILLER, 2008). Anderson (1992) definiu imunoestimulante como uma substância química, estressor ou ação que ativa os mecanismos de defesa não específicos e respostas específicas. Segundo Sakay (1999), os

imunoestimulantes podem ser agentes químicos, derivados de bactérias, extratos vegetais, nutrientes, hormônios, entre outros.

Os modos de ação de alguns imunoestimulantes podem ser eficazes contra infecções bacterianas, infecções virais e infestações por parasitas (BRICKNELL & DALMO, 2005). Além disso, proporcionam melhoria no desempenho dos peixes, saúde e no bem-estar animal (PAULSEN et al., 2001), atuando sobre o sistema imunológico e as células de defesa (RAA et al., 1992), e melhorando o ambiente aquático (CEROZI, 2012).

O sistema imunológico dos peixes é menos desenvolvido e compreendido se comparado a outros vertebrados. Os mecanismos de defesa dos peixes são conhecidos como sistema imune inato ou não específico e adaptativo ou específico (MAGNADOTTIR, 2006). O sistema não específico é a primeira barreira de defesa contra invasores, atuando contra padrões moleculares de microrganismos. No sistema específico para aumentar a produção de anticorpos há necessidade de contato, podendo promover a memória imunológica (SUNYER; LAMBRIS, 1998).

O sistema específico proporciona especificidade antigênica nas respostas imunológicas e a não específica atua sem especificidade aumentando a resposta imunológica de antígenos ou estimulando componentes do sistema imunitário (GANGULY, 2010). No meio ambiente que vivem, os peixes estão diretamente em contato com bactérias, fungos, parasitas e outros patógenos que podem comprometer a saúde dos animais (MAGNADOTTIR, 2006).

Os diferentes aditivos incorporados na dieta alimentar de peixes primam por melhorar a digestão e a nutrição por proporcionar o consumo de nutrientes essenciais e produzir substâncias que inibem o crescimento de patógenos oportunistas (GONÇALVES, 2009). Dentre estes alimentos imunoestimulantes utilizados na aquicultura destacam-se os prebióticos, probióticos e simbióticos (OLIVEIRA et al., 2002; GATESOUBE, 2008).

Na busca de melhorar a saúde e resistência dos peixes frente a contaminações causadas por patógenos invasores, os imunoestimulantes como probiótico e prebióticos estão sendo altamente estudados.

2.4 Probiótico e prebiótico

Os probióticos são suplementos alimentares a base de microrganismos vivos, que trazem benefícios ao hospedeiro, promovendo equilíbrio de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). FAO (2001) definiu probiótico como um microrganismo vivo que, conferem efeito benéfico a saúde do hospedeiro quando administrado em quantidade correta. Os principais mecanismos de ação para seleção de um probiótico são: (I) exclusão competitiva frente a microrganismos patogênicos; (II) fonte de nutrição e enzimas; (III) influência na qualidade da água; (IV) melhoria da resposta imune; (V) efeitos antivirais; (VI) grau de colonização (BALCÁZAR et al, 2006).

Cavalheiro et al. (2014) classificaram os aditivos incorporados na dieta animal em cinco tipos (tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos). Os probióticos e prebióticos são do tipo zootécnicos consideradas substâncias que melhoram o desempenho dos animais tendo função funcional, digestiva e equilibradora da biota.

Os probióticos também podem ser utilizados na larvicultura para controle de patógenos, podendo ser de três maneiras diferentes: (1) por meio do alimento vivo / dieta inerte; (2) adicionando as bactérias benéficas à água de crultivo; ou (3) adicionado naturalmente (RINGO & BIRKBECK, 1999).

A dosagem de probióticos tem que estar apropriada, pois as cepas podem não estar disponíveis para o hospedeiro por apresentarem formas diferentes e muitas cepas bacterianas não sobrevivem ao processo de confecção do alimento (ANTONY & PHILIP, 2008). As bactérias gram-positivas pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam a capacidade de esporular, permitindo que se mantenham viáveis durante um maior período no trato gastrointestinal (HUANG et al., 2008). Na aquicultura, as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são as mais utilizadas como probióticos (TIMMERMAN, 2004).

Os probióticos estão sendo testados em várias áreas da produção animal. Silva et al. (2011) avaliaram frangos alimentados com inulina e probióticos e obtiveram um melhor ganho em peso nos animais que receberam probiótico e simbiótico. Em ruminantes o uso de probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* melhorou o desempenho zootécnico

(AGARWAL et al., 2002). Os resultados de Alexopoulos (2004) suplementando a dieta de suínos com *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, obtiveram aumento na sobrevivência de leitões desmamados e melhora na qualidade da carcaça na fase de engorda. O uso de probiótico também foi testado em outros organismos aquáticos como: caranguejos (MAEDA et al., 1992) e bivalves (DOUILLET & LANGDON, 1994).

Bagheri et al. (2008) concluíram que a suplementação com 3.8×10^9 CFU g⁻¹ de *Bacillus* aumenta a sobrevivência, crescimento, e conversão alimentar de juvenis de truta arco-íris. Nayak et al. (2007) mostraram que juvenis de carpas alimentadas com *B. subtilis* a 10^8 CFU g⁻¹ apresentam melhora no sistema imune. Saénz de Rodriguez et al., (2009) observaram mudanças estruturais na mucosa e no perfil microbiológico do intestino de juvenis de linguado suplementados com probiótico *Alteromonadaceae*. Carvalho (2011) verificou que após suplementação com *Bacillus subtilis* e MOS houve aumento das vilosidades intestinais de alevinos de tilápias.

Diferente dos probióticos, os prebióticos são ingredientes não digeríveis (oligossacarídeos) que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando o crescimento ou a atividade de uma ou mais bactérias benéficas do sistema digestório, melhorando a saúde do animal (BUTOLO, 2002). A estimulação seletiva ocorre porque os oligossacarídeos são facilmente fermentados por bactérias benéficas

Os prebióticos atuam indiretamente sobre os sistemas imune e enzimático, e estimula o crescimento de bactérias benéficas, aquelas que têm a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulatórias e que interage com o sistema imune (SILVA & NORNBERG, 2003).

As principais fontes de prebióticos são alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, peptídeos, proteínas, álcoois de açúcares e os oligossacarídeos (DIONIZIO et al., 2002). Os principais prebióticos oligossacarídeos em estudo na aquicultura são os mananoligossacarídeos (MOS), fructooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e a inulina, esses agem fornecendo carboidratos as bactérias benéficas do intestino, que fermentam estes nutrientes retirando energia pra o seu desenvolvimento (SAAD, 2006).

A inulina é um carboidrato do tipo frutano vastamente encontrada na natureza em algumas plantas, bactérias e fungos, mas na produção industrial

ela é extraída a partir da raiz da chicória (ROBERFROID, 1993; FRANCK, 2002). É comercializada na forma de pó branco com alta pureza, sem odor e de sabor neutros. Podem apresentar pequenas quantidades de alguns minerais e sais, mas não contém glúten, gordura, proteína e ácido fólico e é solúvel em água (FRANCK, 2002).

A inclusão na dieta de pequenas quantidades de prebióticos, como o polissacarídeo inulina, pode estimular o crescimento de bactérias benéficas, como as ácido lácticas (MACFARLANE et al., 2006). Um dos efeitos nutricionais mais conhecidos da inulina e da oligofrutose é a sua capacidade para modificar a composição da microbiota intestinal (por exemplo, com o aumento do número de bifidobactérias) e a sua atividade metabólica no intestino grosso (ROBERFROID et al, 1998). Alguns estudos comprovaram essas mudanças após o uso de prebióticos (MAHIOUS et al., 2006, DIMITROGLOU et al., 2010; RAMIREZ, 2011).

Quando ocorre a fermentação de frutanos tipo inulina há produção de ácidos carboxílicos de cadeia curta e ácido láctico, que servem como nutrientes e energia para o crescimento das bactérias benéficas, reduzindo os valores de pH dificultando a compartição dos patógenos (ROBERFROID, 1999 & GILSON, 2007).

Os simbióticos referem-se a uma aplicação combinada de probiótico e prebiótico, em um mesmo alimento (COLLINS & GIBSON, 1999), baseada no princípio de oferecer uma vantagem competitiva (uma fonte de energia fermentável), melhorando a sobrevivência e a colonização de microrganismos probióticos no trato gastrointestinal promovendo a saúde do hospedeiro (MERRIFIELD et al., 2010).

O uso de probiótico na aquicultura, em muitos casos, é dificultado por causa da diminuição da viabilidade da bactéria durante a granulação, o tempo armazenado e lixiviação da partícula na água durante a alimentação, assim como os problemas relacionados ao manejo dos alimentos e sua preparação (MERRIFIELD et al.2010). Como alternativa, o uso de prebiótico associado à probiótico (simbiótico) têm sido avaliado para superar estes problemas (MERRIFIELD et al.2010). Estudos sobre aplicações do uso de probiótico, prebiótico e simbiótico, especialmente para espécies com

aceitabilidade comercial é de grande relevância para produzir peixes de melhor qualidade.

2.5 Estresse e Sistema Imune

Os peixes no ambiente de criação enfrentam situações que vão além da sua capacidade de tolerância, afetando seu bem estar e conseqüentemente sua sobrevivência. Essas situações podem ser chamadas de agentes estressores e são responsáveis pela quebra da homeostase ou estresse no animal (BALDISSEROTTO et al., 2014). A ação dos agentes estressores pode ser aguda (quando estão em condições de manejo, como captura, biometria e transporte) ou crônica (quando os peixes são expostos por um longo período de condições estressantes) (WENDELAAR BONGA, 1997).

Diante desses fatores há vários mecanismos que envolvem uma série de respostas neuroendócrinas e comportamentais que tendem a manter o equilíbrio das funções vitais do animal (VON-BORELL, 1995). As respostas ao estresse são divididas em primárias, secundárias e terciárias. A primária (neural e neuroendócrina) se inicia logo após contato com um agente estressor e tem como resposta o sistema biológico e há o aumento de catecolaminas e do cortisol. As respostas secundárias são conseqüências fisiológicas resultantes das primárias, envolvem órgãos e tecidos responsáveis pela adaptação às condições alteradas e resistência, ocorrem alterações na glicemia, hematócrito, número de linfócitos entre outras. As terciárias são a última resposta, o animal perde a capacidade adaptativa e os sistemas biológicos estão esgotados, ocorrem alterações comportamentais, maior suscetibilidade a doenças e redução do crescimento (WENDELAAR BONGA, 1997).

O estresse pode ser definido como o somatório das mudanças que ocorrem no organismo frente a um desafio, junto a tentativas fisiológicas de reestabelecer a homeostase ou o equilíbrio do animal (WENDELAAR BONGA, 1997). Segundo Barton e Iwana (1991), os peixes têm capacidade natural de responder fisiologicamente a uma situação de estresse. Diante disso, as alterações fisiológicas têm sido o foco de muitos estudos.

As alterações fisiológicas, hematológicas e imunológicas decorrentes da reação do peixe diante a um desafio são frequentemente referidas como

respostas ao estresse (WEDEMEYER et al., 1990). O cortisol é uma resposta fisiológica, um das mais importantes, e está relacionada a diversas alterações que acontece no organismo. Afeta a fisiologia e o comportamento dos peixes, o metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios e age como um hormônio hiperglicemiante. O cortisol também causa imunossupressão, que conseqüentemente, aumenta a susceptibilidade dos peixes a doenças (PICKERING et al., 1989 & MOMMSEN et al., 1999).

O perfil hematológico é uma das ferramentas de estudo que auxilia no diagnóstico para determinar o estado de saúde e a identificação de estresse em peixes, assim como a avaliação bioquímica (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Segundo Kumschnabel e Lackner (1993) e Bendhack, (2008) o estresse em peixes causa mudanças na morfologia dos eritrócitos, no percentual do volume globular, concentração de hemoglobina e hemodiluição ou hemoconcentração.

Foi comprovado que os animais aparecem doentes quando são submetidos a uma situação de estresse, isso acontece porque a carga alostática reduz a eficiência das funções de defesa imune, potencializando a ação dos patógenos (TORT, 2011). A resposta do sistema imune dos peixes se divide em inata ou não específica e adaptativa ou específica (SAKAI, 1999). Ambas as respostas exercem funções fundamentais na defesa contra patógenos, mas nos peixes a resposta imune inata é mais importante (URBINATI E CARNEIRO, 2004; SAURABH E SAHOO, 2008).

A resposta inata é composta pelo conjunto de respostas que compõe o primeiro mecanismo de defesa. É representado pelas barreiras físicas e químicas, componentes celulares representados pelos trombócitos, leucócitos (monócitos/macrófagos e granulócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos), células citotóxicas (natural killers) e os componentes humorais. A resposta inata é compensatória a resposta imune adaptativa (BLY e CLEM, 1994; SECOMBES, 1996; WATTS; MUNDAY, 2001 & BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014).

As células sanguíneas monócitos e macrófagos são os principais agentes de defesa do organismo, pois são essenciais para a fagocitose e na destruição de patógenos e participam das reações imunes contra doenças e estresse (KANTARI et al., 2008). O uso de imunoestimulantes estimula essas

células e conseqüentemente o sistema imune e a resistência do animal (SAKAI, 1991 & LIM; WEBSTER, 2001). Fatores internos e externos como mudanças de temperatura, gerenciamento do estresse e a densidade de estocagem, também influenciam na resposta imune inata (MAGNADOTTIR, 2006, 2010).

O sistema imune específico engloba uma rede de células, proteína, genes e mensageiros bioquímicos, e depende da presença do antígeno para desencadear uma cascata de reações que resultará no aumento de anticorpos específicos e na memória imune (BERNSTEIN et al., 1998 & UBIRE, 2011). E possui componentes celulares e humorais como o sistema inato (SECOMBES, 1996)

As células responsáveis pela resposta imune adaptativa celular e humoral são chamadas de linfócitos, são altamente diferenciadas e respondem a estímulos imunológicos. São divididas em dois grupos, com ações diferentes, chamados linfócitos T e B (ELLIS, 1999). Os linfócitos T auxiliares são mensageiros químicos e T citotóxicos destroem as células infectadas e os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos (TIZARD, 2002; SECOMBES E WANG, 2012).

As respostas imunes acontecem diante de várias interações entre o sistema inato e adaptativo, estando em predomínio nas fases iniciais da infecção as respostas inatas e nas fases tardias as repostas adaptativas (Mello, 2016).

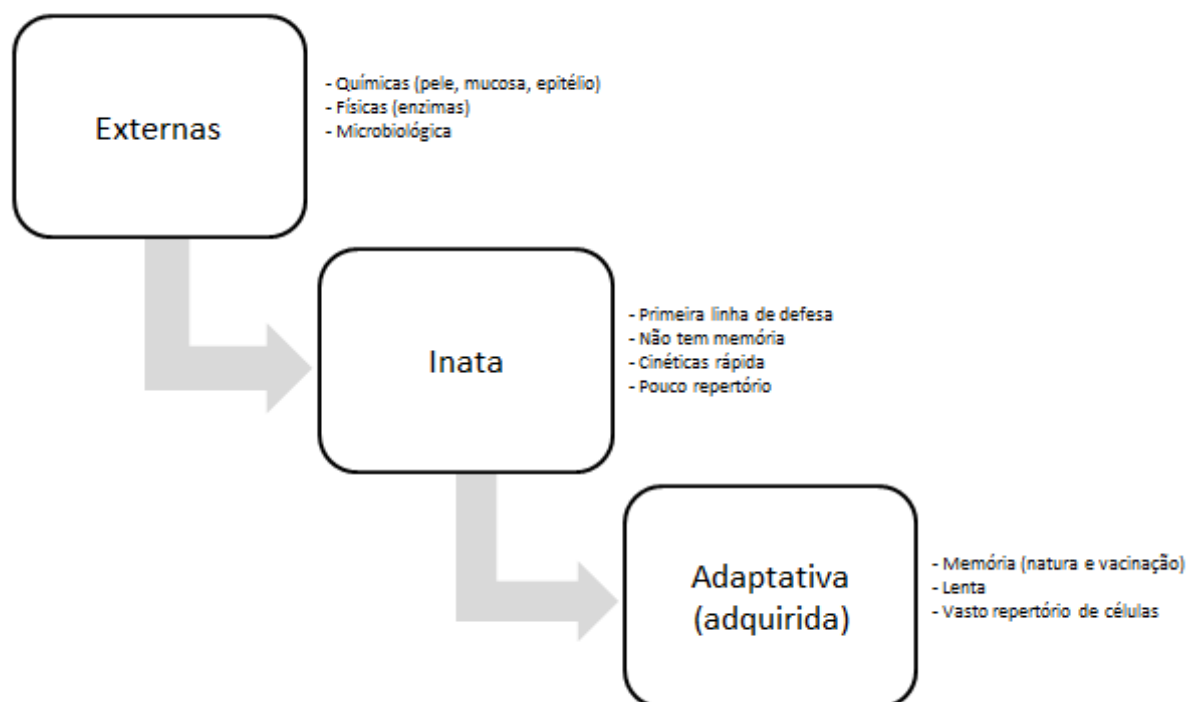


Figura 2. Esquema das respostas do sistema imune inato e adaptativo.
 Fonte: www.fmvz.usp.br/labmas (2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com probiótico, prebiótico e simbiótico sobre o desempenho zootécnico e respostas fisiológicas, imunológicas, hematológicas e histologia do intestino de larvas e juvenis de cacharas *Pseudoplatystoma reticulatum*.

3.2 Objetivos específicos

Artigo 1

- Avaliar se o enriquecimento da artemia com probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e simbiótico *Bacillus subtilis* + inulina tem efeito sobre o desempenho zootécnico de larvas de cacharas.

- Verificar se o uso de probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e simbiótico *Bacillus subtilis* + inulina altera a morfometria intestinal de larvas de cacharas.

Artigo 2

Avaliar se a dieta suplementada com probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e simbiótico *Bacillus subtilis* + inulina tem efeito sobre os parâmetros zootécnicos de juvenis de cacharas.

- Avaliar se a dieta suplementada com probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e simbiótico *Bacillus subtilis* + inulina de juvenis de cacharas tem efeito nas respostas imunológicas, fisiológicas e hematológicas.

- Verificar se o uso de probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e simbiótico *Bacillus subtilis* + inulina altera a morfometria intestinal de juvenis de caharas.

- Avaliar a resistência de juvenis de cacharas suplementados com probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e simbiótico *Bacillus subtilis* + inulina após desafio bacteriano por *Aeromonas hydrophila*.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDERSON, D. P. Immuunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications aquaculture. **Annual Review of fish Diseases**, Oxford, v.2, p. 128-136, 2008.

AGARWAL, N.; KAMRA, D.N.; CHAUDHARY, L.C.; AGARWAL, L.; SAHOO, A.; PATHAK, N.N. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves on different microbial feed additives. **Letters in Applied Microbiology**, n. 34, p. 329–336, 2002.

ALEXOPOULOS, C.; GEORGOULAKIS, I.E.A.; TZIVARA, A.; KRITAS, S. K.; SIOCHU, A.; KYRIAKIS, S.C. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, n. 88, p. 381-392, 2004.

ANTONY, S. P., PHILIP, R. Probiotics in aquaculture. **Journal of the World**

Aquaculture Society, p. 59-63, 2008.

ARAUJO, F. G. **Enriquecimento de artêmias com ácidos graxos para estudos de suplementação em larvas de peixes**. 110 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

BAGHERI T., HEDAYATI S.A., YAVARI V., ALIZADE M. & FARZANFAR A. Growth, survival and gut microbial load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, n. 8, p. 43–48, 2008.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173-186, 2006.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. 2010. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2º Ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 608 p.

BARTON, B. A. & IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortico- steroids. **Ann. Rev. of Fish Diseases**, v. 1, n. 3, 26p., 1991.

BENDHACK, F. **Respostas fisiológicas do matrinxã *Brycon amazonicus* após mudança de ambientes com diferentes concentrações de sais de cálcio e de sódio**. 90p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, São Paulo, 2008.

BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. (Ed.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2ª ed., p.215-242, 1998.

BILLER, J. D. **Respostas fíto-patológicas e desafiopor aeromonas hydrophila em pacu alimentado com ração suplementda com 1,3 B.**

glucano. 114 p. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual Paulista, 2008.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n.3, p. 1484-1506, 2014.

BLY, J. E.; CLEM, L. W. Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. In: COSSINS, A. R. Temperature adaptation of biological membranes. **Portland Press**, p. 169-184, 1994.

BRICKNELL, I & DALMO, R.. A. The use oof immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, n. 19, p. 457– 472, 2005.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes na região de Três Marias (com chave de identificação para peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília: CODEVASF, 3. ed. p. 115. 1988.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 15, n. 12, p. 1-38, 2007.

BURR G., GATLIN D. & RICKE S. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, n, 36, p. 425–436, 2005.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 1ª Ed. Campinas: CBNA, 2002. 430p.

CAPRILES, V. D.; SILVA, K. E. A.; FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Nutrição Brasil**, v. 4, n. 6; p. 327-335, 2005.

CARVALHO, J. V. D.; LIRA, A. D. D.; COSTA, D. S. P.; MOREIRA, E. L. T.;

PINTO, L. F. B.; ABREU, R. D.; ALBINATI, R. C. B. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n 1, 2011.

CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A. & LAMAS, J. Effect of different beta glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, n. 9, p. 529–541, 1999.

CAVALHEIRO, A. C. M.; CASTRO, M. L. S.; EINHARDT, M. D. S.; POUEY, J. L. O. F.; PIEDRAS, S. N.; XAVIER, E. G.. Microingredientes utilizados em alimentação de peixes em cativeiro – Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n.109, p. 11-20, 2014.

CEROZI, B. S. **Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 81 p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012

COLLINS, M. D.; GILSON, G. R. Probiotic, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **The American Journal of Clinical**, v. 69, n. 5, p. 1052-1057, 1999.

COUTTEAU, P.; GEURDEN, I.; CAMARA, M. R.; BERGOT, P.; SORGELOOS, P. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1/4, p. 149-164, 1997.

CHEVASSUS, B. & DORSON, M. Genetics of resistance to disease in fishes. **Aquaculture**, v. 85, p. 83–107. 1990.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M.C.; TEIXEIRA, E.A; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, R. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. O surubim na aquacultura

da Brasil. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p.150-158, 2006.

DANIELS, C. L.; MERRIFIELD, D. L.; RINGO, E.; DAVIES, S. J. Probiotic, prebiotic and synbiotic applications for the improvement of larval European lobster (*Homarus gammarus*) culture. **Aquaculture**, 2013.

DIMITROGLOU, A.; DAVIES, S.J.; SWEETMAN, J. *et al.* Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. **Aquac. Res.**, v.41, p.245-251, 2010.

DIAS, C. D.; CORREA, C. F.; GERVASIO, A. F.; TACHIBANA, L.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiótico na larvicultura de matrinxã, Brycon amazonicus. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 365-368, 2011.

DIONIZIO, M.A.; BERTECHINI, A.G.; KANJI KATO, R. *et al.* Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte – Desempenho e rendimento de carcaça. **Ciência Agrotécnica**, Edição Especial, p.1580-1587, 2002.

DOUILLET P.A. LANGDON C.J. Use of a probiotic for the culture of larvae of the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). **Aquaculture**, v. 119, p. 25–40, 1994.

ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.291-308, 1999.

FEIDEN, A.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. I. Desenvolvimento do surubim do iguaçu (*Steindachneridion* sp., Garavello (1991) (Siluroidei:Pimelodidae) em ambiente escuro durante a fase inicial, alimentado com diferentes dietas. **R. Bras. Zootec.**, v. 26, n. 1, p. 109-116, 2005.

FERREIRA, D.; BARCELL, L.J. Enfoque Combinado empreendedorismo como Boas Praticas de Manejo e como Medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **Revista Científica da Pesca, Aquicultura e Limnologia**, v.34, n.4, p.601-611, 2009.

FLICKINGER, E. A.; JAN VAN LOO; FAHEY JR. G. C. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 19-60, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: Acesso em: 24 abr. 2017.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, London, v. 87, p.287-291, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GANGULY, S.; PAUL, I.; MUKHOPADHAYAY, S.K. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: a review. Israeli Journal of **Aquaculture**, v.62, p.130-138, 2010.

GANNAM, A. L.; SCHROCK, R. M. Immunostimulants in fish diets. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 53-89, 1999.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J. RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquaculture e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GATESOUBE, F. J. The use of probiotic in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, n. 1-2, p. 147-165, 1999.

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.107-114. 2008.

GIBSON, G.R. Functional foods: probiotics and prebiotics. *Culture*, v. 28, n.2, p. 1-7, 2007.

GONÇALVES, A.. **Hematologia e macrofágos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina.** 79 p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de São Paulo. 2009.

HAN, K.M.; GEURDEN, I.; SORGELOOS, P. Enrichment strategies for *Artêmia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids. **Aquaculture**, Amsterdam. v. 1883, n. 3/4, p. 335-347, 2000.

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; MOORE, S. H.; COOK, D. R.; BALDWIN, J.; TINDALL, K. V.; LEE, D. R. Allele Frequency of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Corn in Louisiana Populations of Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae). **Insecticide Resistance and Resistance Management**, v. 101, n. 2, p. 492-498, 2008.

INOUE, L. A. K. A.; CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A. A larvicultura e a alevinagem do Pintado e do Cachara. **Panorama da Aquicultura**, v.74, p.13-21, 2002.

INOUE, L. A. K.; HISANO, H.; ISHIKAWA, M. M.; ROTTA, M. A.; SENHORINI, J. A. 2009. **Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (Pintado e Cachara).** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; Corumbá: Embrapa Pantanal. 26p.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIRO, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to microbiology**, v.15, p.118-146, 2008.

KUBTIZA, F. Nutrição e saúde no cultivo de tilápias. **Panorama da Aquicultura**. p. 14-23,. 2013.

KUMSCHNABEL, G.; LACKNER, R. Stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.104 , n.4, p.777- 784, 1993.

LAVENS P. & SORGELOOS P.1986.Manual on the production and use of live food for aquaculture. **FAO Technical Paper**. Food And Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. n. 361, 295 pp.

LÉGER, P.; BENGTSON, D.A.; SIMPSON, K.L.; SORGELOOS, P. 1986 The use and nutritional value of Artemia as a food source. **Oceanography and Marine Biology: an annual review**, 24: 521-623.

LIM, L.; CHO, J. L.; DHERT. P.; WONG, C. C.; NELIS, H; SORGELOOS, P. Use of desapsulated artêmia cysts in ornamental fish culture. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 575-589, 2002.

LUZ, R. K.; ZANIBONI, E. Utilização de diferentes dietas na primeira alimentação do mandi amarelo (*Pimelodus maculatus*, Lacépède). **Acta Scientiarum Maringá**, v. 23, n. 2, p. 483-489, 2001.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.24, p.701-714, 2006.

MACHADO, J. H.; CARRATORE, C. R. D.; GAROSSINO, A. P. R.; MAZETO, M. D.; GRECHI, F. C. S. Treinamento alimentar para aceitação de rações artificiais de alevinos de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) In: Aqüicultura Brasil, 2, Recife. **Anais**, p. 101-108, 1998.

MAEDA, M.. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. **Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.**, v. 21, p. 25–29, 1992b.

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

MAGNADÓTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Journal of Marine Biotechnology**, n. 12, p. 361–379, 2010.

MAHIOUS, A. S.; GATESOUBE, F. J.; HERVI, M.; METAILLER, R.; OLLEVIER, F. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). **Aquaculture International**, v. 14, p. 219–229, 2006.

MELLO, H. **Bacillus cereus e Bacillus subtilis na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (Oreochromis niloticus) e seu efeito probiótico**. 57 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, 2012.

MELLO, M., M., M. **Uso do β -glucano e avaliação de indicadores de estresse e do sistema imune inato de pacu após manejo de transporte**. 99 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, 2016.

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

MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M. & MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews on Fish Biology and Fisheries*, v. 9, p. 211–268, 1999.

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

OBA E.T., MARIANO W.S. & SANTOS L.R.B. (2009). **Estresse em peixes**

cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias M. (Ed.), *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá, Brasil, p.226-247

OECD/FAO (2016). OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-en

OLIVEIRA, M. N.; SIVIER, I. K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23-37, 2001.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 1989, v. 7, p. 253-258.

RAA, J.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSON, B. The use of immunoestimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASINGHE, R. P., ARTHUR, J.R. (Eds.), *Diseases in Asin Aquaculture Manila: Fish Heath Section*. **Asian Fisheries Society**, p. 39-50, 1992.

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

RESENDE, E.K.; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L. et al. **Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Corumbá, MS:**

EMBRAPA/CPAP, 1996. 75p. (Boletim de Pesquisa, 2).

RIJKERS, G. J.; TEUNISSEN, A. G.; VAN OOSTERON, R.; VAN MUISWINKEL, W. B. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effects of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 19, p. 177-189, 1980.

RINGO, E. & BIRKBECK, T. H. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, n. 30, p. 73-93, 1999.

RIVERA C. M & BOTERO, M. Z. Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. Ver. Colomb. Cienc. Pecu., v. 22, p. 607-618, 2009.

ROBERFROID, M. D. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-148, 1993.

ROBERFROID, M. B.; DELZENNE, N. Dietary fructans. **Annu Rev Nutr**, v. 18, p. 117-43, 1998.

ROBERFROID, M. B. Caloric value of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1436-1437, 1999.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and Probiotics: Are They Functional Foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1682-1687, 2000.

ROBERTSEN, B., ENGSTAD, R. E. & JORGENSEN, J. B. Glucans as immunostimulants. In *Modulators of Fish Immune Responses*. **Fair Haven: SOS**, vol. 1, p. 83-99. 1994.

RODRIGUES, R. B.; MEURER, F.; BASCOLO, W. R. Aditivos na nutrição de peixes. **Rev. Colombiana Cienc. Anim.**, v. 7, n. 2, p. 228-236, 2015

ROMAGOSA E, PAIVA P, ANDRADE-TALMELLI EF, GODINHO HM. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (teleostei, siluriformes, pimelodidae), mantidas em cativeiro. **Bol. Inst. Pesca**, v. 29, p. 51-159, 2003.

SÁENZ DE RODRIGÁÑEZ, M. A.; DÍAZ-ROSALES, P.; CHABRILLÓN, M.; SMIDT, H.; ARIJO, S.; LEÓN- RUBIO, J. M.; ALARCÓN, F.J.; BALEBONA, M. C.; MORIÑIGO, M.A.; CARA, J. B.; MOYANO, F.J. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionally of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture Nutrition**, n. 15, p. 177–185, 2009.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.42, n.1, 2006.

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

SANTOS, C. Aquicultura e pesca: a mudança do modelo exploratório. **Manual e sanidade de peixes em cultivo** (Tavares-Dias, M.). Embrapa Amapá, Macapá, p.13-32, 2009.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SCHWARZ, K.K.; FURUYA. W.M.; NATALI, M.R.; GALDEZI, M.C.; LIMA, A.G. PATRÍCIA. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 40, p. 2634-2640, 2011.

SECOMBES, C.J. **The nonspecific immune system: cellular defences**. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. San Diego: Academic Press, p.63-103, 1996.

SECOMBES, C.J.; WANG, T. **The innate and adaptive immune system of fish. In: Infectious disease.** In: Aquaculture Prevention and Control, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p.3-68, 2012.

SUNYER, J. O. ZARKADIS, I. K. LAMBRIS, J. D. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? **Immunol Today**, v. 158, p. 2812-2821, 1998.

SILVA DA, L. P.; NORBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 983-990, 2003.

SILVA, W. T. M.; NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; POZZA, M. S. S.; APPELT, M. D.; EYNG, C. Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 1, p. 19-24, 2011.

SORGELOOS, P. A. P.; DHERT, A.; CANDREVA, P. Use of the brine shrimp *Artemia* sp. In marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 200, n.1/2, p. 147-159, 2001.

TAVARES, M.P. **O surubim. In: Miranda, M.O.T., (ed.) Surubim.** Belo Horizonte: IBAMA, 1977. p. 9-25.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos.** Ribeirão Preto: Villimpress. 2004. 144p.

TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F. M.; BEYNEN, A.C. Monostrain, multistain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**; n. 96, v. 3, p. 219-233, 2004.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução.** São Paulo: Roca, 2002.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 1366-1375, 2011.

TOURAKI, M. & NIOPAS, I. Bioencapsulation and pharmacokinetic study of oxolinic acid in rotifers (*Brachionus plicatilis*), *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii. **Aquac Res.**, v. 44, p. 701-712, 2012

UBIRE, C. FOLCH; H. ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, n. 56, p. 486-503, 2011.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura**. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.71-193, 2004.

VON-BORELL, E. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, v. 44, p. 219-227, 1995.

WATTS, M; MUNDAY, B.L; BURKE, C.M. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 153-164, 2001.

WATANABE, T. Fish nutrition and mariculture. **Tokyo**. 233 p. 1988.

WEDEMEYER G. A, BARTON B, MC LEAY D. Stress and acclimation. In: Schreck C, Moyle P. (Ed.). *Methods for fish biology*. Bethesda, MD: **American Fisheries Society**,. p. 451-489, 1990.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev**, v. 77, p. 591-625, 1997.

CAPÍTULO 2

O artigo foi elabora de acordo com as normas da Revista: Aquaculture

Enriquecimento de náuplios de artêmia com *Bacillus subtilis*, inulina e simbiótico para larvas de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*

Enriquecimento de náuplios de artêmia com inulina melhora a sobrevivência de larvas de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*

RESUMO

A larvicultura é fator limitante da produção de peixes carnívoros, pois nos primeiros dias de vida as larvas necessitam de um alimento vivo. Na produção aquícola a artêmia é amplamente conhecida como o melhor alimento vivo disponível, muito usado na dieta de peixes, é um crustáceo considerado um filtrador não seletivo, essa característica permite que seu tubo digestório seja enriquecido. Com este estudo avaliou-se o efeito do fornecimento da *Artemia salina* enriquecida com probiótico, prebiótico simbiótico sobre o desempenho zootécnico e histomorfometria intestinal de larvas de *Pseudoplatystoma reticulatum*. Larvas de cachara com peso médio de 0,0004 g e comprimento de $3,20 \pm 0,26$ mm (média e desvio padrão), foram obtidas por meio de reprodução induzida e 48 horas após a eclosão distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (quatro tratamentos / três repetições), em 12 incubadoras, com volume útil de 60L na densidade de 35 larvas/L. Após a descapsulação da artêmia, os náuplios foram colocados em recipientes com água salgada e aeração para o enriquecimento por um período de 6 horas. Os tratamentos foram: Tratamento 1 (controle, sem aditivo); Tratamento 2 (probiótico *Bacillus subtilis* 7g/ L/ dia); Tratamento 3 (prebiótico inulina 7g/ L/ dia) e Tratamento 4 (simbiótico *Bacillus subtilis* 7g/ L/ dia+ inulina 7g / L/ dia). As larvas foram alimentadas 12 vezes ao dia, sendo os náuplios enriquecidos ofertados 6 vezes ao dia. As Larvas alimentadas com náuplios enriquecidos com inulina apresentaram taxa de sobrevivência significativamente maior que os outros tratamentos 25,17 %. Para a histomorfometria intestinal as larvas alimentadas com artêmia enriquecida com *B. subtilis* e não enriquecida (controle), foram estatisticamente melhores para as variáveis altura total e altura das vilosidades. A camada muscular foi melhor nos tratamentos inulina e controle. O enriquecimento de náuplios de artêmia não melhorou o desempenho zootécnico de larvas de cachara.

Palavras-chave: alimento vivo; *Artemia salina*; peixes carnívoros; larvicultura, probiótico, prebiótico.

Enrichment of artemia with *Bacillus subtilis*, inulin and symbiotic for cachara larvae *Pseudoplatystoma reticulatum*

ABSTRACT

The Larvae are a limiting factor of production, because in the first days of life the larvae need a live food. In aquaculture production the artemia is widely known as the best live food available widely used in the diet of fish is a crustacean considered a non-selective filter. This feature allows your digestive tube to be enriched. This study evaluated the effect of the supply of *Artemia salina* enriched with probiotic, prebiotic and symbiotic on zootechnical performance and intestinal histomorphometry of *Pseudoplatystoma reticulatum* larvae. The larvae the cachara with a mean weight of 0.00004 g and length 3.20 mm $\pm$ 0.26 (mean and standard deviation) were obtained by means of induced reproduction and 48 hours after the hatchings distributed in design was completely randomized (four treatments / three replicates), the larvae were distributed in 12 incubators with a useful volume of 60L in density of 35 larvae / L, fed 12 times a day, where enriched arsenic was provided 6 times a day. After the descrambling of the artemia the nauplii were placed in 4 containers with salt water and aeration each container contained a treatment. The additives were added to enrich for a period of 6 hours. Enriched nauplii were offered 6 times a day. The treatments were: T1 (control, without additive); T2 (probiotic *Bacillus subtilis* 7g / L / day); T3 (prebiotic inulin 7g / L / day) and T4 (symbiotic *Bacillus subtilis* 7g / L / day + inulin 7g / L / day). Larvae fed nauplii enriched with inulin presented a significantly higher survival rate than the other treatments 27,17 %. For intestinal histomorphometry, the larvae fed with arsenic enriched with *B. subtilis* and not enriched (blank control), were statistically better for the variables total height and height of the villi. Muscle layer, as another parameter, performed better under inulin and control treatments. The enrichment of *Artemia* nauplii did not improve the zootechnical performance of cachara larvae.

KEYWORDS: live food; *Artemia salina*; carnivore fish; larviculture; probiotic, prebiotic.

INTRODUÇÃO

Com grande potencial para aquicultura os surubins são muito procurados por apresentarem carne nobre proporcionando filé com pequena quantidade de espinhas (Campos, 2010). A produção de espécies puras de surubins no Brasil é restrita, sendo alguns dos entraves a reprodução, larvicultura e a nutrição (Crepaldi et al., 2006). A espécie em estudo *Pseudoplatystoma reticulatum* é amplamente utilizada em pisciculturas comerciais de diversas regiões do país para produção de híbridos intra e interespecíficos. Segundo Inoue (2003), a larvicultura é fator limitante da produção de peixes carnívoros, pois nos primeiros dias de vida as larvas necessitam de alimento vivo, ponto crucial na produção desses peixes, mesmo posterior à fase de pós-larva, eles são criados *in door* até atingirem entre 12 a 20 cm.

Na produção aquícola a artêmia é amplamente conhecida como o melhor alimento vivo disponível, largamente utilizado na dieta de peixes e crustáceos marinhos de todo o mundo, devido suas vantagens nutricionais e operacionais (Lavens e Sorgeloos, 1986). A artêmia é um pequeno crustáceo considerado um filtrador não seletivo (Sorgeloos et al., 2001).

Essa característica filtradora permite que seu tubo digestório seja enriquecido por meio de um método também chamado de bioencapsulamento que é extensivamente aplicado na larvicultura de peixes e crustáceos cultivados para aumentar o valor nutricional da artêmia (Coutteau et al., 1997; Sorgeloos et al., 2001). Existem dois métodos de enriquecimento da artêmia, o direto e o indireto. No método, direto o aditivo pode ser fornecido para os organismos sob a forma de emulsão, homogeneizada com água. No método indireto, os organismos são alimentados, geralmente com levedura, que foram cultivadas em meio contendo o aditivo (WATANABE, 1988).

Neste trabalho foi realizado o enriquecimento de náuplios de artêmia com probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e a combinação desses dois aditivos (simbiótico) para alimentar larvas de cachara *Pseudoplatytoma reticulatum*. O enriquecimento foi empregado para utilizar os náuplios como vetor dos aditivos, pois nos primeiros dias de vida o único alimento ofertado para as larvas é a artêmia. Segundo Bricknell & Dalmo (2005), os

imunoestimulantes na fase larval de um peixe podem ativar as células de defesa deixando o animal em estado de preparo para quando encontrar um patógeno invasor

Os probióticos são células microbianas que entram no trato digestório e são capazes de manter-se vivas, melhorando a saúde dos animais (Gatesoupe, 1999). Bactérias do gênero *Bacillus* são um dos probióticos mais utilizados na aquicultura e tem como vantagem resistência a alta variação de temperatura (Rengpipat et al., 2000). O *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva do solo, formadora de esporos, que pode transitar pelo trato digestório e auxiliar na multiplicação e colonização dos produtores de ácido láctico (Harwoor, 1992; Maruta, 1993).

Os Prebióticos são considerados ingredientes funcionais, pois exercem influência sobre processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, melhorando a saúde e reduzindo o aparecimento de doenças (Roberfroid, 2002; Saad, 2006). A inulina é um carboidrato, não digerível, do tipo frutano vastamente encontrada na natureza em algumas plantas, bactérias e fungos, mas na produção industrial ela é extraída a partir da raiz da chicória (Roberfroid, 1993; Franck, 2002). Um dos efeitos nutricionais mais conhecidos da inulina e da oligofrutose é a sua capacidade para modificar a composição da microbiota e a sua atividade metabólica no intestino grosso (Roberfroid et al, 1998).

Com este trabalho foi avaliado o efeito do enriquecimento de artêmia enriquecida com probiótico (*Bacillus subtilis*), prebiótico (inulina) e simbiótico (*Bacillus subtilis* + inulina) sobre o desempenho zootécnico e histomorfometria intestinal de larvas de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais do projeto foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA (UEMS) protocolo nº 014/2013.

Local do experimento e obtenção das larvas de cachara

O experimento foi realizado na piscicultura Piraí, região de Terenos, MS no mês de janeiro de 2016. As larvas de *Pseudoplatystoma reticulatum* foram

obtidas por meio de reprodução induzida, utilizando hormônio gonadotrófico, de reprodutores selecionados do plantel da piscicultura. Após a desova, os ovos foram distribuídos em uma incubadora tipo funil com volume útil de 200 L, fluxo de água contínuo e, em 48 horas após a eclosão, as larvas foram transferidas para suas unidades experimentais. Antes da transferência, uma amostra com 10 larvas foi coletada para mensurar o peso e o comprimento.

Para fazer a distribuição das larvas nas unidades experimentais, foram coletados, com auxílio de um Becker, 100 ml de água da incubadora e contabilizado o número de larvas. Esse processo foi repetido por 5 vezes e com o valor da média foi calculado o número aproximado de larvas a cada 100 ml, para então fazer a distribuição nas incubadoras. Cada incubadora recebeu aproximadamente 2100 larvas, com peso médio inicial de 0,00004 g e comprimento total $3,20 \pm 0,26$ mm (média e desvio padrão).

Delineamento experimental e alimentação

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos: T1 (controle, sem aditivo); T2 (probiótico *Bacillus subtilis* 7g); T3 (prebiótico inulina 7g) e T4 (simbiótico *Bacillus subtilis* 7g + inulina 7g), com três repetições, conduzida em 12 incubadoras tipo funil com volume útil de 60L, com densidade de 35 larvas/L, mantidas em fluxo de água contínuo, fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, durante 12 dias.

A primeira alimentação exógena foi ofertada 48 horas após a eclosão, que consistia em náuplios de artêmia (*Artêmia salina* do RN[®]) enriquecidos com seus devidos tratamentos.

Cada incubadora recebeu inicialmente 114 mil náuplios e esse valor foi ajustado a cada dois dias, sendo que, no final cada incubadora recebeu 280 mil náuplios, alimentadas 12 vezes ao dia, sendo 6 com artêmias enriquecida e 6 com artêmia não enriquecida. Os náuplios enriquecidos foram ofertados às larvas de cachara às: 01:30; 05:30; 09:30; 13:30; 17:30 e 21:30 horas. O tratamento controle não recebeu nenhum aditivo, mas os náuplios foram mantidos nas mesmas condições que os suplementados.

Enriquecimento da artêmia

A descapsulação dos cistos de artêmia foi realizada em incubadora de fibra tipo funil com capacidade de 200 litros. Os cistos de artêmia foram eclodidos segundo a metodologia descrita por Sorgeloos (1996) e incubados por um período de 24 horas em água salinizada e aeração por borbulhamento de ar comprimido com iluminação constante, e temperatura entre 26 a 30°C. A eclosão dos cistos de artêmia foi realizada a cada duas horas. Após o período de eclosão, a aeração foi desligada e 10 minutos depois, os náuplios foram passados em rede de plâncton para separação dos cistos não eclodidos.

Os aditivos utilizados foram o probiótico *Bacillus subtilis* (1×10^9 UFC/g). Doado pela empresa Uniquímica, o CALSPORIN®10 é um produto baseado em esporos viáveis de uma cepa de organismos geneticamente modificado, isolado originalmente do solo. A inulina foi doada pela empresa Nuscience Nutrientes do Brasil, o produto é composto por 92% inulina, 8% frutose, glicose e sacarose e 0,2 cinzas.

Após a descapsulação, os náuplios foram colocados em recipientes com água salgada e aeração para o enriquecimento por um período de 6 horas, cada recipiente continha um tratamento com 1,16g de cada aditivo. As artêmias enriquecidas foram ofertadas 6 vezes ao dia. Os náuplios foram deixados para enriquecer segundo Arndt e Wagner (2007).

Desempenho zootécnico

Ao final da suplementação as larvas foram submetidas a 15 horas de jejum e 10 larvas de cada unidade experimental foram imersas em solução de eugenol (50mg/L) até anestesia profunda e fixada em formol 10% para posterior análise. As larvas tiveram seu comprimento total determinados com auxílio de paquímetro digital e seu peso determinado em balança analítica.

Ao final do período experimental, foi realizada a avaliação de desempenho zootécnico por meio das seguintes variáveis: ganho de peso (GP) = [peso corporal final (g) - peso corporal inicial (g)]; Ganho em comprimento (GC) = [comprimento total final (mm) - comprimento total inicial (mm)]; Taxa de crescimento específico foi determinada pela fórmula $\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)} / \text{dias de experimento}$, em que $\ln$ é o logaritmo natural do peso final e

inicial e sobrevivência (S) = [número de peixes inicial / número de peixes final x 100 (%)].

O fator de condição alométrico foi calculado pela formula $K = W/L^b$ onde W é o peso, L o comprimento e b é estimado pela equação da relação peso-comprimento. A uniformidade dos peixes em cada unidade experimental, foi calculada pela adaptação da equação proposta por Furuya et al. (1998): $U = (N/NI)$, onde U= uniformidade (%); N = número de animais no tanque; NI = número total de animais com peso ou comprimento 20% superior ou inferior á média do peso vivo, em cada unidade experimental.

Histomorfometria Intestinal

Após os 12 dias de suplementação, 5 larvas de cada unidade experimental foram coletadas e anestesiadas em eugenol (50 mg/L), eutanasiadas e deixadas por 24 horas em solução formol 10% para fixação e depois em álcool 70% onde permaneceram até o momento do processamento. A confecção das lâminas histológicas foi realizada em parceria com o Laboratório de Histologia do CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/Campus Campo Grande. Devido o tamanho pequeno do animal essa análise foi realizada com a larva inteira.

As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina, desidratação em série crescente de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Por ato contínuo, foram realizados cortes transversais semi-seriados de 4µm obtidos em micrótomo (ZEISS HYRAX M 25). Após a preparação das lâminas, foram realizadas as medidas morfométricas, sendo três mensurações de cada variável por animal.

As lâminas histológicas foram fotodocumentadas com câmera digital Nikon (D3100), acoplada em microscópio ótico (ZEISS-Primo Star), no aumento de 400x para mensuração das variáveis histomorfométricas (Figura 1), utilizando o programa Motic Images Plus 2,0 ML.

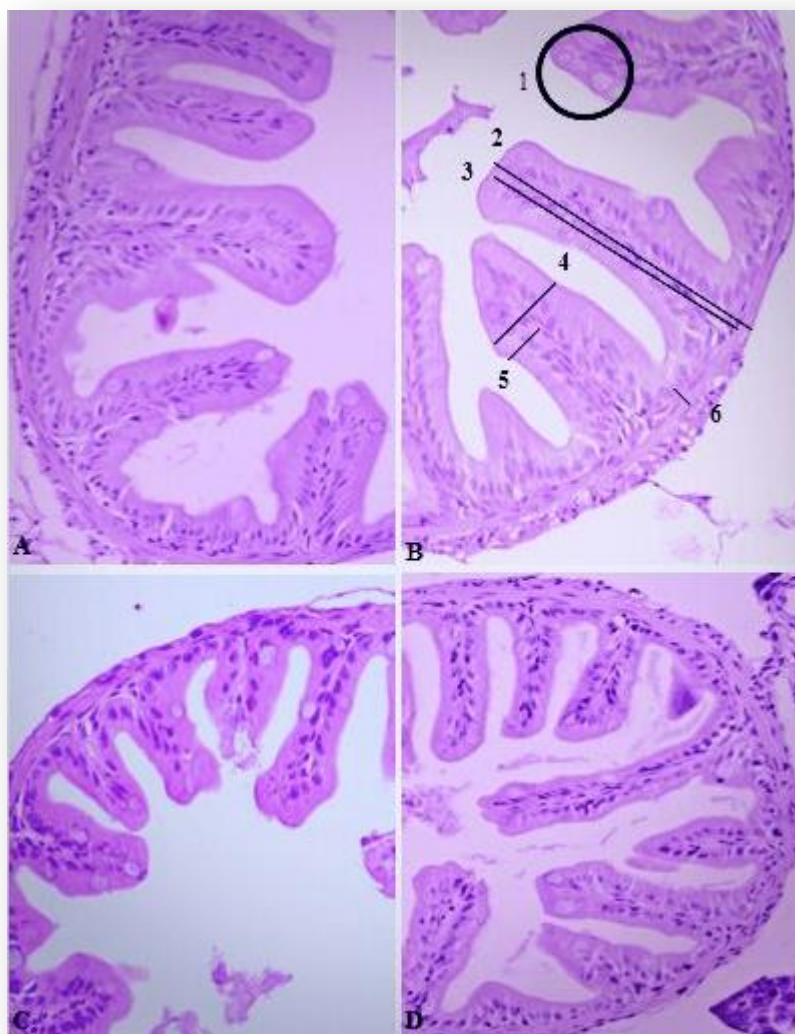


Figura 1. Fotomicrografia da mucosa intestinal de larva de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*. Variáveis da histomorfometria intestinal: altura total do vilo (1); altura do vilo (2), largura (3), espessura do epitélio (4), camada muscular (5) e células caliciformes (6)

Qualidade da água

A qualidade da água foi monitorada diariamente nos períodos da manhã e da tarde por meio da mensuração o pH e temperatura com auxílio de phmetro water proof Family HANNA e oxigênio dissolvido, com auxílio do oxímetro HANNA HI 9146®. Semanalmente foram medidos a amônia e nitrito por meio de kits comerciais, os valores foram insignificantes.

Durante todo o experimento as variáveis limnológicas não mostraram variações que influenciassem nos resultados (Tabela 1). Os parâmetros de

qualidade de água analisados estavam dentro da faixa de conforto recomendada para a espécie (Faria et al, 2013).

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da qualidade da água para todos os tratamentos (média $\pm$ DP)

	Temperatura °C	Oxigênio Dissolvido mg/l	pH
Manhã	27,75 $\pm$ 0,93	8,64 $\pm$ 0,91	6,8 $\pm$ 0,15
Tarde	29,06 $\pm$ 1,10	8,34 $\pm$ 2,27	6,0 $\pm$ 0,12

Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias submetidas à análise de variância (ANOVA). Quando significativa às diferenças entre as médias foram constatadas por meio do teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Todos os testes foram realizados pelo programa estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho zootécnico

Os valores médios ($\pm$ DP) para as variáveis de desempenho zootécnico estão apresentados na (Tabela 2). Foram observadas diferenças ($P < 0.05$) para as variáveis de ganho em peso e ganho em comprimento o grupo simbiótico apresentou menor valor se comparada aos demais grupos. A taxa de sobrevivência das larvas alimentadas com náuplios de artêmia enriquecidos com inulina foi superior ($P < 0.05$) das observadas nos outros grupos.

O fator de condição alométrico apresentou diferença significativa entre as diferentes dietas fornecidas (Tabela 2), sendo as larvas alimentadas com náuplios enriquecidos com simbiótico apresentando melhor resultado, indicando uma melhor relação peso:comprimento. Não foi constatada diferença significativa para a uniformidade do lote das larvas de cacharas (Tabela 2), mas podemos observar por meio do gráfico de distribuição dos peixes por classe de peso (Figura 1) que o grupo simbiótico foi mais

homogenio, apresentando 87 % dos peixes com peso entre 11 a 40 mg e não possuía peixes acima de

Tabela 2. Desempenho zootécnico de larvas de cacharas alimentadas com artêmia enriquecida com *B. subtilis*, inulina e simbiótico (média $\pm$ DP)

	Controle	<i>B. subtilis</i>	Inulina	Simbiótico	CV (%)
GP (mg)	26,65 $\pm$ 18,26 ^a	28,17 $\pm$ 21,25 ^a	22,32 $\pm$ 7,46 ^{ab}	19,84 $\pm$ 8,43 ^b	56
GC (mg)	13,74 $\pm$ 3,29 ^{ab}	14,34 $\pm$ 1,60 ^a	13,79 $\pm$ 1,60 ^{ab}	13,09 $\pm$ 2,92 ^b	16
TCE	33,44 $\pm$ 0,71	33,82 $\pm$ 0,79	32,86 $\pm$ 0,35	31,90 $\pm$ 0,47	14
So (%)	24,24 ^b	14,27 ^d	25,17 ^a	20,46 ^c	
Fator K	0,001 ^b	0,002 ^b	0,001 ^b	0,025 ^a	57
Unifor.	62 $\pm$ 18,41	75,66 $\pm$ 1,70	68,33 $\pm$ 15,46	65,33 $\pm$ 11,12	

TCE: taxa de crescimento específico; So: sobrevivência; Fator K: fator de condição; Unifor: uniformidade. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P < 0.05).

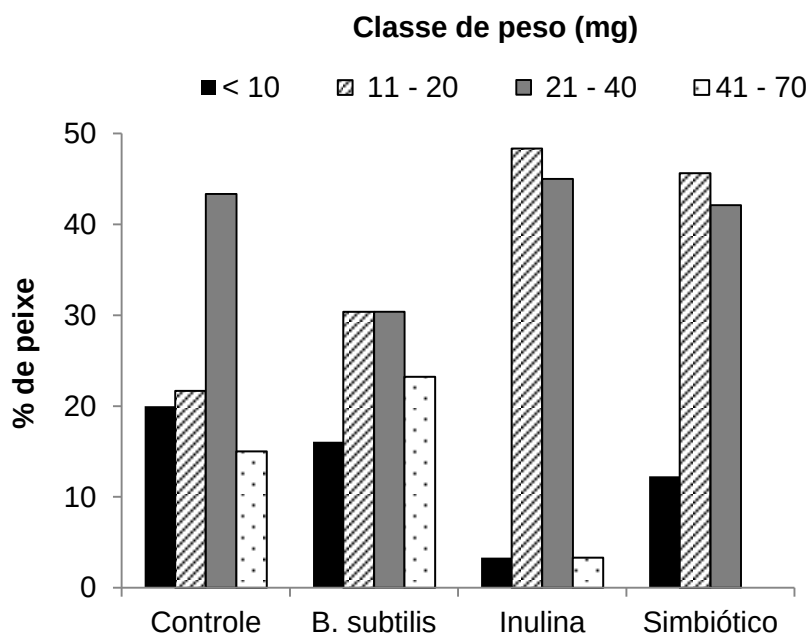


Figura 1. Distribuição das larvas de cachara por classe de peso (mg), alimentadas com artêmia enriquecida com *B. subtilis*, inulina e simbiótico, durante 12 dias.

O grupo *B. subtilis* apresentou médias superiores nas variáveis ganho em peso e ganho em comprimento, porém foi significativamente diferente apenas do tratamento simbiótico. Para a sobrevivência o tratamento inulina obteve melhor taxa (24,24%), sendo significativamente maior que os outros tratamentos (Tabela 1).

Na distribuição dos peixes por classe de peso (Figura 1), observou-se que as dieta inulina e simbiótico apresentaram maiores números de peixes com peso de 11 a 40 mg, o grupo simbiótico não apresentou nenhum peixe acima de 40 mg. Esses dados confirmam que os lotes que receberam artêmia enriquecida com inulina e simbiótico foram os grupos mais homogêneos.

Os Náuplios de artêmia utilizados como primeira e principal fonte de alimentação foram testados e aprovados por alguns autores: Behr et al. (2000) relataram aumento de crescimento, ganho em peso e maior sobrevivência em larvas de jundiá (*Rhamadia quelen*) alimentadas com náuplios de artêmia; Luz (2007) ao comparar náuplios de artêmia e alimento artificial em *Piaractus mesopotamicus* observou melhor resistência ao estresse e maior crescimento quando alimentados com náuplios. Segundo Dias et al., (2011), a *Artemia* é mais eficiente entre os alimentos vivos, pois apresenta uma maior reserva endógena de energia.

O enriquecimento ou bioencapsulamento é uma forma de aumentar o valor nutritivo da artêmia aproveitando sua característica filtradora. O enriquecimento de artêmia na dieta de larvas de peixes já foi testado com: ácidos graxos melhorando o crescimento e a sobrevivência das larvas (Rivera & Botero, 2008); Dias et al. (2011) com *Bacillus subtilis* na alimentação de larvas de *Brycon amazonicus*, não favoreceu o desempenho em alta densidade de estocagem. Touraki et al. (2012) com *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus platarum* nas larvas de *Dicentrarchus labrax*, os dados comprovaram que *B. subtilis* protegeu as larvas contra infecção por *Vibrio anguillarum*, entre outros como metionina (Tonhein et al., 2000); aminoácido (Hoshiba, 2007) e probióticos e prebióticos em sea bream e *Psetta maxima* (Dimitroglou et al., 2010), (Dagá et al., 2013)..

O tempo de enriquecimento desse trabalho seguiu o tempo proposto por Akbar et al. (2014), após analisaram o efeito do enriquecimento de náuplios de artêmia com probiótico multi cepas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus*

coagulans, *B. mesentericus*, *Bifidobacterium infantis* e *B. longum*) por 6 horas, relataram que esse período foi eficiente para os probióticos se manterem viáveis nos náuplios.

Neste trabalho verificamos que larvas de cacharas alimentadas com náuplios de artêmia enriquecidos com inulina apresentaram maiores taxas de sobrevivência, entretanto, as taxas de sobrevivência foram relativamente baixas independentes dos tratamentos avaliados. Essa baixa taxa de sobrevivência é comumente verificada para as espécies de *P. reticulatum* e *P. corruscans* (Rotta, 2003). É pouco provável que as condições experimentais tenham afetado a sobrevivência, pois estavam favoráveis ao cultivo dessa espécie nessa fase.

A densidade de estocagem utilizada neste experimento foi adequada para essa espécie, descartando de que a densidade de estocagem pode ter afetado a taxa de sobrevivência. Alguns autores observaram que densidade em torno de 50 larvas/L diminuiu o desempenho zootécnico e aumentou a taxa de canibalismo e mortalidade (Andrade et al., 2004; Lopes et al., 1996; Ramos, 2001).

A frequência alimentar na fase inicial, principalmente para espécies carnívoras, é um fator a ser considerado. Lopes et al. (1996) concluíram que a frequência do alimento ofertado pode minimizar as perdas por canibalismo. A ocorrência de canibalismo em surubins é muito comum durante a fase inicial de produção podendo levar a morte os peixes envolvidos (Ishikawa, 2012).

Outros trabalhos revelam efeitos positivos da suplementação com probióticos em larvas de peixes. Dagá et al. (2013), ao suplementarem artêmia com duas formulações de probiótico (FAA *Lactobacillus* e *Enterococcus* / FAB *Lactobacillus* e *Pediococcus*, concentração 5g L⁻¹) na dieta de larvas de *Psetta maxima* observaram maior taxa de comprimento e maior sobrevivência em comparação ao grupo controle. Martinez et al. (2009) relataram maior ganho de peso, sobrevivência e taxa de crescimento específico em larvas de *Chirostoma estor* alimentadas com artêmia e rotíferos enriquecidos com probiótico *Lactobacillus casei*. Dennis & Uchenna (2016) observaram maior comprimento de larvas do catfish *Clarias gariepinus* alimentadas com mix de probióticos.

De acordo com Bricknell & Dalmo (2005), o peixe no estado larval pode receber um imunoestimulante em sua dieta para proporcionar proteção nos

períodos considerados críticos como ao final da absorção do saco vitelino, primeira alimentação ou transição para a fase de juvenil. Avella et al. (2010) concluíram que a suplementação com *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus* melhora as respostas frente ao estresse. A imunomodulação de larvas de peixes tem sido proposta como um método para melhorar a sobrevivência, aumentando as respostas inatas em desenvolvimento até que a resposta imune adaptativa esteja desenvolvida (Bricknell & Dalm, 2005).

Mutti (2007) ao enriquecer náuplios de artêmia com ácidos graxos registrou baixas taxas de sobrevivência (10 a 13 %) nas larvas do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em todos os grupos testados. Porém Banda et al. (1992) adicionaram *S. lactis* e *L. bulgaricus* em rotíferos e náuplios de artêmia na dieta de larvas de linguado *Scophthalmus maximus* e registaram que a sobrevivência foi até seis vezes maior nesses grupos em relação ao controle.

Histomorfometria intestinal

As larvas alimentadas com náuplios de artêmia enriquecidos com *B. subtilis* apresentaram valores superiores para as variáveis altura total e altura dos vilos, sendo diferente ($P < 0.05$) dos grupos inulina e simbiótico Tabela 3. O grupo controle não diferiu dos grupos *B. subtilis*, inulina e do simbiótico. Para a camada muscular o grupo que recebeu inulina e o grupo controle diferiu dos outros tratamentos, apresentando maior espessura. A largura do vilo, espessura do epitélio e número de células caliciforme não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 3. Histomofometria intestinal de larva de cacharas suplementados com artêmia enriquecida com *B.subtillis*, inulina e simbiótico (média $\pm$ DP)

Tratamentos	Altura total (μm)	Altura do vilo (μm)	Largura do vilc (μm)	Espessura Epitélio (μm)	Camada muscular (μm)	Cel. Caliciformes / vilo
Controle	22,57 $\pm$ 7,63 ^{ab}	21,50 $\pm$ 7,59 ^{ab}	10,11 $\pm$ 3,67	2,50 $\pm$ 0,99	2,37 $\pm$ 1,05 ^{ab}	2,13 $\pm$ 1,52
<i>B. subtilis</i>	24,4 $\pm$ 8,12 ^a	23,53 $\pm$ 7,92 ^a	9,94 $\pm$ 2,99	2,47 $\pm$ 0,70	2,21 $\pm$ 0,89 ^b	1,95 $\pm$ 1,05
Inulina	20,85 $\pm$ 6,60 ^b	19,63 $\pm$ 6,36 ^b	9,65 $\pm$ 3,14	2,62 $\pm$ 0,92	2,72 $\pm$ 1,56 ^a	1,71 $\pm$ 0,80
Simbiótico	21,82 $\pm$ 7,10 ^b	20,88 $\pm$ 7,10 ^b	9,33 $\pm$ 3,19	2,32 $\pm$ 1,04	2,23 $\pm$ 0,82 ^b	1,83 $\pm$ 1,21
CV %	32,93	33,96	33,45	37,26	47,32	61,91

CV (%): coeficiente de variação

Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P < 0.05).

São escassas as informações disponíveis na literatura envolvendo a morfofisiologia do sistema digestivo de peixes, especialmente em espécies nativas e no estágio larval. A estrutura morfológica do trato gastrointestinal dos peixes varia muito devido às várias espécies e estágios de vida, e isso pode influenciar na microbiota intestinal (Ringo & Birkbeck, 1999). O intestino de peixes carnívoros é curto, com o epitélio intestinal sendo do tipo simples cilíndrico, com células caliciformes e planura estriada (microvilos).

A adição do probiótico *B. subtilis* na dieta de larvas de cachara mostrou-se eficiente proporcionando aumento na altura das vilosidades intestinais. Os vilos são evaginações da mucosa intestinal, estão estritamente ligados à absorção de nutrientes, quando a área de absorção aumenta, mais nutrientes se absorve e, portanto melhora o desempenho zootécnico, resultado esse obtido neste trabalho.

A camada muscular foi maior no tratamento inulina se comparando com os grupos suplementados. A camada é composta por fibras musculares lisas apresentando duas subcamadas de tecido muscular, responsáveis pela contração do tubo digestório e movimentos peristálticos que deslocam o bolo alimentar ao longo do lúmen intestinal (Junqueira & Carneiro, 2012; Montanari, 2016).

Segundo Shiraishi et al. (2009) os mecanismos de regulação do desenvolvimento da camada muscular podem ser um parâmetro de boa saúde e nutrição dos animais. Corroborando com este trabalho Kihara et al. (1995) observaram a relação da fermentação do prebiótico lactosucrose (lactose frutossilada) no intestino com o aumento da espessura da túnica muscular em *Pagrus major*, criando em cativeiro.

A densidade, o tamanho dos vilos e a manutenção celular por meio da renovação celular do epitélio intestinal influencia diretamente na digestão, absorção de nutrientes e conseqüentemente no ganho de peso dos animais (Boleli et al., 2002). O aumento na altura dos vilos após suplementação com MOS foi relatado por Salze et al. (2008) em larvas de bijupirá

Dagá et al. (2012) descreveram maior concentração de células probióticas no intestino de larvas de *Psetta maxima* e uma redução das bactérias gram negativas após adicionar probiótico (FAA *Lactobacillus* e *Enterococcus* / FAB *Lactobacillus* e *Pediococcus* concentração de 5g L⁻¹).

Segundo Radecki & Yokoyama (1991) os probióticos estimulam o crescimento e a estabilidade de populações bacterianas que produzem ácidos orgânicos após fermentá-las reduzindo o pH luminal e inibem a proliferação de bactéria prejudiciais ao epitélio.

Carnevali et al. (2004) testaram larvas de *sea bream* (*Sparus aurata*) recebendo o probiótico *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fructivorans* usando o alimento vivo como vetor por 90 dias, observaram que ambas probióticos foram colonizar o intestino com 66 dias de suplementação. Concluindo que o tempo de suplementação é um fator que pode interferir nos resultados, pois a colonização das bactérias probióticas pode refletir na histomorfologia do intestino.

O uso de prebióticos para a histomorfologia do intestino também tem despertado interesse de pesquisadores. Dimitroglou (2010) ao suplementar larvas de *Sea bream* (*Diplodus sargus* L.) com prebiótico MOS (0,2%), observou aumento no comprimento das vilosidades intestinais em relação ao grupo não suplementado. Schwarz et al. (2011) completaram que a adição de MOS a 0,34% na dieta de larvas de tilápias na ração e não no alimento vivo proporciona maior altura e comprimento dos vilos se comprada ao grupo que não recebeu o prebiótico. O MOS é um mananoligossacarídeo derivados da parede células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que promove a integridade da mucosa intestinal, melhora a conversão alimentar e a saúde dos peixes (Li & Gatlin, 20004). É um dos prebióticos mais testado na aquicultura.

Segundo Rotta (2003) nos primeiros dias de vida as larvas se alimentam do seu vitelo. E quando acontece a reabsorção do saco vitelino as larvas de peixes não estão totalmente desenvolvidas, mas quando se inicia a alimentação exógena são capazes de capturar e digerir suas presas estimulando a produção de enzimas digestivas que permitirão uma melhor maturação do trato digestivo, histológico e diferenciação bioquímica (Rivera & Botero, 2009).

Najdegerami et al. (2013) observaram maior número de células caliciformes em larvas de *Siberian sturgeon* alimentadas com náuplios de artêmia enriquecido com ácido graxos HUFA ($0,6 \text{ g L}^{-1}$) por 4 semanas. As células caliciformes tem a função secretora, são células isoladas, encontradas em maior quantidade nos intestinos médio e posterior e podem ser encontradas

a partir do 3º depois da eclosão (Menin, 1988; Mangetti, 2006). São encontradas em maior número na parte distal do intestino (Cal, 2006).

Existem poucas informações sobre a artêmia enriquecida, usada na dieta de larvas, especialmente para surubins. Não existe um padrão de protocolo de enriquecimento de artêmia ou para outros alimentos vivos, os protocolos encontrados se diferem muito uns dos outros. Os métodos de administração, níveis de dosagem e marcas dos aditivos utilizados, podem proporcionar diferentes resultados, por isso a importância de mais estudos sobre enriquecimento do alimento vivo e seus efeitos no animal estudado.

CONCLUSÃO

O fornecimento de náuplios de artêmia enriquecidos com inulina melhora a taxa de sobrevivência e o fornecimento de náuplios enriquecidos com *Bacillus subtilis* melhora a altura das vilosidades intestinais de larvas de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Akbar, I., Radhakrishnan, D. K., Venkatachalam, R. Sathrajith, A. T. Velayudhannair, K. & Sureshkumar, S. (2014). Studies on probiotics administration and its influence on gut microflora of ornamental fish *Brachydanio rerio* larvae. Int. J. Curr. Microbiolo App. Sci, 3(8), 336-344.

Andrade, L. S., Hayashi, C., Souza, S. R. & Soares, C. M. (2004). Canibalismo entre larvas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, cultivadas sob diferentes densidades de estocagem. Acta Scientiarum: biological sciences, Maringá, 26(3), 299-302.

Arndt, R. E. & Wagner, E. J. (2007). Enriched *Artemia* and probiotic diets improve survival of Colorado River cutthroat trout larvae and fry. North American Journal of Aquaculture, 69, 190-196.

Avella, M. A., gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P., Bracciatelli, C. &

Carnevaali, O. (2010). Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 12-19.

Behr, E.R., Tronco, A.P. & Neto, J.R. (2000). Ação do tempo e da forma de suplementação alimentar com *Artemia franciscana* sobre a sobrevivência e o crescimento de larvas de jundiá. *Ciência Rural* Maria, 30(3), 503 -307.

Boleli I. C.; Maiorka A.; Macari M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari M.; Furlan RL.; Gonzales E. editores. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal, Funep, 75-96, 2002.

Bricknell, I & Dalmo, R.. A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, (19), 457 – 472.

Cal, J. A. (2006). Histologia do trato digestório de surubim – pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz – 1829). p.87. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo.

Campos, J. L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In. Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes (Orgs.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2010. p. 335-361.

Carnevali, O., Zamponi, M.C. Sulpizio, R. et al. (2004). Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, 12, 377-386.

Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M. R., Bergot, P. & Sorgeloos, P. (1997). Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 155(1/4), 149-164.

Crepaldi, D. V., Faria, P. M.C., Teixeira, E.A., Ribeiro, L. P., Costa, A. A. P., Melo, D. C., Cintra, A. P. R., Prado, R. A., Costa, F. A. A., Drumond, M. L., Lopes, V. E. & Moraes, V. E. (2006). O surubim na aquicultura da Brasil. *Rev.*

Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte, 30(3/4), 150-158.

Dagá, P., Feijoo, G. Moreira, M.T. Costas, D. Villanueva, A.G. & Lema, J. M. (2013). Bioencapsulated probiotic increaased survival, growth and improved gut flora of turbot (*Psetta maxima*) larvae. *Aquacult Int.* 21, 337–345.

Dennis, E. U. & Uchenna, O. J. (2016). Use of Probiotics as First Feed of Larval African Catfish *Claris gariepinus* (Burchell 1822). *Annual Research & Review in Biology*, 9(2), 1-9.

Dias, D. C., Furlaneto, F. P. B., Ayroza, L .M. S., Tachibana, L. Romagosa, E. & Ranzani-paiva, M. J. T. (2012). Probiotic in feeding of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*): economic viability. *Acta Scientiarum Animal Sciences*. 34(3), 239-243.

Dimitroglou, A., Davies, S.J., Sweetman, J. *et al.* 2010. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquac. Res.*, 41, 245-251.

Faria, R. H. S., Morais, M., Soranna, M. R. G. S., Sallum, W. B. Manual de criação de peixes em viveiro. 136 p.. Brasília: Codevasf, 2013

Franck, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. 2002. *British Journal of Nutrition*, London, 87, 287-291.

Garcia-De-La-Banda, I., Chereguini, O. & Rasines, I. (1992). Influence of lactic bacterial additives on turbot *Scophthalmus maximus* L.. larvae culture. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr*, 8, 247–254.

Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2), 147-165.

Harwood, C.R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological

and

industrial workhorses. *Trends Biotechnology*, 10, 247-256.

Hoshiba, M. A. (2007). Enriquecimento da alimentação das larvas de matrinxã (*Brycon amazonicus*) com aminoácidos. Influência no crescimento inicial e sobrevivência das larvas. 118 p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária- UNESP.

Inoue, L.A.K.A., Ceccarelli, P.S. & Senhorini, J.A. (2003). A larvicultura e a alevinagem do Pintado e do Cachara. *Panorama da Aquicultura*, 13(76), 15-21.

Ishikawa, M. M., Pádua, S. B.; Ventura, A. S., Jerônimo, G. T., Russo, M. R.; Carrijo-Mauad, J. R. & Martins, M. L. (2012). *Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros*. Embrapa Agropecuária Oeste.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2012). *Biologia celular e molecular*. 9.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.

Kihara, M., Ohba, K.; Sakata, T. (1995). Trophic effect of dietary lactosucrose on intestinal túnica muscularis and utilization of this sugar by gut microbes in red seabream *Pagrus major*, a marine carnivorous teleost, under artificial rearing. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112, 629-634,

Lavens, P. & Sorgeloos, P.(1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Technical Paper. Food And Agriculture Organisation of the United Nations, (361), 295p.

Li, P.& GatlinI, D.M. (2004). Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic influence growth performance, imune responses and resistance of hybrd bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infecton. *Aquaculture*, 231, 445-4456.

Lopes, M. C., Freire, R. A. B., Vicensotto, J. R. M. & Senhorini, J. A. (1996). Alimentação de larvas de surubim pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)

(Agassiz, 1829), em laboratório, na primeira semana de vida. Boletim Técnico CEPTA, Pirassununga, (9), 11-29.

Luz, K. R.. (2007). Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentadas com diferentes dietas. Pesq. agropec. Bras., 42(1), 65-75.

Mangetti, A. S. (2006). Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* Agassiz, 1829. 95 p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Universidade de São Paulo.

Martínez, M. H, Berrera, T. C., Dionate, M. G., Mejái, G. C., Rodrguez, J. L. B. 2009. Efecto del alimento vivo enriquecido con *Lactobacillus casei* en la sobrevivencia y crecimiento de larvas y juveniles de *Chirostoma estor* (Pisces: Atherinopsidae). Ciencia Pesquera, 17(2), 5-12.

Maruta, K. (1993). Probióticos e seus benefícios. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos. Anais. Santos: APINCO. 203-219.

Menin, E. (1988). Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestivo de seis Teleostei (Pisces) de água doce. 118 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

Montanari, T. (2016). Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3. Ed – Porto Alegre: Edição do Autor,,: digital, 229 p.

Mutti, D. W. (2007). Enriquecimento de *Artemia* com ácidos graxos altamente insaturados na larvicultura de *Farfantepenaeus paulensis* e desempenho nas fases posteriores de cultivo. 81 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande.

Najdegerami, E. H., Baruah, K., Shiri, A., Rekecki, A.; Broeck, W. V., Sorgeloos, P., Boon, N.; Bossier, P. & Schryver, P. 2013. Siberian sturgeon (*Acipenser*

baerii) larvae fed *Artemia* nauplii enriched with poly-b-hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests. *Aquaculture research*, 1 -2.

Radecki S.V. & Yokoyama M.T. 1991. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition, In: Miller E.R., Duane E.U. & Lewis A.J. (Eds), *Swine Nutrition* (p.439-447). Butterworth-Heinemann, Boston.

Ramos, L. A. (2011). Manejo alimentar e crescimento de pós-larvas de peixes carnívoros nativos produzidos no Mato Grosso do Sul. 81 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.

Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul S.; Menasaveta P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*. 191:271-288.

Ringo, E. & Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microbiota of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, (30), 73-93.

Rivera C. M & Botero, M. Z. (2009). Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, 22, 607-618.

Roberfroid, M. B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.*, 87(2), 139–143.

Roberfroid, M. D. 1993. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(2), 103-148.

ROBERFROID, M. B.; DELZENNE, N. 1998. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr*, 18, 117–43.

Rotta, M. A. (2003) Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados a piscicultura. Corumbá: Embrapa Pantanal.

Saad, S. M. I. 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 42, 15 p.

Salze, G., Mclean, E., Schwarz, M.H. et al. (2008). Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. Aquaculture, 274, 148-152.

Schwarz, K. K, Furuya, W. M., Natali, M. R. M., Michelato, M. & Gualdezi; M. C. 2010. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias-do-Nilo. Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá, 32, (2), 197-203.

Shiraishi, C.S.; Azevedo, J.F. de.; Silva, A.V. da.; Sant'Ana, D. de M.G.; Araújo, E.J.A. 2009. Análise morfológica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. Ciência Rural, 39, 2146-2153,

Sorgeloos, P. Leger, P. (2002). Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. Word Aquaculture Society, 14, 251-337.

Sorgeloos, P. A. P., Dhert, A. & Candreva, P. (2001). Use of the brine shrimp *Artemia* sp. In marine fish larviculture. Aquaculture, 200(1/2), 147-159.

Tonheim, S.K., Koven, W., & Ronnestad, I. (2000). Enrichment of *Artemia* free methionine. Aquaculture, 190, 223-235.

Touraki, M. & Niopas, I. (2012). Bioencapsulation and pharmacokinetic study of oxolinic acid in rotifers (*Brachionus plicatilis*), *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii. Aquac Res., 44,701-712.

CAPÍTULO 3

Este capítulo está de acordo com as normas da Revista Fish & Shellfish Immunology

Supplementation on juveniles the *Pseudoplatystoma reticulatum* com *Bacillus subtilis*, inulina e symbiotic

ABSTRACT

The accentuated growth of aquaculture can bring numerous disease related problems where many physiological functions such as growth reproduction cellular changes and immune system can be affected and the animals become susceptible pathological. This work evaluate the effect of the additives probiotic, prebiotic e symbiotic on juveniles the cacharas after 32 and 60 days of supplementation and being challenged by *Aeromonas hydrophila* test, with respect to zootechnical performance, physiological, immunological, hematological responses, gut histomorphometric. The juveniles of cachara (n= 280, weight $36,25 \pm 6,91$ g and length of $19,32 \pm 1,33$ cm) were distributed in 20 tanks (80 L 14 fish / tank). The commercial ration: treatment 1 without additives (control), treatment 2 probiotic *B. subtilis* (20g / kg), treatment 3: prebiotic inulin (5g / kg); Symbiotic treatment, *B. subtilis* (20g / kg) + inulin (5g / kg) for 60 days. At 32 days were observed zootechnical performance, physiological, immunological and hematological analyzes and no differences were observed ($P > 0.05$) for these variables. Respective to intestinal histomorphometry the symbiotic group presented a significant difference in the variable goblet cells, being found in a smaller number. At 60 days, the data were analyzed in a completely randomized design in factorial 4×3 (4 treatments x 3 collection times). There was no significant difference for the zootechnical performance data. After the challenge we observed that the respiratory activity of the leukocytes in the inulin treatment after 3 and 6 hours and the symbiotic treatment in the time of 6 hours presented a significant reduction in the respiratory activity of leukocytes. For hemoglobin the inulin

treatment maintained stable concentrations being different from the other treatments after 6 hours of challenge. The plasma cortisol increased in all treatments after challenge, but the control treatment was significantly different from the inulin and *B. subtilis* treatments. Consequently cortisol inhibited the number of lymphocyte cells that decreased after challenge. In conclusion, supplementation with *Bacillus subtilis*, inulin and symbiotics in the diet of juveniles does not improve zootechnical performance, intestinal histomorphometry, physiological, immunological and hematological responses.

Key words: immunostimulants, leukocyte respiratory activity, cortisol and *Aeromonas hydrophila*

Resumo

Bacillus subtilis*, inulina e simbiótico na dieta de juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum

O crescimento acentuado da aquicultura podem trazer inúmeros problemas relacionados a doenças, onde muitas funções fisiológicas como crescimento, reprodução, alterações celulares e sistema imune podem ser afetados, e com isso os animais ficam suscetíveis agentes patológicos. Este trabalho avaliou o efeito dos aditivos probiótico, prebiótico e simbiótico nos juvenis de cachara durante 32 e 60 dias sobre desempenho, histomorfometria intestinal e microbiota intestinal, respostas fisiológicas, imunológicas e hematológicas após desafio por *Aeromonas hydrophila*. Juvenis de cachara ($n= 280$, peso $36,25 \pm 6,91$ g e comprimento de $19,32 \pm 1,33$ cm), foram distribuídos em 20 caixas (80L, 14 peixes/caixa). O delineamento foi inteiramente casualizado (quatro tratamentos / cinco repetições), as dietas consistiram na suplementação da ração comercial: tratamento 1 sem aditivos (controle), tratamento 2 probiótico *B. subtilis* (20g/kg), tratamento 3 prebiótico inulina (5g/kg); tratamento 4 simbiótico, *B. subtilis* (20g/kg) + inulina (5g/kg), durante 60 dias. Aos 32 e 60 dias foram avaliados desempenho zootécnico, análises fisiológica, imunológicas e hematológicas e histomorfometria intestinal. Para histomorfometria, o grupo simbiótico apresentou diferença significativa na

variável células caliciformes, sendo encontrada em menor número. Não houve diferença significativa para os dados de desempenho zootécnico. Após o desafio observamos que a atividade respiratória dos leucócitos no tratamento inulina e simbiótico reduziu significativamente. Para hemoglobina o tratamento inulina manteve as concentrações estáveis sendo diferentes dos outros tratamentos após 6 horas do desafio. O cortisol plasmático aumentou em todos os tratamentos após o desafio, porém o grupo controle foi significativamente diferente dos tratamentos inulina e *B. subtilis*. Consequentemente o cortisol inibiu o número de células linfócitos que diminuiu após o desafio. Em conclusão a suplementação com *Bacillus subtilis*, inulina e simbióticos na dieta de juvenis não melhora o desempenho zootécnico, histomorfometria intestinal, respostas fisiológicas, imunológicas e hematológicas.

Palavras chaves: *Aeromonas hydrophila*; doenças; cachara; probiótico, prebiótico.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem papel de destaque dentre os países com maior potencial para aquicultura, devido sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas com características zootécnicas para produção e mercado (BRASIL, 2013). A perspectiva é que em 2030 o Brasil se torne um dos maiores produtores de pescado do mundo (SEBRAE, 2014).

O sistema de criação intensivo aumenta a produção de peixes, porém pode trazer inúmeros problemas sanitários comprometendo a saúde dos peixes, devido ao aumento da densidade de estocagem que baixa o desempenho produtivo do animal inviabilizando a produção. Os problemas sanitários podem afetar as funções fisiológicas como crescimento, reprodução, alterações celulares e sistema imune, diante disso os animais ficam suscetíveis a doenças causadas por agentes patogênicos. Diante desses problemas os produtores fazem o uso indiscriminado de antibióticos (ROMERO et al., 2012 & TORRECILLAS & MAKOL, 2012).

O uso indiscriminado de antibióticos causa impactos sobre o meio ambiente, devido à liberação de resíduos orgânicos e inorgânicos (READ & FERNANDES, 2002). Esses resíduos são um risco a segurança alimentar, pois ficam presentes nos peixes depois de tratados e não são detectados nos alimentos, podem gerar problemas de saúde, como alergia e toxicidade (CABELLO, 2006 & BURRIDGE et al., 2010).

A fim de manter a saúde dos peixes e melhorar o desempenho e/ ou resistência às doenças, os imunoestimulantes têm sido utilizados na produção de organismos aquáticos (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016). Com o uso de imunoestimulantes há redução do uso de antibióticos, diminuindo os riscos ambientais, genes resistentes a antibióticos e evitando a supressão das respostas imunes dos peixes (RIJKERS et al., 1981).

Os imunoestimulantes têm a capacidade de modular o sistema imune evitando a ocorrência de doenças, melhorando a qualidade de água e os índices de desempenho zootécnico do animal (CEROZI, 2012). Os imunoestimulantes compreendem um conjunto de compostos biológicos e sintéticos de defesa celular e humoral não específica em mamíferos que nos

peixes agem induzindo ou suprimindo os mecanismos de defesa não específicos (GANNAM & SCHROCK, 2012).

O sistema imune dos peixes é dividido em inato e adquirido (adaptativo). O inato é a primeira barreira de defesa contra agentes invasores e atua de forma inespecífica contra padrões moleculares relacionados a microrganismos. O sistema adquirido promove a memória imunológica, por isso precisa de um contato prévio para que a produção de anticorpos específicos seja aumentada (SUNYER; LAMBRIS, 1998).

Quando os peixes estão estressados ocorre grande variedade de alterações imunológicas, ao passo que algumas respostas aumentam ou ativam as respostas imunes e outras são deletérias a competição imune (YADA & TORT, 2016). O Intestino é o órgão que constitui a primeira linha de defesa contra um ambiente cada vez mais tóxico, possui uma grande área superficial que é constantemente colonizada por antígenos da dieta e microrganismos. O intestino é um ponto de contato entre hospedeiros e patógenos ambientais e é considerada uma das principais áreas de entrada para infecção e interações hospedeiros e patógenos (BIRKBECK, et al., 2005 & RINGO et al., 2007).

Os probióticos do gênero *Bacillus* apresenta-se na forma de esporos, pertencem ao grupo de bactérias gram-positivas que estão sendo introduzidas em vários produtos alimentares e possuem alta capacidade de viabilidade no intestino (TAM et al., 2006). O gênero *Bacillus* pode agir positivamente sobre os organismos aquáticos aumentando a sobrevivência e o crescimento do animal, estimulando o sistema digestivo e o sistema imune, ou melhorando a qualidade da água (GATESOUBE, 1999; MORIARTY, 1998; GOMEZ-GIL et al., 2000; ZIAEI-NEJAD et al., 2006). Dessa forma os imunoestimulantes incorporados na dieta do animal podem melhorar essas respostas do sistema imune (HANG et al. 2014).

A principal causa das perdas de lucros na piscicultura são os fatores estressantes que afetam o metabolismo e por consequência o crescimento dos peixes (OBA et al., 2009). As bacterioses estão relacionadas a condições estressantes que os peixes sofrem como, elevada densidade populacional nos sistemas de criação, matéria orgânica em excesso, qualidade da água e manejo (LIMA, 2010). O gênero *Aeromonas* é responsável por consideráveis perdas econômicas na aquicultura, com alto fator de virulência (RODRIGUES &

RIBEIRO, 2004; DASKALOV, 2006). Estudos com infecção de patógenos estão sendo realizados para observar as respostas do sistema de defesa, desencadeado por microorganismos e toxinas de *A. hydrophila*, após o uso de imunostimulantes (RODRIGUEZ et al., 2008; ZANUZZO et al., 2017;).

Com esse trabalho avaliou-se o uso de *Bacillus subtilis*, inulina e a associação de *Bacillus subtilis* + inulina sobre desempenho zootécnico e respostas fisiológicas, imunológicas, hematológicas, assim como a histomorfometria intestinal de juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum*,

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais do projeto foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA (UEMS) protocolo nº 014/2013.

2.1 Animais experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sanidade de Peixes da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Aquidauana-MS. Os juvenis de cachara foram adquiridos de uma piscicultura comercial, com peso $36,25 \pm 6,91$ g (média e desvio padrão) e comprimento total de $19,32 \pm 1,33$ cm (média e desvio padrão). Os peixes foram distribuídos em caixas d'água de polietileno com volume útil de 80L, fluxo de água e aeração contínua e passaram por período de adaptação de 10 dias.

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em 20 tanques (unidades experimentais), com volume útil de 80L. Adotou-se um delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições e 14 peixes por unidade experimental. As rações experimentais consistiram de ração comercial: sem suplementação de aditivos (controle), suplementada com probiótico *Bacillus subtilis* (20g/kg), suplementada com prebiótico inulina (5g/kg) e suplementada com simbiótico *Bacillus subtilis* (20g/kg) + inulina (5g/kg). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia a 5% da biomassa, durante 60 dias.

A biometria para a obtenção de peso e comprimento de todos os peixes foi realizada antes de iniciar o experimento e após 32 e 60 dias de suplementação na dieta.

Aos 32 dias, dois peixes de cada unidade experimental foram amostrados para hematologia, o sangue colhido da veia caudal realizou as análises das variáveis fisiológicas (glicose), imunológicas (atividade respiratória de leucócitos) e hematológicas (hemoglobina, hematócrito, eritrócitos, contagem diferencial e total), os mesmos foram amostrados para a histomorfometria intestinal, restando em cada unidade experimental doze peixes.

Após 60 dias de suplementação dois peixes por repetição foram amostrados para colheita sanguínea (tempo inicial), para avaliação dos parâmetros fisiológicos acrescido do cortisol, imunológicos e hematológicos descritos acima. Em seguida dois peixes por unidade experimental foram agrupados por tratamentos para coleta de material para análise da microbiota intestinal.

Com os peixes restantes (n=8 por unidade experimental), foi realizado o desafio bacteriano com inoculação intraperitoneal da bactéria *Aeromonas hydrophila*. Foram amostrados dois peixes, por repetição, nos tempos de 3 horas e 6 horas. Após inoculação da bactéria para determinação dos mesmos parâmetros.

Para os dados das análises sanguíneas adotou-se um DIC em fatorial com 4 tratamentos e 3 tempos.

Os peixes inoculados pela bactéria e amostrados para colheita sanguínea permaneceram no laboratório alojados em caixas d'água para acompanhamento da taxa de sobrevivência.

2.3 Dietas experimentais

Foram utilizadas 4 dietas experimentais para juvenis de cachara.

Para preparação das dietas experimentais foi utilizada ração comercial Douramix®- Revolution Alevino (Tabela 1) suplementada com dois aditivos e a combinação deles. Os aditivos utilizados foram o probiótico comercial *Bacillus subtilis* (1×10^9 UFC/g) e o prebiótico comercial inulina.

O probiótico foi doado pela empresa Uniquímica, o CALSPORIN®¹⁰ é um produto baseado em esporos viáveis de uma cepa de organismos geneticamente modificado, isolado originalmente do solo.

A inulina foi doada pela empresa Nuscience Nutrientes do Brasil o produto é composto por 92% inulina, 8% frutose, glicose e sacarose e 0,2 cinzas.

A ração foi triturada em triturador (Trapp 650), para cada quilo de ração foram adicionados 2 % de óleo de soja e água morna para ajudar na incorporação dos aditivos e na formação dos peletes. Após a adição dos suplementos os ingredientes foram misturados e processados em máquina de moer carne para a formação dos peletes, em seguida a ração foi seca em estufa com ventilação de ar forçada por 18h em temperatura de 45°C, e refrigeradas.

Os níveis de garantia da ração comercial esta apresentada na (Tabela 1). Para a verificação da composição química da ração foi realizada a análise bromatológicas das rações experimentas (Tabela 2) seguindo a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). As rações experimentais foram analisadas para microbiologia para a verificação do probiótico (Tabela 3).

Tabela 1. Níveis de garantia da ração Douramix – Revolution Alevino, segundo o fabricante

Composição	g.kg⁻¹ de dieta
Proteína Bruta (mín)	400,00
Cálcio (max/min)	35,00 e 25,00
Umidade (max)	120,00
Extrato etéreo (min)	110,00
Material mineral (max)	140,00
Matéria Fibrosa (max)	25,00

Vitaminas e Minerais: Fósforo (mín.) 20,00 g/kg; Magnésio (Max) 0,00 mg/kg; Vitamina A (mín.) 9.000,00 UI/kg; Vitamina D3 (mín.) 4.500,00 UI/kg; Vitamina E (mín.) 180,00 UI/kg; Vitamina B2 (mín.) 24,00 mg/kg; Vitamina B1 (mín.) 15,00 mg/kg; Vitamina C (mín.) 350,0000 mg/kg; Niacina (mín.) 45,00 mg/kg; Vitamina K (mín.) 6,00 mg/kg; Biotina (mín.) 1,20 mg/kg; Ácido Fólico (mín.) 240 mg/kg; Vitamina B12 (mín.) 30,00 mcg/kg; Colina (mín.) 800,00 mg/kg; Manganês (mín.) 15,00 mg/kg; Zinco (mín.) 180,00 mg/kg; Ferro (mín.) 120,00 mg/kg; Calcio (mín.) 25,00 g/kg; Cobre (mín.) 9, mg/kg; Cobalto (mín.) 0,30 mg/kg; Iodo (mín.) 3,00 mg/kg; Selênio (mín.) 0,60 mg/kg; Sódio (mín.) 1.950,00 mg/kg

Tabela 2. Composição bromatológica das dietas experimentais

Tratamentos	Composição					
	Proteína (%)	Umidade (%)	Cinzas	Estrato etéreo (%)	FDN (g)	FDA (g)
Controle	39,34	12,61	14,73	11,04	49,91	8,36
<i>B. subtilis</i>	39,78	8,47	20,74	10,91	36,35	11,41
Inulina	42,17	9,99	14,98	11,54	48,28	9,33
Simbiótico	39,77	12,38	16,49	10,55	51,58	11,92

Análise realizada no Laboratório de Química e Ruminantes/UEMS

Tabela 3. Composição microbiológica das dietas experimentais

Contagem de <i>Bacillus subtilis</i> na ração					
Amostra	Total (g)	Número	Log10	Refer.	Log10 Refer.
Ração controle	50,03	0,00E+00	-	0,00E+00	-
Ração inulina	50,04	0,00E+00	-	0,00E+00	-
Ração <i>B. subtilis</i>	50,15	1,90E+07	7,3	2,00E+07	7,3
Ração simbiótico	50,04	1,60E+07	7,3	2,00E+07	7,3

O *B. subtilis* foi recuperado nas amostras em concentrações dentro do esperado, levando em consideração a inclusão do produto e a taxa de variação de 20%.

2.4 Preparação da bactéria *Aeromonas hydrophila* e infecção experimental

As cepas usadas para o desafio foram fornecidas pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do CAUNESP/Jaboticabal- SP. Após a desinfecção do meio de cultivo (BHI, ágar), esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos, as cepas de *A. hydrophila* foram misturadas ao mesmo e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 27°C. Após o crescimento das colônias da bactéria, foi realizado o procedimento de lavagem

com PBS (tampão fosfato esterilizado) em centrífuga a 4000g por 20 minutos por 3 vezes.

Realizou-se a diluição da bactéria em 170 ml de PBS e leitura em espectrofotômetro (625 nm), a concentração estabelecida foi de $0,9 \times 10^6$ UFC. Esse protocolo foi estabelecido em laboratório.

Após os 60 dias de suplementação, o desafio bacteriano foi realizado depois da coleta inicial, por meio da inoculação intrapeitoneal 1 ml da solução contendo a bactéria.

2.5 Desempenho zootécnico

As biometrias foram realizadas após 32 e 60 dias de suplementação. Todos os peixes de todas as unidades experimentais após passar por jejum de 24 horas, foram anestesiados com eugenol (50 mg.L^{-1}), individualmente avaliou-se o peso e o comprimento. Com os dados de peso e comprimento foram calculados os índices zootécnicos: Ganho em peso (peso final – peso inicial); Ganho em comprimento (comprimento final – comprimento inicial); Conversão alimentar aparente (consumo de ração/peso); Taxa de eficiência proteica (ganho em peso / % de proteína bruta da ração $\times 100$); Taxa de crescimento específico foi determinada pela fórmula $((\text{LN}) \text{ PF} - (\text{LN}) \text{ PI}) / \text{n}^\circ \text{ de dias}$, em que LN é o logaritmos normal de do peso final e inicial.

O fator de condição de Fulton será calculado pela fórmula $K = W/L^b$ onde W é o peso, L o comprimento e b é estimado pela equação da relação peso-comprimento. A uniformidade dos peixes em cada unidade experimental, pela adaptação da equação proposta por Furuya et al. (1998): $U = (N/NI)$, onde U= uniformidade (%); N = número de animais no tanque; NI = número total de animais com peso ou comprimento 20% superior ou inferior á média do peso vivo, em cada unidade experimental.

2.6 Colheita de sanguínea

Os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (50 mg L^{-1}) e para determinar os parâmetros fisiológicos usou-se o plasma. Para isso o sangue foi colhido usando seringas e agulhas banhadas com anticoagulante glistab. Para análises imunológicas foi usado o anticoagulante heparina e para as análises hematológicas o anticoagulante EDTA a 3 %.

2.7 Análises fisiológicas

A glicose plasmática foi determinada pelo método colorimétrico de ponto final utilizando-se kit comercial (LABTEST®). E os níveis de cortisol plasmático foram determinados por meio do teste imunoenzimático de ELISA

2.8 Análises imunológicas

A atividade de leucócitos foi determinada segundo metodologia descrita por BILLER (2008). Este método consiste em determinar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo burst respiratório por meio de ensaio colorimétrico baseado na redução do reagente nitroblue tetrazolium (NBT), que dá origem a precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990). Utilizou-se 100 µL de sangue adicionado a 100 µL de nitroblue tetrazolium (NBT), esta mistura foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após o período de incubação, 50 µL da mistura foi diluída em 1000 µL (1 ml) de N, N-dimetil formamida (DMF) e centrifugada a 3000g durante 5 min. A leitura das amostras foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm.

2.9 Análises hematológicas

O hematócrito (Ht) foi determinado pelo método de microhematócrito de Goldenfarb et al. (1971). Tubos microcapilares foram preenchidos com 75 % do volume e uma das extremidades vedada com massa de modelar. Em seguida foram centrifugados por 5 min a 1.200 rpm. Decorrido esse tempo, foi realizada a leitura dos microcapilares pela tabela de leitura de hematócrito.

Os níveis de hemoglobina (Hb) foram determinados por espectrometria segundo o método de cianometa-hemoglobina descrita por COLLIER (1944). Para isso usou o kit Labtest, em um tubo falcon foi pipetado 2,5 ml da solução Drabkin e 10 µL de sangue e após centrifugação por 5 min a 2000 rpm foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

A Contagem do número de eritrócitos (Er) foi realizada em câmara de Neubauer após a diluição do sangue em solução de formol citrato (1:200).

Extensões sanguíneas foram confeccionadas em duplicata de cada animal, as lâminas foram secas ao ar e coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright segundo (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). A contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, células granulocíticas ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilos) foi realizada em microscópio óptico (1000 X) com auxílio de contador diferencial digital.

2.10 Análise histomorfométrica

Após os 32 dias de suplementação dois exemplares de cada repetição foram eutanasiados por aprofundamento anestésico em solução de eugenol (50 mg L^{-1}) e submetidos a uma incisão longitudinal no ventre para a exposição do órgão. Uma porção de aproximadamente 3 cm de comprimento foi colhida do intestino médio, cortadas longitudinalmente com tesoura microcirúrgica. As porções foram deixadas em potes coletor, mergulhadas em formol 10 % por 24 horas e depois substituído por álcool 70%, permanecendo conservadas até o momento dos próximos procedimentos. As confecções das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia, CCBS- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/Campus Campo Grande.

As amostras foram processadas na rotina histológica do laboratório e foram submetidas à desidratação dos tecidos em várias concentrações de etanol, diafanização em xilol e emblocadas em parafina. Por ato contínuo, foram realizados os cortes transversais semiseriados em micrótomo (ZEISS HYRAX M 25) na espessura de $5\mu\text{m}$. Em seguida se fez a desparafinização, reidratação e coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), conforme o protocolo técnico. Após a preparação das lâminas, foi realizada as medidas morfométricas, sendo 3 mensurações de cada variável por animal, estabelecida dentro de um padrão morfológico.

As lâminas histológicas foram foto documentadas com câmera digital Nikon (D3100), acoplada em microscópio ótico (ZEISS-Primo Star), utilizando aumento de 100 e 400 x. De posse das imagens, foi possível mensurar as variáveis (Figura 1). Para isso foi utilizado o programa Motic Images Plus 2,0 ML.

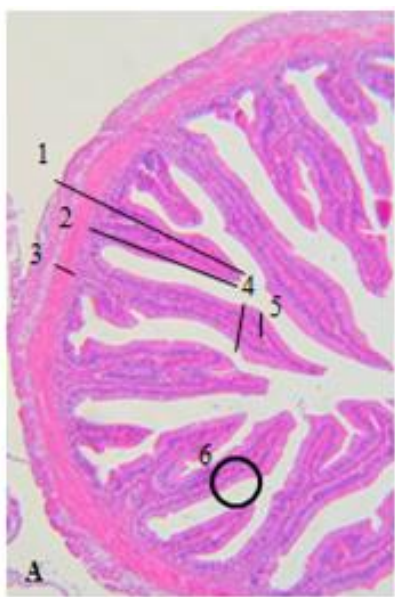


Figura 1. Fotomicrografia da mucosa intestinal de juvenis de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*. Variáveis da histomorfometria intestinal: altura total do vilão (1); altura do vilão (2), camada muscular (3); largura (4); espessura do epitélio (5) e células caliciformes (6)

2.11 Análise estatística

Os dados de desempenho e sangue após 32 dias foram avaliados por meio do teste Shapiro-Wilk, a variável ganho em comprimento foi transformado em tquadrado, após o teste de normalidade. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando observadas diferenças significativas aplicava-se o teste de Tukey. A variável hemoglobina foi submetida ao teste de Kruskal-Wallis para constatar diferenças entre os tratamentos. Todos os testes foram realizados pelo programa estatístico R.

Os dados coletados aos 60 dias passaram pelo teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados para testar a normalidade dos dados. Posteriormente foi realizada a análise de variância em esquema fatorial 4x3 (4 tratamentos x 3 tempos de coleta), o teste de Tukey foi realizado para observar as diferenças significativas e o desdobramento da interação (quando houve). Todos os testes foram realizados pelo programa estatístico R.

2.12 Qualidade da água

As caixas d'água foram sifonadas para retirada das fezes e o resto de ração duas vezes por semana e o monitoramento da água foi realizado duas vezes ao dia (manhã e a tarde). Os valores médio foram pH ($6,7 \pm 0,42$) e a temperatura ($26,51 \pm 2,37$) foram mensurados com o auxílio do phmetro water proof family HANNA e o oxigênio dissolvido ($5,68 \pm 1,99$) com o aparelho HANNA HI 9146. Uma vez por semana foram monitorados a amônia e nitrito com kit colorimétrico (Spectrophotometer de leitura direta DR2000 hach company, Loveland, Colorado, USA)

Os valores encontrados de amônia e nitrito se mantiveram dentro dos níveis considerados não tóxicos para os peixes. As variáveis de qualidade de água analisados apresentaram valores considerado adequados para a espécie (FARIA et al., 2013).

3. RESULTADOS

Desempenho zootécnico

Não houve diferença significativa no desempenho após 32 dias de suplementação. O ganho em peso variou de 7,92 g nos peixes que receberam inulina a 9,97 g para os peixes que receberam *B. subtilis*, esses valores refletem respectivamente 35 e 37 % dos encontrados aos 60 dias.

Após 60 dias de suplementação com as dietas contendo probiótico, prebiótico e simbiótico não foram observadas diferenças significativas para as variáveis de desempenho zootécnico dos cacharas (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho zootécnico de cacharas alimentados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico e um grupo controle durante 60 dias (média $\pm$ DP)

	Controle	<i>B. subtilis</i>	Inulina	Siimbiótico
GP (g)	$23,71 \pm 2,38$	$26,00 \pm 8,81$	$22,15 \pm 8,78$	$25,20 \pm 10,34$
GC (cm)	$1,06 \pm 0,39$	$1,60 \pm 0,46$	$0,78 \pm 0,51$	$2,05 \pm 1,29$
CA	$2,27 \pm 0,46$	$3,17 \pm 0,28$	$2,65 \pm 0,78$	$2,98 \pm 1,00$
TEP	$59,28 \pm 5,90$	$64,97 \pm 22,02$	$55,37 \pm 21,96$	$62,99 \pm 25,85$
TCE (%/dia)	$3,87 \pm 0,04$	$3,90 \pm 0,16$	$3,78 \pm 0,10$	$3,94 \pm 0,23$

Ganho em peso (GP), ganho em comprimento (GC), conversão alimentar aparente (CAA); taxa de eficiência proteica (TEP) e taxa de crescimento específico (TCE).

Análise fisiológica

A análise do cortisol plasmático foi realizada com 60 dias de suplementação. Após o desafio por *A. hydrophila* evidenciou-se que as dietas suplementadas foram eficazes para mitigar os efeitos do estresse, promovendo baixos níveis de cortisol plasmático após 6 horas do desafio em relação ao grupo controle (figura 2).

A análise do cortisol plasmático foi realizada após 60 dias de suplementação. Avaliando a interação, os valores de cortisol aumentaram em todos os tratamentos após 6 horas do desafio, porém os peixes alimentados com a dieta controle apresentaram valores significativos quando comparados aos grupos *B. subtilis* e inulina (Figura 2).

A administração das dietas testadas durante 32 (Figura 3) não influenciou os níveis da glicose plasmática ($P > 0.05$) dos juvenis de cachara. Após 60 dias de suplementação não observamos interação (dietas e tempo de coleta), porém 6 horas após o desafio bacteriano o índice glicêmico diminuiu ($P < 0.05$) em relação aos momentos 0 e 3 horas (Figura 4).

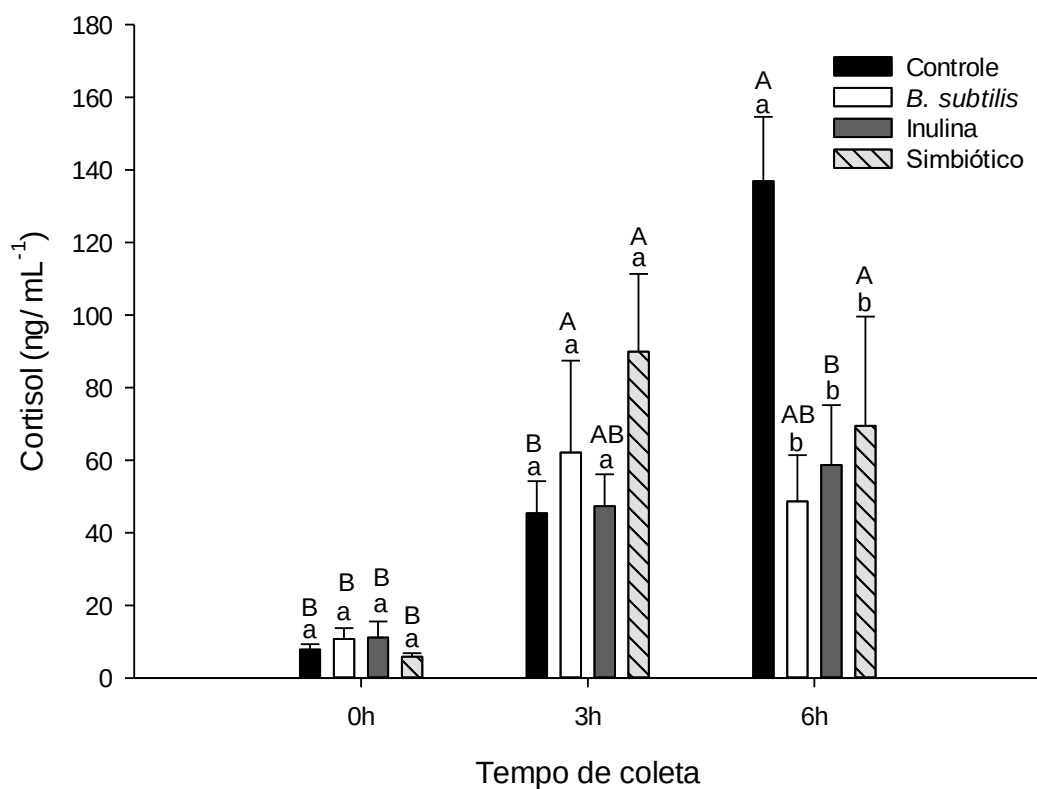


Figura 2. Desdobramento da interação para cortisol de juvenis cachara suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico e grupo controle durante 60 dias e desafiados. Letras minúsculas reportam diferença ($P < 0.05$) entre os tratamentos em cada tempo e letras maiúsculas reportam diferença ($P < 0.05$) de cada tratamento em cada tempo pelo teste de Tukey (média $\pm$ DP)

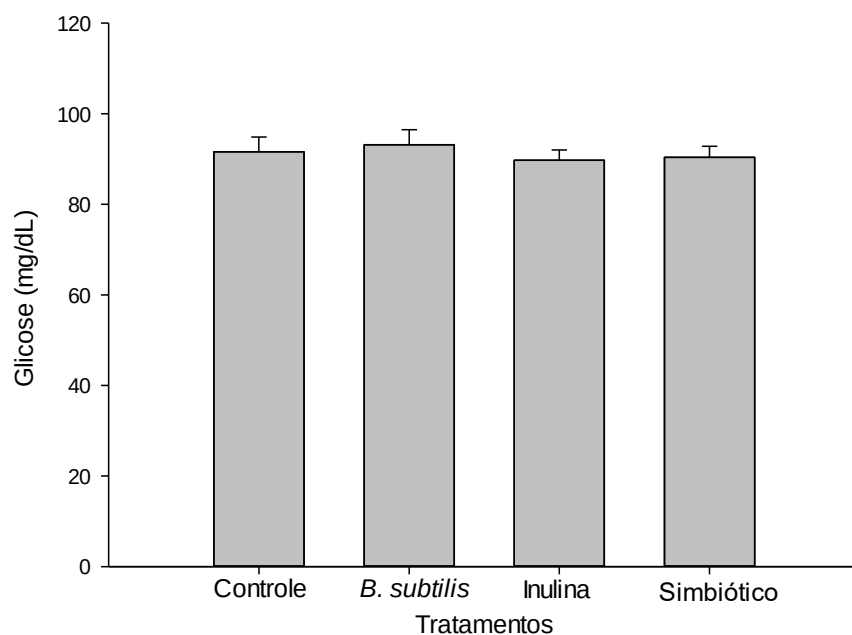


Figura 3. Glicose de cachara suplementados com *B. subtilis*, Inulina, simbiótico durante 32 dias (média $\pm$ DP)

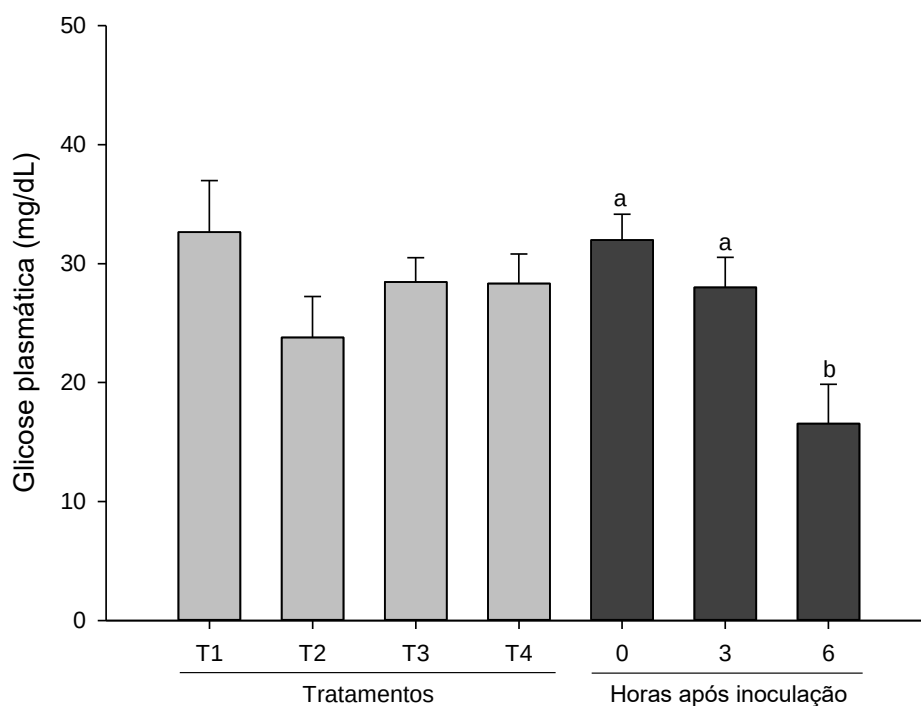


Figura 4. Glicose de cachara suuplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras distintas reportam diferença ($p < 0.05$) teste de Tukey (média $\pm$ DP)

Análise imunológica

Atividade respiratória dos leucócitos (ARL)

A atividade respiratória dos leucócitos aos 32 dias não apresentou diferença significativa nos tratamentos analisados (Figura 5), porém após 60 dias de suplementação houve interação ($P < 0.05$) nos tempos de coleta (Figura 6). No tempo de 3 horas após o desafio, o grupo que recebeu inulina diferiu significativamente dos demais tratamentos, apresentando menor produção de espécies reativas de oxigênio. E no tempo de 6 horas após o desafio bacteriano, os valores das concentrações da ART diminuíram gradativamente em todos os tratamentos, entretanto os grupos inulina e simbiótico foram significativamente iguais, se comparado como os grupos controle e *B. subtilis*.

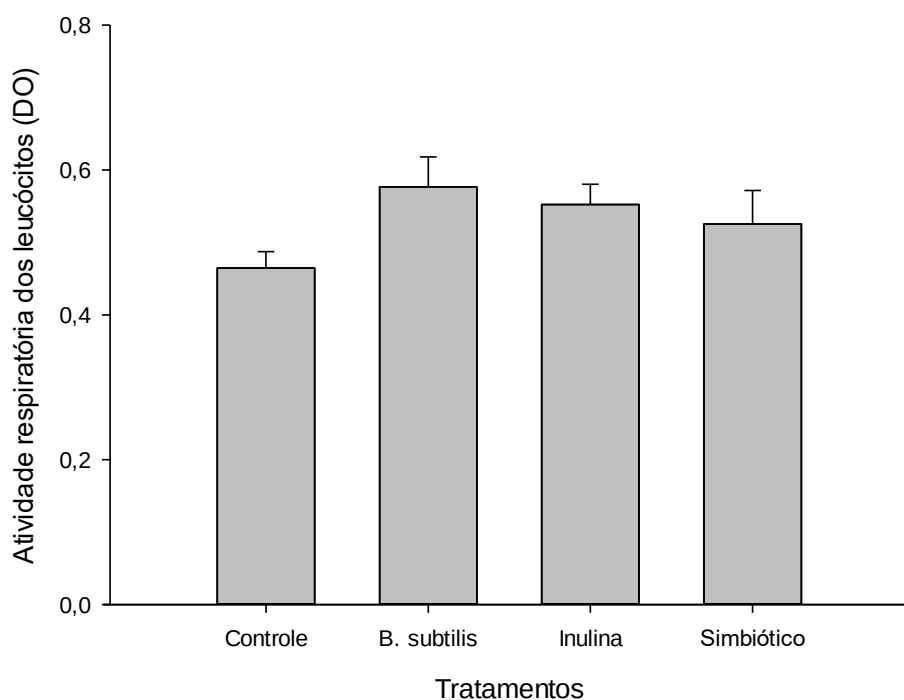


Figura 5. Valores médios da atividade respiratória dos leucócitos de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*, alimentados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico e grupo controle durante 32 dias (média $\pm$ DP)

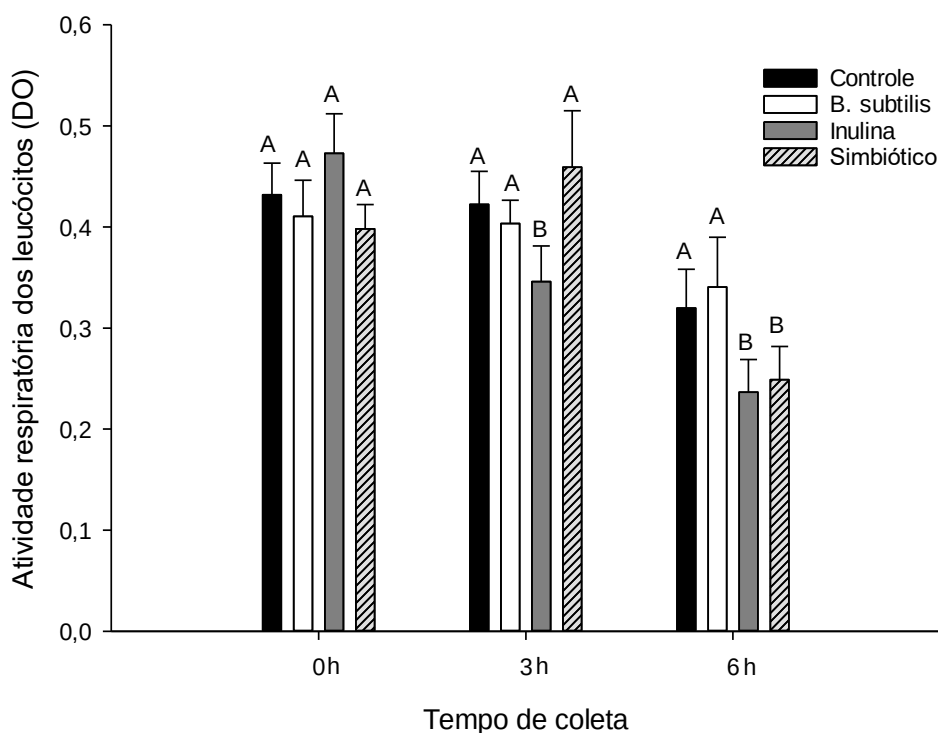


Figura 6. Desdobramento da interação para atividade respiratória dos leucócitos de cacharas suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras indicam diferenças ($P < 0.05$) de cada tratamento em cada tempo pelo teste de Tukey (média $\pm$ DP)

Análises hematológicas

No tempo de 32 dias não houve efeito dos tratamentos sobre todas as variáveis analisadas ($P > 0.05$) (Tabela 5).

Após 60 dias de suplementação a variável hemoglobina foi influenciada pela interação (Tabela 6). No tempo de 6 horas o tratamento *B. subtilis* foi significativamente diferente dos outros tratamentos apresentando menores concentrações (Figura 7).

Em quase todos os tratamentos a concentração de hemoglobina reduziu ao longo do tempo após desafio bacteriano. Apenas a inulina manteve-se estável. Os níveis de hemoglobina nos tratamentos controle e *B. subtilis* diminuíram a coleta de 0 hora sendo estatisticamente diferente ($P < 0.05$). No tratamento simbiótico o tempo de 6 horas apresentou menor ($P < 0.05$).

Os valores médios de hematócrito foram diferentes nos tratamentos ($P < 0.05$). O grupo controle e *B. subtilis* foram significativamente iguais, apresentando maiores concentrações, porém *B. subtilis* não diferiu dos tratamentos inulina e simbiótico. As médias das concentrações de hematócrito nos tempos de coleta apresentaram diferenças ($P < 0.05$) com menores valores no tempo de 6 horas (Tabela 4).

A contagem diferencial dos leucócitos após 32 dias de suplementação, não apresentou diferença significativa nos tratamentos testados (Tabela 7). Posteriormente aos 60 dias (Tabela 6), pode-se observar aumento no número de neutrófilos após 3 e 6 horas do desafio, sendo significativamente diferente da coleta inicial (Figura 8). Ao contrário o número de linfócitos reduziu após a inoculação da bactéria (Figura 9).

Tabela 5. Variáveis de hematologia de cacharas após 32 dias de suplementação com *B. subtilis*, inulina, simbiótico (média $\pm$ DP)

Tratamentos	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	Eritrócito
Controle	4,79 $\pm$ 1,00	16,38 $\pm$ 3,62	0,65 $\pm$ 0,22
<i>B. subtilis</i>	3,96 $\pm$ 0,81	16,33 $\pm$ 4,20	0,94 $\pm$ 0,75
Inulina	4,59 $\pm$ 1,21	14,33 $\pm$ 3,71	0,68 $\pm$ 0,30
Simbiótico	4,21 $\pm$ 0,41	15,38 $\pm$ 5,04	0,70 $\pm$ 0,33

Tabela 6. Variáveis de hematologia de cacharas após suplementação com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados (média)

Fatores	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito %	Neutrófilo	Linfócito
Tratamento				
Controle	7,15	28,38 ^a	27,84	169,3
B, subtilis	6,22	20,44 ^{ab}	23,35	173,2
Inulina	7,19	18,81 ^b	22,05	174,11
Simbiótico	6,40	18,62 ^b	26,5	173,85
Tempo				
0 hora	8,79	23,60 ^a	16,75	180,65
3 horas	6,24	22,58 ^a	31,19	166,58
6 horas	4,96	10,36 ^b	27,25	164,00
CV %	30,87	19,21	37,00	6,07
Valor de p				
Tratamento	0,231577	0,027554	0,38414	0,60073
Tempo	0,000005	0,000000	0,00000	0,00001
Interação	0,006595	0,073496	0,61881	0,67705

Letras minúsculas nas colunas indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

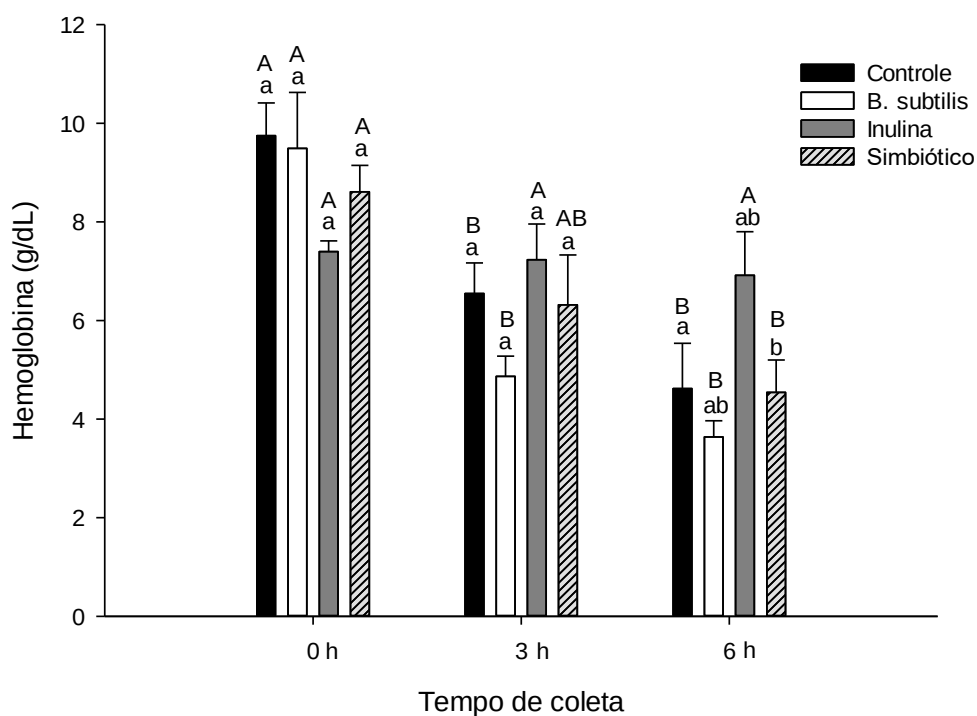


Figura 7. Desdobramento da interação para hemoglobina de cacharas suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras minúsculas indicam diferenças ($P < 0.05$) entre os tratamentos em cada tempo e letras maiúsculas indicam diferenças ($P < 0.05$) de cada tratamento em cada tempo pelo teste de Tukey (média $\pm$ DP)

Tabela 7. Contagem diferencial dos leucócitos de cacharas suplementados por 30 dias com *B. subtilis*, inulina, simbiótico (média $\pm$ DP)

	Tratamentos			
	Controle	<i>B. subtilis</i>	Inulina	Simbiótico
Neutrófilo	25 $\pm$ 16,44	8,28 $\pm$ 9,59	13,77 $\pm$ 10,52	12,16 $\pm$ 8,23
Linfócito	129 $\pm$ 31,04	161 $\pm$ 16,88	136 $\pm$ 27,13	149 $\pm$ 26,29
Monócito	45,71 $\pm$ 19,79	29,42 $\pm$ 18,78	50,55 $\pm$ 23,39	36,66 $\pm$ 20,18

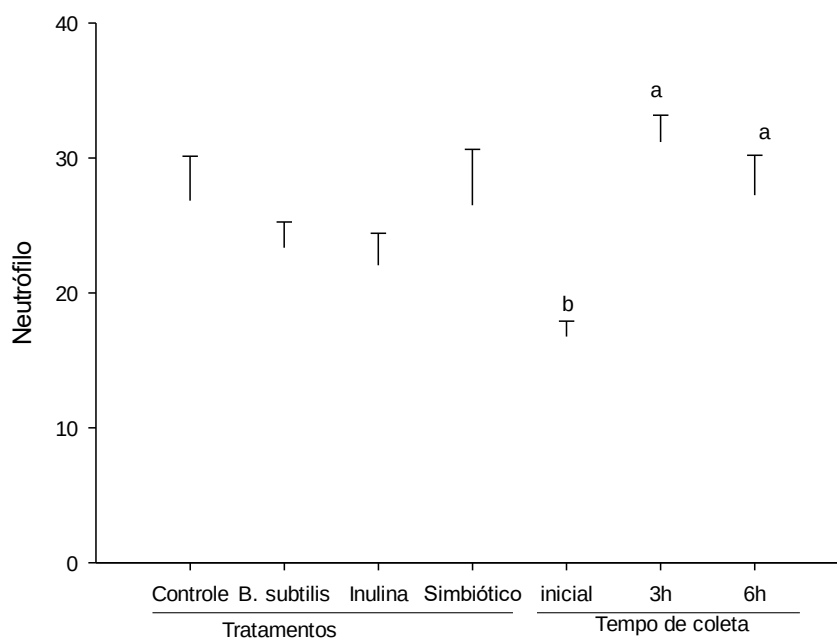


Figura 8. Contagem de neutrófilos de cacharas suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) (média $\pm$ DP)

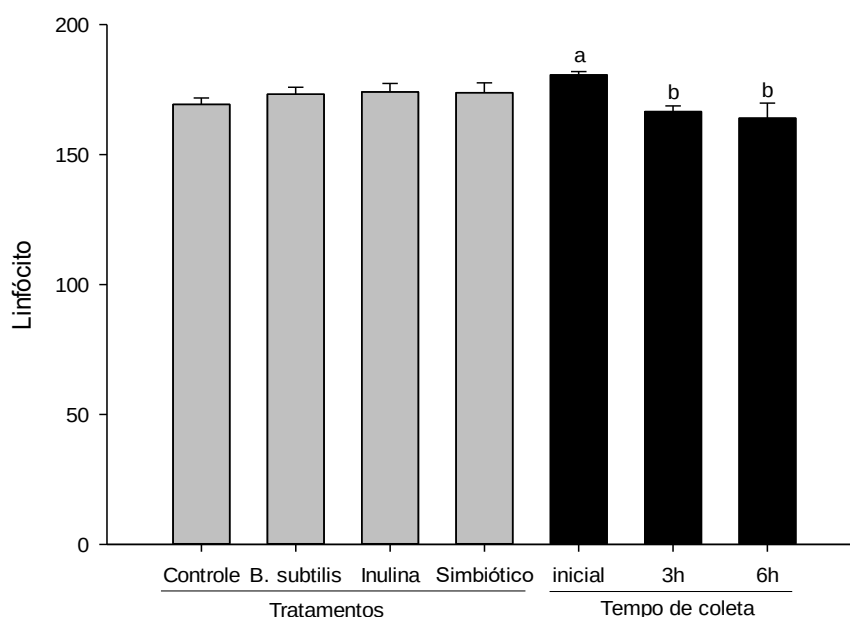


Figura 9. Contagem de linfócitos de cacharas suplementados com *B. subtilis*, inulina, simbiótico durante 60 dias e desafiados. Letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) (média $\pm$ DP)

Histomorfometria intestinal

O grupo que recebeu a dieta simbiótica diferiu ($P < 0.05$) dos demais tratamentos apresentando menor número de células caliciformes. As variáveis: altura total, altura do vilo, largura do vilo, espessura do epitélio e camada muscular não apresentaram diferenças significativas (Tabela 8).

Tabela 8. Histomofometria intestinal de cacharas suplementados com *B. subtilis*, inulina e simbiótico (média $\pm$ DP)

Tratamento	Altura total (μm)	Altura do vilo (μm)	Largura do vilo (μm)	Epitélio (μm)	Camada muscular (μm)	Cel,caliciformes (μm)
Controle	234,05 $\pm$ 47,32	200,43 $\pm$ 42,16	49,85 $\pm$ 16,33	25,67 $\pm$ 7,38	12,34 $\pm$ 3,39	5,36 $\pm$ 2,83 ^a
B, subtilis	220,02 $\pm$ 63,65	191,84 $\pm$ 58,25	47,62 $\pm$ 18,57	25,09 $\pm$ 8,16	10,28 $\pm$ 3,44	5,73 $\pm$ 3,42 ^a
Inulina	219,01 $\pm$ 48,75	186,47 $\pm$ 40,59	45,62 $\pm$ 13,02	24,46 $\pm$ 5,89	11,71 $\pm$ 7,21	6,1 $\pm$ 3,10 ^a
Simbiótico	231,79 $\pm$ 69,55	205,78 $\pm$ 60,30	53,31 $\pm$ 14,50	26,54 $\pm$ 5,54	13,43 $\pm$ 6,93	2,04 $\pm$ 0,92 ^b

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4. DISCUSSÃO

Desempenho zootécnico

Apesar de não apresentar diferença significativa os grupos *B. subtilis* e simbiótico apresentaram valores maiores entre os suplementados para as variáveis de desempenho zootécnico (ganho em peso, ganho em comprimento, TCE e TEP).

Dias et al. (2012) avaliaram doses de 5 e 10g de *Bacillus subtilis* por 84 dias na dieta de juvenis de matrinxã e ressaltaram melhor ganho de peso, taxa de crescimento e conversão alimentar nos grupos que receberam probiótico em comparação ao grupo que não recebeu. As bactérias do gênero *Bacillus* por terem a capacidade de esporular torna-se mais vantajosas sobre as bactérias ácido lácticas, e sua capacidade de sobrevivência durante o trânsito estomacal é maior (HOA et al., 2000). Além disso são mais eficientes durante a elaboração e armazenamento das rações (GIL TURNES et al., 1999).

Melhor ganho em peso, taxa de crescimento específico e conversão foram apresentados por Haroum (2006) após suplementar tilápia com probiótico Biogen (doses de 0,5- 1,0- 1,2 e 2,0 %) durante 120 dias. Segundo Bomba (2002), o probiótico influencia no desempenho de crescimento porque melhora a digestibilidade do animal. E também atua inibindo a colonização de patógenos no trato digestório por competição de nutrientes ou espaço, alterando o metabolismo microbiano (SUGITA TAKAHASHI & DEGUCHI 1992; HOSHINO, 1997). A seleção e comparação da cepa probiótica utilizada é de suma importância, pois os mecanismos de ação, prevenção de doenças e melhora do desempenho do animal vai depender dela (SAULNIER et al., 2009).

Os cacharas submetidos apenas com a inulina apresentaram menores valores no desempenho zootécnico, mas não houve efeito estatístico. Existem poucos estudos sobre a inulina na dieta de peixe e seu efeito pode variar entre espécies de peixes estudadas, dosagens utilizadas e tempo de fornecimento. Segundo Young (1998), os prebióticos agem favorecendo as bactérias probióticas que são benéficas ao hospedeiro. Neste estudo é provável que a inulina não tenha tido efeito positivo no crescimento e no favorecimento de bactérias benéficas do intestino.

Fabregat (2006) ao testar o prebiótico flavored® na concentração de 0,05% em juvenis de tilápia por 84 dias, observou que não houve melhora no desempenho zootécnico. O flavored utilizado é composto por bioflavonóides cítricos, mananoligossacarídeos e beta-glucanas, ácidos linoleico e oleico e os ácidos ascórbico e cítrico. Resultado similar foi encontrado por Bur (2010) ao testar os prebióticos GroBiotc®, inulina, mananoligossacarídeos (MOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS) na dieta do híbrido *Striped Bass*, não encontrando diferenças entre os tratamentos para ganho em peso, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica nas doses de 0,5 e 1% dos produtos. Estes resultados são semelhantes aos resultados encontrados desse trabalho.

Ortiz et al. (2012) avaliaram o desempenho da truta-arco-íris alimentadas com inulina e fruto-oligossacarídeos (FOS) por 7 semanas e observaram maior peso corporal nesses animais em comparação ao grupo controle. Recentemente, Tiengtam et al. (2015) também encontraram resultado positivo no desempenho ao suplementar tilápia-do-Nilo com doses de 2,5 g kg⁻¹ e 5.0 g kg⁻¹ de inulina.

Os suplementos que combinam probióticos e prebióticos de forma que haja um sinergismo são chamados de simbióticos, e seus efeitos benéficos apresentam uma melhora no desempenho e na saúde do animal (CEREZUELA et al., 2011). Azevedo (2016) ao suplementar juvenis de tambaqui com prebiótico (MOS), probiótico (*Bacillus subtilis*) e simbiótico, observou um aumento da biomassa final, ganho relativo e conversão alimentar nos tratamentos com probiótico e simbiótico em comparação ao grupo controle.

Cerozi (2012) ressalta que para os autores poderem discutir seus resultados, comparam diferentes cepas e diferentes espécies de peixes e/ou animais, isso acaba dificultando a compreensão de seu modo de ação. Essa dificuldade também foi encontrada nesse trabalho, principalmente para a discussão da dieta simbiótica.

Análise fisiológica

Os indicadores de estresse mais utilizados em peixes são o cortisol plasmático (resposta primária) e a glicose (resposta secundária) (ROBERTSON et al., 1987; BARTON, 2000).

O aumento do cortisol após exposição a um fator estressante é uma resposta ao estresse que envolve a liberação de corticosteroides (cortisol e cortisona), entre outros (OBA et al., 2009). Observamos neste trabalho que os níveis de cortisol aumentaram em todos os tratamentos em função do tempo de coleta, indicando um possível estresse gerado pela inoculação da *Aeromonas*. Porém os níveis de cortisol no tratamento controle foram significativamente maiores que os encontrados nos tratamentos *B. subtilis* e inulina (Figura 2).

Os valores basais de cortisol de peixes em repouso, descrito por Wedmemeyer et al. (1990), deve ser inferior a 40 ng/mL, esse valor de referência coincide com os valores encontrados na coleta inicial desse trabalho. Segundo Summers et al. (2005) quando os peixes encontram-se estressados os valores de cortisol pode aumentar cerca de 4 vezes. Os níveis de cortisol podem retornar aos valores basais em 24 horas, mas quando o peixes exposto a estressores de modo contínuo, o nível de cortisol podem se manter elevado por dias (PICKERING & PORTTINGER, 1989).

As alterações bioquímicas e fisiológicas ocorridas após a liberação de catecolaminas e do cortisol são conhecidas como respostas primárias ao estresse (OBA et al., 2009). Uma das funções do cortisol durante o estresse é suprir a demanda energética dos peixes, porém a liberação dos corticosteroides deprime o sistema imunológico pela sua ação anti-inflamatório, que inibe o aumento da permeabilidade vascular e a migração dos leucócitos para a região inflamada. O cortisol também inibe a fagocitose de macrófagos e acelera a morte de leucócitos (MARTINS et al., 2004). O cortisol em longo prazo supre a demanda de energia pela gliconeogênese e estimula a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, aumentando os níveis de glicose no sangue (WENDELARR BONGA, 1997; URBINATI & CARNEIRO, 2004). Deste trabalho os níveis de glicose não aumentaram.

Segundo Morgan e Iwana (1997) os peixes utilizam a glicose como principal fonte de energia, podendo ser um indicador de situações adversas. Os valores de glicose encontrados na coleta de 32 dias nos juvenis de cacharas oscilaram de 89,72 a 93,12 mg dL⁻¹. Apesar da variação aos 32 dias, os níveis de glicose estão dentro da faixa recomendada de 40 a 120 mg dL⁻¹, essa variação acontece se o peixe sofrer algum estresse decorrentes de manejo (URBINATI & CARNEIRO, 2004; CARNEIRO & UBINATI, 2002). Aos 60 dias

observou-se menores concentrações de glicose variando de 28,32 a 32,64 mg dL⁻¹, diminuindo após o desafio em função do tempo de coleta independente do tratamento

Valores semelhantes a esse foram encontrados por Nunes (2013) após inoculação com *Saccharomyces cerevisiae* em juvenis de *Pseudoplatystoma* spp. nos tempos de 1, 2 e 3 horas. Fagundes & Urbinati (2008) registraram menores valores glicêmicos em pintados após serem estressados durante o transporte. Segundo Baglioli (2008) a redução dos níveis de glicêmicos pode ser em função da depleção das reservas energéticas.

Análise imunológica

A atividade respiratória dos leucócitos é uma característica do sistema imune inato, responsável pelas respostas inflamatórias nos peixes, é o primeiro mecanismo de defesa contra patógenos. E é medido pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a explosão respiratória dos leucócitos, em que há maior consumo de oxigênio NADPH oxidase, decorrente da redução do oxigênio em ânion superóxido. Esses processos levam a fagocitose dos patógenos (NEUMANN et al., 2000a; BILLER-TAKAHASHI et al., 2013).

O crescimento de espécies reativas de oxigênio resulta no aumento da capacidade de fagocitose das células de defesa como os macrófagos, granulócitos e fagócitos, ativando o sistema imune (SAKAI, 1999; SAURABH; SAHOO, 2008). Quando a capacidade do sistema imune diminui é sinal que o animal encontra-se estressado, esse estresse gera alterações fisiológicas no organismo que resulta na depressão do sistema imune (FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Diante disso, a redução da atividade respiratória de leucócitos – burst oxidativo, está fortemente ligada a condições de estresse como infecção com bactéria, densidade de estocagem e manejo dos peixes, podendo causar a baixa atividade do sistema imune, reduzindo o número de leucócitos (WEENDELAR-BONGA, 1997). Segundo Lamas et al. (1994), uma das hipóteses para esta redução é porque os leucócitos migram para o local da inflamação.

Os tratamentos inulina após 3 e 6 horas e simbiótico após 6 horas da inoculação, reduziram significativamente a atividade respiratória dos leucócitos e portanto reduziu a capacidade fagocítica, que é o mecanismo de destruição de patógenos. Zanuzzo et al. (2017) após testarem *Aloe vera* nas concentrações de 5, 10 e 20 g kg⁻¹ na dieta de juvenis de pacu, observaram que o grupo controle após o transporte e infecção por *A. hydrophila*, reduziram o número de EROs em relação a coleta inicial, concluindo assim que a *A. vera* teve efeito protetor.

O aumento da atividade respiratória dos leucócitos foi observado por Cerezuela (2012) ao suplementar Dourada (*Sparus aurata* L.) com inulina (10 g kg⁻¹) após duas semanas de tratamento, porém ao testar a inulina com *Bacillus subtilis* o autor mostrou um bloqueio no efeito da atividade quando administrado em conjunto, sugerindo que existem moléculas sinalizadoras que interferem e evitam a estimulação do burst. O tempo de suplementação também pode interferir na atividade respiratória dos leucócitos, segundo Yoshida et al. (1995) após suplementar *Claris gariepinus* com glucano por 45 dias, observou que esse parâmetro diminuiu comparado ao início da suplementação.

Análises hematológicas

O estudo da hematologia de peixes é importante, pois colabora para a compreensão da fisiologia comparativa, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos (LARSSON et al., 1976). As variáveis hemoglobina e hematócrito tiveram seus valores reduzidos após o desafio bacteriano, e essa redução foi dependente do tempo de coleta.

A interação tempo de coleta e tratamento, mostrou redução das concentrações de hemoglobina em função da infecção bacteriana, nos peixes submetidos às dietas controle e *B. subtilis* após 3 horas de desafio, o grupo simbiótico o tempo 3 horas após a infecção foi estatisticamente igual o tempo 0 hora e igual o tempo 6 horas. A redução da hemoglobina é indicativo da capacidade de transporte de oxigênio dos peixes. Neste trabalho as concentrações hemoglobina estão dentro da faixa de 5 a 10 g/dl citada por Weiss et al. (2010) para peixes. Nos híbridos do gênero *Pseudoplatystoma*

Tavares Dias et al. (2009) encontraram concentrações de hemoglobina entre 5,2 a 6,2 g/dl mostrando valores mais baixos para esse grupo.

Os valores de hematócrito aos 32 e 60 variaram de 14,33 % a 28,38. De acordo com Pádua et al. (2009) os valores de referência de hematócrito para surubins híbridos (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) é de 32 % a 41%. Após inoculação da bactéria nos cacharas os valores de hematócritos reduziram. A diminuição do número de hematócrito no sangue pode ser indicativo de infecção bacteriana e anemia e os valores de hematócrito podem mudar quando o animal encontra-se estressado, pois aumenta a atividade eritropoiética do baço e do rim. (VOSYLIENÉ, 1999; MARTINS et al., 2004). De acordo com Tavares & Moraes (2004), o estresse ocasiona hemodiluição que é a redução nos valores do hematócrito.

BARCELLOS et al. (2004), ao analisar juvenis de jundiá submetidos a estresse agudo e crônico, registraram diminuição nos valores de hematócrito. Uma das respostas para a redução dos níveis de hematócrito é a ocorrência de hemodiluição no sangue do animal, ocasionada por distúrbios na regulação osmótica no sangue (TAVARES-DIAS E MORAES 2004). Em função das respostas a estímulos estressores, a infecção da bactéria pode ter irradiado esses distúrbios. Biller (2008), após suplementar pacu com 1,3 β -glucano desafiados com *Aeromonas*, observou diminuição nos valores de hematócrito e relatou que essa diminuição pode ter ocorrido por conta da hemorragia causada pela a bactéria.

As células da série branca identificadas nesse trabalho foram os neutrófilos, monócitos e linfócitos. Após 60 dias de suplementação o número de linfócitos reduziu após o desafio. Os linfócitos são as células mais observadas na contagem diferencial dos leucócitos. Segundo Barcellos et al. (2004) os linfócitos são sensíveis a presença de cortisol, por isso o número de linfócitos reduz quando os níveis de cortisol aumenta. Corroborando com os resultados do presente trabalho, os autores também registraram aumento do número de neutrófilos e redução de linfócitos após estudar juvenis de jundiá expostos a estresse agudo e crônico.

Histomorfometria intestinal

Uma das funções do epitélio intestinal é a proteção. O epitélio intestinal tem a capacidade de barrar substâncias indesejáveis como microorganismos e toxinas presentes no lúmen intestinal que atravessem a mucosa e atinjam tecidos e órgãos. A camada de muco produzido pelas células caliciformes recobre as células intestinais, preservando a integridade da mucosa intestinal (UNI, 2006).

A variável células caliciformes apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Os peixes que receberam a dieta simbiótica teve menor número de células. As células caliciformes são responsáveis pela produção de muco que protegem e lubrificam o revestimento do intestino, dificultando a adesão de microorganismos patogênicos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; NOGA, 1995). O aumento no número de células caliciformes pode ser indicativo de um processo de agressão causado por infecção ou outros fatores (SCHWARZ et al., 2011).

Trabalhos com suplementação de probiótico e prebiótico corroboram a importância das células caliciformes na saúde dos animais. Mello et al. (2013) após alimentarem juvenis de tilápias com dietas contendo probióticos *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* como, apresentaram maior número de células caliciformes no epitélio intestinal. Entretanto, Schwarz et al., 2011 não encontraram diferença significativa no número de células caliciformes em larvas desta mesma espécie, quando alimentadas com dietas contendo mananoligossacarídeo (MOS).

Foi observado por Mack et al. (1999) que os probióticos *Lactobacillus* sp. aumentam a regulação dos genes de células caliciformes da mucosa intestinal. E que o efeito desses probióticos induz a ativação e a secreção do muco intestinal e consequentemente as bactérias patogênicas perdem a aderência ao muco dificultando sua colonização (WARKE, 2009). Quando algum microorganismo não benéfico entra em contato com o intestino, interfere no equilíbrio e consequentemente na renovação celular podendo modificar as vilosidades (PELICANO et al. 2003).

O desenvolvimento e a integridade da mucosa intestinal esta relacionada ao número de enterócitos, células enteroendócrinas e caliciformes, que consequentemente corresponde ao aumento na altura e densidade dos vilos, assim maior absorção de nutrientes (MAIORKA et al., 2002; GARCIA, 2008;

MELO et al., 2013). Diante disso, os resultados da histomorfometria intestinal correspondem com os resultados de desempenho zootécnico, como não houve aumento na altura dos vilos, não houve maior absorção de nutrientes e, portanto o desempenho não foi melhorado.

Outros trabalhos com efeitos benéficos do uso de probióticos e prebióticos sob a histomorfometria e mucosa intestinal em diferentes espécies de peixes foram descritas por alguns autores: Carvalho et al. (2011) com mananoligossacarídeo.; Azevedo et al. (2016) com mananoligossacarídeo e *Bacillus subtilis* em *Trichogaster leeri*.

A manutenção e renovação celular no intestino tem que estar em equilíbrio para que seja constante, pois é o que mantém a integridade epitelial, funcionamento digestivo e a capacidade de absorção e aproveitamento dos nutrientes (SPRING; PRIVULESKU, 1998; DIMITROGLOU et al., 2010). Os resultados contraditórios sobre a eficiência do uso de probiótico, prebiótico e simbióticos podem estar ligadas a essas interferências. Ferreira et al. (2014) ao adicionarem *Bacillus* spp. na ração (1,0 g/kg) e na água (20 mg/L) de tambaquis, não observaram melhoras na altura e comprimento das vilosidades. Segundo outros autores a manutenção do uso de probiótico no trato intestinal é um fator limitante, pois o animal necessita de oferta continua e altas concentrações do produto para se obter efeito positivo.

A análise da microbiota intestinal ajudará a concluir os efeitos das dietas no intestino dos juvenis de cacharas.

7. CONCLUSÃO

A suplementação com *Bacillus subtilis*, inulina e simbiótico na dieta de juvenis de cachara inibiu o aumento do cortisol plasmático, uma resposta fisiológica ao estresse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, R.V.; FOSSE-FILHO, J.C.; PEREIRA, S.L.; CARDOSO, L.D.; VIDAL-JÚNIOR, M. V.; ANDRADE, D. R.. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. Pesq agropec. Bras. 2016, v. 51, n.1, p. 9-16.

BAGLIOLI, B. Vitamina C na dieta e influência nas respostas de estresse e resistência de juvenis de jundiá expostos ao ictio. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, 2008.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, v. 237, p. 229-236, 2004.

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture* 2000, v. 62, n. 1, p. 12-18.

BILLER, J.D., BENDHACK, F., TAKAHASHI, L.S & URBINATI, E.C. Stress responses in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to repeated air exposure. *Acta Scientia Animal Science* 2008, v. 30, p. 89-93.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L S; SAITA, M. V.; GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz. J. Biol.* 2013, v. 73, n. 2, p. 425-429.

BIRKBECK, T.; RINGO, E. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel W, Naughton P, editors. *Microbial ecology in growing animals*. Edinburgh, UK: Elsevier; 2005. p. 208-34.

BOMBA, A., NEMCOA R., GANCARC-OVA S., HERICH R., GUBA P. & MUDRON-OVA D. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition* 2002, p. 95-99.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013.

BUR, G.; HUME, M.; RICKE, S.; NISBET, D.; & GATLIN III, D. In Vitro and In Vivo Evaluation of the Prebiotics GroBiotic®-A, Inulin, Mannanoligosaccharide, and Galactooligosaccharide on the Digestive Microbiota and Performance of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Microb. Ecol. 2010, v. 59, p. 187-198

BURRIDGE, L.; WEIS, J. S.; CABELLO, F.; PIZARRO, J. & BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 2010, v. 306, p. 7–23.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol 2006, v. 8, n.7, p. 44–1137.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. Aquaculture International 2002, v. 10, n. 3, p. 221-229.

CARVALHO J.V., LIRA A.D., COSTA D.S.P., MOREIRA E.L.T., PINTO L.F.B. & ALBINATI R.C.B. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* e mananoligossacarídeo. Revta Bras. Saúde Prod. Anim. n. 12, p. 176-187, 2011.

CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F.A.; MESEGUER, F.; ÁNGELES ESTEBAN. A. Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. Fish & Shellfish Immunology 2012, v. 32, p. 1032-1040.

CEROZI, B. S. 2012. Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).

Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. Food Control 2006, v. 17, p. 474- 483.

DIAS, D. C.; URLANETO, F. P. B.; AYROZA, L. M. S.; M. S.; TACHIBANA. L.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Probiotic in feeding of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*): economic viability. Acta Scientiarum Animal Sciences. v. 34, n. 3, p. 239-243, 2012.

DIMITROGLOU A; MERRIFIELD, D. L; SPRING, P; SWEETMAN J; MOATE, R; DAVIES, S. J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture v.300, p.182-188, 2010.

FABREGAT, T. E. I. 2006. Utilização do prebiótico flavofeed® como suplemento; dietário para juvenis de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus*.. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

FAGUNDES, M.; URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. Aquaculture 2008, v.276. p.112-119.

FARIA, R. H. S., MORAIS, M., SORANNA, M. R. G. S., SALLUM, W. B. Manual de criação de peixes em viveiro. 136 p.. Brasília: Codevasf, 2013

FERREIRA, C. M.; ANTONIASSI, N. A. B.; SILVA, F. G.; POVH, J. A.; POTENÇA, A. MORAES, T. C. H.; SILVA, T. K. S. T.; ABREU, J. S. Características histomorfométricas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. Pesq. Vet. Bras., n. 34, v. 12, p. 1258-1264, 2014.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Sanidade Aquícola: Certificação Sanitária na Aquicultura. Panorama da Aquicultura 2008. Ed. 107.

GANNAM, A. L. & SCHROCK. Immunostimulants in fish diets. Journal of Applied Aquaculture 2012, v. 9, n. 4, p. 53-89.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147–165, 1999.

GIL-TURNES, C.; SANTOS, A. F. DA CRUZ, F. W. MONTEIRO, A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic Cen. Biot. Brazilian Journal of Microbiology 1999, v.30, n.1, p.11-14.

GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, v.191, p.259–270, 2000.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. American Journal of Clinical Pathology 1971, v. 56, n.1, p. 35-39.

HANG, B. T. B.; PHUONG, N. T. KESTEMONT, P. Can immunostimulants efficiently replace antibiotic in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against bacterial infection by *Edwardsiella ictaluri*? Fish & Shellfish Immunology 2014, v. 40, p. 556-562.

HAROUM, E. R.; GODA, A. M. A. & KABIR CHOWDHURY, M. A. Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture Research 2006, v. 37, p. 1473-1480.

HOA, N. T., L. BACCIGALUPI, A. HUXHAM, A. SMERTENKO, P. H. VAN, S. AMMENDOLA, E. RICCA, AND A. S. CUTTING. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of

gastrointestinal disorders. Appl. Environ. Microbiol. 2000, v. 66, p. 5241-5247.

HOSHINO, T.; ISHIZAKI K.; SAKAMOTO, T.; KUMETA, H.; YUMOTO, I.; MATSUYAMA, H. & OHGIYA, S. Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature. Letters in Applied Microbiology, v. 25, p. 70-72, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 280.

KLEIN, J. Immunology. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA 1990, p. 311-334.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADON, R. Nonespecific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). Journal of Fish Biology 1994, v. 45, n. 5, p. 839-854.

LARSON, A., JOHANSSON-SJOBECK, M.J., FANGE, R. Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. Journal of Fish Biology 1976, v.9, p.425-440.

MACK, D. R. et al. Probiotics inhibi by enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. Am J Physiol, v.276, p.941-950, 1999.

MAIORKA, A; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Campinas: FACTA, Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas, cap. 8, p. 113-124. 2002.

MARTINS, M.L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA E.M.; NOMURA, D.T. A Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda:

Anisakidae) in fish pond. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2004, v.56, n.5, p. 640-646.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J.; RIBEIRO, K.; MAKOTO, D.; MYIAZAKI, Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. B. Inst. Pesca, São Paulo, v. 30, p. 71-80, 2004.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Measurements of stressed states in the field. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. Eds. Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. 1997, p. 247-270.

MELLO, H.; MORAES, J. R. E.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R. O. A.; SHIMADA, M. T.; ENGRACIA FILHO, J. R.; CLAUDIANO, G. S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia do Nilo. Pesq. Vet. Bras. 2013, v. 33, n. 6, p. 724-730.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 1998, v. 164, p. 351-358.

NEUMANN, N. F., BARREDA, D R.; BELOSEVIC, M. Generation and functional analysis of distinct macrophage subpopulations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures. Fish and Shellfish Immunology 2000, v. 10, n.1, p. 1-20.

NOGA E.J. Fish Disease. Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book, St Louis 1995, 367p.

NUNES, A. L. Probiótico na dieta de sruibins *Pseudoplatystoma* spp. 90 p. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Mato Grosso do sul, 2013.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Embrapa Amapá,

Macapá. 2009. p.582.

PÁDUA, S. B.; TERNIMO, T.; SANT'ANA de SÁ, A. R. Hematologia: Ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal. 1º Ed. Pedro & João Editores 2009, p. 43-80,

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, C. E. A., KODAWARA, L. M. & LIMA, T. A.. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. Revta Port. Ciênc. Vet. 2003, v. 98, p.125-134.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiol. Biochem., 1989, v. 7, p. 253-258.

READ P, FERNANDES T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. Aquaculture 2003, v. 226(1-4), p. 63–139.

RIJKERS, G. T, OOSTEROM, R. & MUISWINKEL, W.B. The immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). Vet Immunol Immunopathol 1981, v. 2, p. 281-90.

RINGO, E. & BIRKBECK, T. H. Intestinal microbiota of fish larvae and fry. Aquaculture Research, n. 30, p. 73-93, 1999.

RINGO E, MYKLEBUST R, MAYHEW T, OLSEN R. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. Aquaculture 2007, p. 268:251.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *The Progressive Fish-Culturist* 1987, v. 49, n. 1, p. 1-12.

RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V.; Aeromonas. In: VIEIRA, R. H. F. Microbiologia , higiene e qualidade do pescado- teoria e prática. São Paulo: Varela, 2004, 380 p.

RODRÍGUEZ, I.; NOVOA, B. and FIGUERAS, A., 2008. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 2008, vol. 25, n. 3, p.239-249.

ROMERO J, FEIJOÓ C, NAVARRETE P. Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives; In: Carvalho E, editor. Health and Environment in Aquaculture. 2012.

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

SAULNIER, D.M.A.; SPINLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. Current Opinion in Biotechnology 2009, v.20, p. 135-141.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008

SCHWARZ K.K., FURUYA W.M., NATALI M.R.M., MICHELATO M. & GUALDEZI M.C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de Tilápias-do-Nilo. Acta Scient., Anim. Sci. 2010, v. 32, n.2, p.197-203.

SEBRAE. 1º anuário brasileiro da pesca e aquicultura, 2014.

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

SPRING, O.; PRIVULESKU, M. Mannanoligosaccharide: its logical role as natural feed additive for piglets. In: Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's 17 th Annual Symposim, (ed. By T. P. Lyons & K. A. Jacques). Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 553-561, 1998.

SUGITA, H., KAWASAKI, J., KUMAZAWA, J. & DEGUCHI, Y. Production of amylase by the intestinal bacteria of Japanese coastal animals. *Letters in Applied Microbiology* 1996, v. 23, p. 174-178.

SUMMERS, C.H.; WINBERG, S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *The Journal of Experimental Biology*, v. 209, p. 4581-4589, 2006.

SUNYER, J. O. & LAMBRIS. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews*, v. 166, p. 39–57, 1998.

TAM, N. K. M.; UYEN, N. Q.; HONG, H. A.; DUC, L. H.; HOA, T. T.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, v. 188, p. 692-700, 2006.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. hematologia de peixes teleósteos. Ed. Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto – SP. P. 144, 2004

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B. de; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. de. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN NETO, A.; MARIANO, W. dos S.; SÓRIA, S.F.P. (Ed.). Tópicos especiais em saúde e criação animal. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009. p.43-80.

TIENG TAM, N.; KHEMPAKA, P.; PAENGKOU, P.; BOONANUNTANASARN, S. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology* 2015, v. 207, p. 120-129.

TORRECILLAS S, MAKOL A. Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *J. Fish Dis* 2012. 591–602.

UNI, Z. Early development of small intestinal function. In: Poultry Science Symposium Series. Avian Gut Function in Health and Disease 2006. p. 29-42.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F.. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. TecArt 2004, p. 171-194, .

VALLEJOS-VIDAL, E. REYES´LÓPEZ, F. TELES, M. MACKENIZE, S. The response of fish to immunostimulant diets. Fish Shellfish Immunology, n. 56, p. 34-69, 2016.

VOSYLIENÉ, M.Z., The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). Acta Zoologica Lituanica 1999, v. 9, p.76-82.

WALKER, W.A. Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis, v.46, p.S87-91, 2008.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; McLEAVY, D. J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). Methods for fish biology. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p. 451-490.

WENDELAAR-BONGA, S.E. The Stress Response in Fish. Physiological Reviews 1997, v. 77, n. 3, p. 591-625.

WEISS, D.J.; WARDROP, J.; SCHALM, O.W. Schalm'sveterinary hematology. 6 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010, 1206p

YADA, T. & TORT, L. Stress and disease resistance: imune system and immunoendocrine interactions. "In": FARRELL, A. P. and BRAUNER, C. J., editores. Biology of stress in fish. Amesterdam: Academic Press, 201, p. 365-403.

YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral

administration of immunostimulants. Journal of Fish Diseases, v.18, p.195-198, 1995.

YOUNG, J. European market developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs. British Journal of Nutrition 1998, v.80, n.4, p.231-233.

ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; MONTOYA, L. N. F.;FAVERO, G.; URBINATI, B. C. *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and Shellfish Immunology. 2017.

ZIAEI-NEJAD, S.; REZAEI, M. H.; TAKAMI, G. A.; LOVETT, D. L.; MIRVAGHEFI, A. R.; SHAKOURI, M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 2006, v. 252, p. 516–524.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como uma saída para a diminuição do uso de antibióticos se faz o uso de alimentos funcionais Esses alimentos incorporados na dieta alimentar de peixes proporcionam o consumo de nutrientes essenciais que beneficiam o desempenho produtivo, estimulam o sistema imunológico e produzem substâncias que impedem a proliferação de agentes oportunistas.

O uso do probiótico *Bacillus subtilis*, prebiótico inulina e a combinação simbiótica na dieta de juvenis de cachara inibiu o aumento do cortisol plasmático, minimizando o efeito de estresse. A resposta ao estresse é um mecanismo que permite ao peixe preservar sua saúde frente à ameaça de estressores e tem papel preponderante na inibição do desempenho reprodutivo de peixes desencadeado por estresse.

Estudos sobre a utilização desses produtos em peixes apresentam muitas vezes resultados controversos, com diferentes respostas. Nesse estudo a concentração da bactéria *Aeromonas hydrophila* utilizado no desafio para dar um “start” no sistema fisiológico dos peixes, foi letal para eles, após 24 horas todos os peixes, independente do tratamento morreram. A concentração

utilizada da *A. hydrophila* esta de acordo com o protocolo que utilizamos no laboratório para outros experimentos, mas a cepa utilizada continha uma alta taxa de virulência, prejudicando o sistema fisiológico dos peixes em poucas horas, comprometendo as respostas dos efeitos dos imunoestimulantes utilizados.

As diferentes espécies de peixes, doses testadas e tempo de fornecimento do suplemento, também podem causar divergências de resultados, diante disso a necessidade de mais estudos com esses aditivos.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DAS REVISTAS ESCOLHIDAS

Artigo capítulo 2

Revista Acta Scientiarum. Animal Sciences

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS:

1. Acta Scientiarum. Animal Sciences, ISSN 1807-8672 (on-line), é publicada trimestralmente pela Universidade Estadual de Maringá.
2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes da Zootecnia (Produção Animal), incluindo genética e melhoramento, nutrição e digestão, fisiologia e endocrinologia, reprodução e lactação, crescimento, etologia e bem estar, meio ambiente e instalações, avaliação de alimentos e produção animal.
3. Os autores se obrigam a declarar a cessão de direitos autorais e que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica sob pena de exclusão. Esta declaração encontra-se disponível no endereço:
<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/about/submissions>.
4. Os dados, ideias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do comitê editorial da revista.

5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.
6. Os artigos submetidos poderão ser em português ou inglês. Se aceitos para publicação, será obrigatória a tradução para o inglês.
7. Os artigos serão avaliados por consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito ou rejeitado pelo Conselho Editorial.
8. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando o Portal ACTA, no endereço <http://www.uem.br/acta>.
9. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.
10. A revisão de português (Resumo) e a revisão de língua estrangeira serão de responsabilidade e custeados pelos autores dos artigos já aceitos para publicação, mediante comprovação emitida pelos revisores credenciados.
11. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:
 - a) No processo de submissão, deverão ser inseridos os nomes completos dos autores (no máximo seis), seus endereços institucionais e o e-mail do autor indicado para correspondência.
 - b) Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: Resumo, Palavras-chave, Abstract, Keywords, Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.
 - c) O título, com no máximo vinte palavras, em português e inglês, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras, que não estejam citadas no título.

- d) O resumo, não excedendo 200 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais e métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis palavras-chave que não estejam citadas no título deverão ser acrescentadas ao final tanto do resumo como do abstract.
- e) Os artigos não deverão exceder 15 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no Word, ou compatível, utilizando Times New Roman fonte 12.
- f) O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.
- g) O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 2 MB, nem poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do Word.
- h) Tabelas, figuras e gráficos deverão ser inseridos no texto, logo depois de citados. As Figuras e as Tabelas deverão ter preferencialmente 7,65 cm de largura e não deverão ultrapassar 16 cm.
- i) As figuras digitalizadas deverão ter 300 dpi de resolução e preferencialmente gravadas no formato jpg ou png. Ilustrações em cores serão aceitas para publicação.
- j) Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.
- k) As equações deverão ser editadas, utilizando software Math Type ou inseridas como figura jpg ou png.
- l) As variáveis deverão ser identificadas após a equação.
- m) Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.
- n) A revista recomenda que oitenta por cento (80%) das referências sejam de artigos listados na base ISI Web of Knowledge, Scopus ou SciELO com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência às citações de artigos internacionais. Não serão aceitas nas referências citações de dissertações, teses, monografias, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.
- o) As citações deverão seguir os exemplos abaixo, que se baseiam na norma da American Psychological Association (APA). Para citação no texto, usar o sobrenome e ano: Kubarik (1997) ou (Kubarik, 1997); para dois autores: Abimorad e Carneiro (2004) ou (Abimorad & Carneiro, 2004); para três a cinco autores (1.^a citação): Mendoza, Valous, Allen, Kenny, Ward e Sun (2009) ou

(Mendoza, Valous, Allen, Kenny, Ward & Sun, 2009) e, nas citações subsequentes, Mendoza et al. (2009) ou (Mendoza et al., 2009); para seis ou mais autores, citar apenas o primeiro seguido de et al.: Pedrosa et al. (2012) ou (Pedrosa et al., 2012).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, alinhamento justificado, conforme os exemplos seguintes, que se baseiam na norma da American Psychological Association (APA). Listar todos os autores do trabalho. Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados, sem o local de publicação.

ARTIGOS

Stech, M. R., Carneiro, D. J. Processed soybean in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(1), 1-8. doi:10.4025/actascianimsci.v39i1.24296

Dois a sete autores (devem-se indicar todos os autores separados por vírgula, exceto o último que deve ser separado por vírgula seguido de &)

Abimorad, E. G. & Carneiro, D. J. (2004). Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(5), 1101-1109.

Farias, M. S., Prado, I. N., Valero, M. V., Zawadzki, F., Silva, R. R., Eiras, C. E. & Lima, B. S. (2012). Níveis de glicerina para novilhas suplementadas em pastagens: desempenho, ingestão, eficiência alimentar e digestibilidade. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(3), 1177-1188.

Oito ou mais autores (devem-se indicar os seis primeiros, inserir reticências e acrescentar o último autor)

Silva, C. E. K., Menezes, L. F. G., Ziech, M. F., Kuss, F., Ronsani, R., Biesek, R. R., Lisbinski, E. (2012). Sobressemeadura de cultivares de aveia em pastagem de estrelaafricana manejada com diferentes resíduos de forragem. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(6), 2441-2450.

LIVROS

Hui, Y. H., Nip, W. K., Rogers, R.W., & Young, O. A. (2001). *Meat science and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Kevan, P. G., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2006). *Pollinating bees: the conservation link Between agriculture and nature*. 2nd ed. Brasília, DF: Secretariat for Biodiversity and Forests.

Souza, J. P., Pereira, L. B. (2007). Fatores influenciadores na competitividade da cadeia de carne bovina no Estado do Paraná. In I. N. Prado, & J. P. Souza (Orgs.), Cadeias produtivas: estudos sobre competitividade e coordenação (p. 53-79). Maringá: Eduem.

Prazo médio entre submissão e publicação dos artigos publicados em 2016: 6 meses.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita e não está sendo avaliada por outra revista.

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, Open Office ou RTF (desde que não ultrapasse 2MB).

Todos os endereços de páginas da Internet, incluídas no texto (Ex: <http://www.eduem.uem.br>) estão ativos e prontos para clicar.

O texto está em emparelhamento 1,5; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. No máximo 15 páginas.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.

A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção propriedades do Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação por Pares Cega.

O artigo submetido poderá ser em português ou inglês. Se aceito para publicação será obrigatória a tradução para o inglês

Artigo capítulo 3

Revista Fish Shellfish Immunology

PREPARATION NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system

automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the**

e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site. Immediately after the abstract, provide 5-10 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who

provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. **Nomenclature and units** Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork Electronic artwork **General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats

(note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal

communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/fish-and-shellfish-immunology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. Examples: Reference to a journal publication: [1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. Reference to a book: [2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book: AUTHOR INFORMATION PACK 1 Nov 2016 www.elsevier.com/locate/fsi 11 [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website: [4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).